



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

***ALAGOAS VESICULOVÍRUS: VALIDAÇÃO DA REAÇÃO EM CADEIA
DA POLIMERASE (RT-qPCR) E ANÁLISE FILOGENÉTICA.***

ANAPOLINO MACEDO DE OLIVEIRA

TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

**BRASÍLIA – DF
MARÇO DE 2017**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

***ALAGOAS VESICULOVÍRUS: VALIDAÇÃO DA REAÇÃO EM CADEIA
DA POLIMERASE (RT-qPCR) E ANÁLISE FILOGENÉTICA.***

ANAPOLINO MACEDO DE OLIVEIRA

ORIENTADOR: PROF. DR. CRISTIANO BARROS DE MELO

TESE DE DOUTORADO EM CIENCIAS ANIMAIS

PUBLICAÇÃO: 184D/2017

**BRASÍLIA - DF
MARÇO DE 2017**

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

ALAGOAS VESICULOVÍRUS: VALIDAÇÃO DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (RT-qPCR) E ANÁLISE FILOGENÉTICA. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2017, 90 p. Tese de Doutorado.

Documento formal, autorizando reprodução desta tese de doutorado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor e seu orientador reservam para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta tese de doutorado pode ser reproduzida sem a orientação por escrito do autor ou do seu orientador. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

OLIVEIRA, Anapolino Macedo. *Alagoas Vesiculovírus: validação da reação em cadeia da polimerase (RT-qPCR) e análise filogenética.* Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2017. 90p. Tese de Doutorado em Ciências Animais – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2017.

1. Estomatite Vesicular. 2. Validação. 3. PCR

4. Filogenia I. Melo, C II. Título

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

*ALAGOAS VESICULOVÍRUS: VALIDAÇÃO DA REAÇÃO EM CADEIA
DA POLIMERASE (RT-qPCR) E ANÁLISE FILOGENÉTICA.*

ANAPOLINO MACEDO DE OLIVEIRA

TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA AO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS ANIMAIS, COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO
GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS ANIMAIS.

APROVADA POR:



Prof. Cristiano Barros de Melo, Doutor (Universidade de Brasília - UnB)

(ORIENTADOR)



Eng. Caetano Júnior, Doutor (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA)



Marcelo Fernandes Camargos, Doutor (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA)



Prof. Bergmann Moraes Ribeiro, Doutor (Universidade de Brasília - UnB)



Prof. Romulo Cerqueira Leite, Doutor (Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG)

Brasília/DF, 13 de março de 2017

DEDICATÓRIA

A meus pais, que agora já não estão em nosso plano, agradeço, peço a benção e dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, agradeço a Deus por tudo que me tem concedido na vida.

A minha família, irmãos, sobrinhos e cunhado, pelo carinho e apoio dedicado a conclusão deste trabalho.

Ao Professor Cristiano Barros de Melo, meus agradecimentos pela amizade e valiosa orientação neste estudo.

Ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, pela oportunidade de realização do curso.

Ao Laboratório Nacional Agropecuário em Minas Gerais (Lanagro-MG), representados pelos colegas e grandes amigos, Ricardo Aurélio Pinto Nascimento e Pedro Moacir Pinto Coelho Mota.

A equipe do laboratório de virologia do Lanagro-PA, Luanda, Fernanda, René e ao coordenador, Dr. Airton, meus agradecimentos pelo completo apoio para realização do estudo.

A equipe do laboratório de virologia do Lanagro-PE, em especial, ao colega e grande irmão, Cid Aristóteles Alencar.

Aos colegas do Laboratório de Diagnóstico de Doenças Virais do Lanagro-MG, Isabela, Aline Barbosa, Valdenia, Fernanda, Talita. Especial agradecimento à velha guarda, representada pelo grande Marcelão, Aládio, Anselmo, Marconi, Petrina, Jacqueline, e claro, Lucília e Angélica.

A Tatiana Flávia Pinheiro de Oliveira, minha companheira, pela convivência, ajuda, e incentivo para a realização do trabalho.

A Livinha, que todos sabemos estar vivendo em um lugar muito bonito, meu muitíssimo obrigado.

Ao Laboratório de Biologia Molecular do Lanagro-MG, representado pelo Antônio Augusto Fonseca Júnior e por sua valiosa ajuda para que este trabalho se realizasse. Agradecimentos especiais a Ana Cláudia, Micael, Mariana Sales, Ana Paula, e ao pequeno e grande colega, Mateus Laguardia.

A todos os colegas do Lanagro-MG que me ajudaram a realizar este trabalho, em especial a toda equipe do preparo de material, preparo de meios, setor de protocolo e da informática.

Aos meus amigos de Goiânia, Ivan, Pedro, Marco Aurélio e também, aos meus colegas da Escola de Veterinária-1984.

ÍNDICE

Página

LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABELAS	X
LISTA DE ABREVIATURAS	XII
RESUMO	XIII
ABSTRACT	XIV
CAPITULO 1	1
1. INTRODUÇÃO	1
2. PROBLEMÁTICA E RELEVÂNCIA	2
3. OBJETIVOS	3
4. REVISÃO DE LITERATURA	3
4.1 História	3
4.2 Estomatite Vesicular no Brasil	4
4.3 Agente	6
4.4 Ciclo replicativo	7
4.5 Trasmisão	8
4.6 Diagnóstico	9
4.7 Diagnóstico Molecular	10
4.8 Filogenia	13
5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	15
CAPITULO 2 – Desenvolvimento e validação de RT-qPCR para detecção do vírus da estomatite vesicular – <i>Alagoas vesiculovirus</i>	21
RESUMO	21
ABSTRACT	22
1. INTRODUÇÃO	23
2. MATERIAL E MÉTODOS	24
2.1 Local do estudo	24
2.2 Vírus, culturas e amostras clínicas	24
2.3 Titulação viral	25
2.4 Extração do RNA	25
2.5 RT-qPCR	26
2.5.1 Iniciadores e sondas	26
2.5.2 Otimização da RT-qPCR	28
2.6 Vírus trabalho e contaminação das amostras	28
2.6.1 Vírus trabalho	28
2.6.2 Contaminação das amostras	28
2.7 Sensibilidade analítica (LD) e eficiência	29
2.8 Especificidade analítica	29
2.9 Verificações de desempenho	29
2.9.1 Verificação de desempenho das amostras de epitélios contaminadas	30
2.9.1.1 Repetitividade	30
2.9.1.2 Reprodutibilidade	30
2.9.2 Verificação de desempenho em amostras clínicas	30
2.9.2.1 Repetitividade com amostras clínicas	31
2.9.2.2 Reprodutibilidade com amostras clínicas	31
2.10 Análise de dados	31

2.11 Análise de concordância entre RT-qPCR e RT-PCR a partir de amostras clínicas	32
2.11.1 Amostras	32
2.11.2 Análise de concordância	32
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
3.1. RT-qPCR	34
3.1.1 Otimização	34
3.2 Titulações virais, sensibilidade analítica e eficiência	35
3.3 Especificidade analítica	40
3.4 Verificação de desempenho das amostras de epitélios contaminados	41
3.4.1 Verificação das RT-qPCRs para os RNAs do AV-BR 64	41
3.4.2 Verificação das RT-qPCRs para os RNAs do AV-PF	45
3.4.3 Verificação das RT-qPCRs para os RNAs do AV-CTD	48
3.5 Verificações de desempenho das amostras de epitélios contaminadas nos equipamentos Roche LC 480 e Biorad CFX 96 – C1000	50
3.5.1 Verificação das RT-qPCRs para os RNAs do AV-BR 64 nos equipamentos Roche LC 480 e Biorad CFX 96 – C1000	50
3.5.2 Verificação das RT-qPCRs para os RNAs do AV- PF nos equipamentos Roche LC 480 e Biorad CFX 96 – C1000	53
3.5.3 Verificação das RT-qPCRs para os RNAs do AV- CTD nos equipamentos Roche LC 480 e Biorad CFX 96 – C1000	54
3.6 Verificações de desempenho das amostras clínicas	58
3.7 Análise de concordância entre RT-qPCR e RT-PCR a partir de amostras clínicas.	62
4 CONCLUSÕES	64
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
CAPITULO 3 – Análise filogenética do Alagoas vesiculovírus, obtido de amostras isoladas em laboratórios oficiais do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.	70
RESUMO	70
ABSTRACT	71
1. INTRODUÇÃO	72
2. MATERIAL E MÉTODOS	73
2.1 Local do estudo	73
2.2 Amostras	73
2.3 Extração do RNA	75
2,4 Iniciadores e RT-PCR	75
2.5 Purificações do DNA a partir do gel	76
2.6 Sequenciamento	77
2.7 Precipitações, purificação dos produtos e sequenciamento	77
2.8 Análises filogenéticas	78
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
4. CONCLUSÕES	87
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Curva de amplificação da RT-qPCR para o AV- BR 64	36
Figura 2 - Curva padrão da RT-qPCR para o AV- BR 64.	37
Figura 3 Curva de amplificação da RT-qPCR para AV- PF.	38
Figra 4 - Curva padrão da RT-qPCR para o AV- PF.	38
Figura 5 – Curva de amplificação da RT-qPCR para o AV- CTD.	39
Figura 6 - Curva padrão RT-qPCR para o AV- CTD.	40
Figura 7 - Curva de amplificação da RT-qPCR para ensaio de especificidade analítica, mostrando a amplificação apenas do controle positivo do Alagoas vesiculovirus.	41
Figura 8 – Árvore filogenética baseada nas sequências do gene da fosfoproteína (P) dos vesiculovírus construída usando programa MEGA 6.0, método Neighbor-joining com 1000 replicatas de bootstrap e modelo K2.	79
Figura 9 - Árvore filogenética baseada nas sequências do gene da fosfoproteína (P) do Alagoas vesiculovírus, construída usando o programa MEGA 6.0, método Neighbor-joining com 1000 replicatas de bootstrap e modelo K2. Somente valores > 70% são mostrados.	81
Figura 10 - Árvore filogenética baseada nas sequências do gene da fosfoproteína (P) do Alagoas vesiculovírus, construída usando programa MEGA 6.0, método da verossimilhança (ML) com 1000 replicatas de bootstrap e modelo K2. Somente valores > 70% são mostrados.	82
Figura 11 - Distribuição dos focos de estomatite vesicular por grupo.	83
Figua 12 - Focos de estomatite vesicular grupo B	84

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Sequência dos iniciadores, sondas e tamanho dos produtos reações da RT-q PCR para o Alagoas vesiculovirus.	27
Tabela 2 – Avaliação dos iniciadores para o Alagoas vesiculovirus	28
Tabela 3 - Sensibilidade analítica da RT-qPCR para o AV- BR 64	36
Tabela 4 - sensibilidade analítica da RT-qPCR para o AV- PF	37
Tabela 5 - sensibilidade analítica da RT-qPCR para o AV- CTD	39
Tabela 6 - Valores de Cts das RT-qPCRs com RNA do AV- BR 64.	42
Tabela 7 - Análise de variância, RT-qPCR para o AV- BR 64 (Repetitividade)	43
Tabela 8- Incerteza da medição. RT-qPCR para o AV- BR 64 (Repetitividade)	43
Tabelas 9- Componentes da variação, RT-qPCR para o AV- BR 64 (Repetitividade)	43
Tabela 10- Análise de variância, RT-qPCR para o AV- BR 64 (reprodutibilidade)	44
Tabela 11 Incerteza da medição, RT-qPCR para AV- BR 64 (reprodutibilidade)	44
Tabela12-Componentes da variação, RT-qPCR para o AV- BR-64 (reprodutibilidade)	44
Tabela 13 - Valores de Cts das RT-qPCRs, frente RNA do AV- PF	45
Tabela 14- Análise de variância, RT-qPCR para o AV- PF (Repetitividade)	42
Tabela 15- Incerteza da medição. RT-qPCR para o AV- PF (Repetitividade)	46
Tabela 16- Componentes da variação, RT-qPCR para o AV- PF (Repetitividade)	46
Tabela 17- Análise de variância, RT-qPCR para o AV- PF (reprodutibilidade)	47
Tabela 18- Incerteza da medição, RT-qPCR para o AV- PF (reprodutibilidade)	47
Tabelas 19- Componentes da variação, RT-qPCR para o AV- PF (reprodutibilidade)	47
Tabela 20- Valores de Cts das RT-qPCRs, frente RNA do AV- CTD.	48
Tabela 21- Análise de variância, RT-qPCR para o AV- CTD (Repetitividade)	49
Tabela 22- Incerteza da medição. RT-qPCR para o AV- CTD (Repetitividade)	49
Tabela 23- Componentes da variação, RT-qPCR para o AV- CTD (Repetitividade)	49
Tabela 24- Análise de variância, RT-qPCR para o AV- CTD (reprodutibilidade)	50
Tabela 25- Incerteza da medição, RT-qPCR para o AV- CTD (reprodutibilidade)	50
Tabela 26- Componentes da variação, RT-qPCR para o AV- CTD (reprodutibilidade)	50
Tabela 27- Valores de Cts das RT-qPCRs com o RNA do AV BR 64 - Roche LC 480 e Biorad CFX 96 – C1000	51
Tabela 28- Análise de variância, RT-qPCR para o AV- BR 64 - Roche LC 480 e Biorad CFX 96 – C1000	52
Tabela 29- Incerteza da medição, RT-qPCR para o AV- BR 64 - Roche LC 480 e Biorad CFX 96 – C1000	52

Tabelas 30- Componentes da variação, RT-qPCR para o AV- BR 64 - Roche LC 480 e Biorad CFX 96 – C1000	52
Tabela 31- Valores de Cts das RT-qPCRs, frente RNA do AV- PF - Roche LC 480 e Biorad CFX 96 – C1000	53
Tabela 32- Análise de variância, RT-qPCR para o AV- PF - Roche LC 480 e Biorad CFX 96 – C1000	54
Tabela 33- Incerteza da medição, RT-qPCR para o AV- PF - Roche LC 480 e Biorad CFX 96 – C1000	54
Tabelas 34- Componentes da variação, RT-qPCR para o AV- PF- Roche LC 480 e Biorad CFX 96 – C1000	54
Tabela 35- Valores de Cts das RT-qPCRs, frente RNA do vírus AV- CTD - Roche LC 480 e Biorad CFX 96 – C1000	55
Tabela 36- Análise de variância, RT-qPCR para o vírus AV- CTD - Roche LC 480 e Biorad CFX 96 – C1000	55
Tabela 37- Incerteza da medição, RT-qPCR para o vírus AV- CTD - Roche LC 480 e Biorad CFX 96 – C1000	56
Tabelas 38- Componentes da variação, RT-qPCR para o AV- CTD - Roche LC 480 e Biorad CFX 96 – C1000	56
Tabela 39- Valores de Cts das RT-qPCRs, frente RNA de Alagoas vesiculovirus em amostras clínicas.	59
Tabela 40- Análise de variância, RT-qPCR para o Alagoas vesiculovirus em amostras clínicas (Repetitividade)	59
Tabela 41- Incerteza da medição. RT-qPCR para o Alagoas vesiculovirus em amostras clínicas (Repetitividade)	60
Tabela 42- Componentes da variação, RT-qPCR para o Alagoas vesiculovirus em amostras clínicas (Repetitividade)	60
Tabela 43- Análise de variância, RT-qPCR para o Alagoas vesiculovirus em amostras clínicas (reprodutibilidade)	61
Tabela 44- Incerteza da medição, RT-qPCR para o Alagoas vesiculovirus em amostras clínicas (reprodutibilidade)	61
Tabelas 45- Componentes da variação, RT-qPCR para o Alagoas vesiculovirus em amostras clínicas (reprodutibilidade)	61
Tabela 46- Resultado da concordância entre a RT-qPCR e RT-PCR	62
Tabela 47 - relação de amostras/ano, laboratório e município de isolamento	74
Tabela 48- Iniciadores do gene da fosfoproteína do <i>Alagoas vesiculovirus</i>	76
Tabela 49 - Distância genética inter e intragrupos do Alagoas Vesiculovirus	85

LISTA DE ABREVIATURAS**SIGLAS**

MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento
CGAL	Coordenação Geral de Apoio Laboratorial
AVV	Alagoas vesiculovirus
AV-BR 64	Alagoas vesiculovirus BR-64
AV-PF	Alagoas vesiculovirus Porto Franco
AV-CTD	Alagoas vesiculovirus Custódia
IVV	Indiana vesiculovirus
CVV	Cocal vesiculovirus
NJVV	New Jersey vesiculovirus
TCID ₅₀	Tissue culture infectious dosis 50%
LANAGRO	Laboratório Nacional Agropecuário
PANAFTOSA	Centro Pan-americano de Febre Aftosa
UnB	Universidade de Brasília
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
1d	Primeiro dia
2d	Segundo dia
3d	Terceiro dia
EV	Estomatite Vesicular
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay

ALAGOAS VESICULOVÍRUS - VALIDAÇÃO DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (RT-qPCR) E ANÁLISE FILOGENÉTICA.

Anapolino Macedo de Oliveira, Cristiano Barros de Melo

RESUMO

A Estomatite Vesicular é uma enfermidade infecciosa de origem viral, que acomete animais domésticos ungulados e biungulados, principalmente bovinos, equinos, suínos, e classificada como uma zoonose. A enfermidade é caracterizada pelo desenvolvimento de lesões vesiculares na língua, boca, gengiva, lábios, região coronária dos cascos e tetas (Rodrigues et al. 2007). O vírus pertence à família *Rhabdoviridae*, ordem *Mononegavirales*, gênero *Vesiculovirus*. Quatro espécies do gênero *Vesiculovirus* são responsáveis pelos surtos de estomatite: *New Jersey*, *Indiana*, *Cocal* e *Alagoas vesiculovirus*. Estes vírus eram anteriormente classificados em dois sorotipos: *New Jersey* e *Indiana*, sendo que o *Indiana* incluía os subtipos 1, 2 (*Cocal*) e 3 (*Alagoas*). O objetivo do presente estudo foi desenvolver e realizar ensaios de validação de uma RT-qPCR(s) para a detecção do RNA do *Alagoas vesiculovirus*, considerando os parâmetros de sensibilidade e especificidade analítica, desempenho analítico (critérios de repetitividade, reprodutibilidade) e incerteza da medição. Os parâmetros da validação mostraram coeficientes de variação (CV) baixos e equivalentes aos encontrados em outros trabalhos de validação, indicando que os ensaios apresentaram excelente repetitividade para cada analista, e reprodutibilidade avaliada entre os analistas e equipamentos. Além disso, o estudo teve como objetivo realizar o sequenciamento de amostras de *Alagoas vesiculovirus*, recebidas para diagnóstico e pertencente ao banco de cepas dos Laboratórios Nacionais Agropecuários. As árvores filogenéticas geradas mostraram que os vírus foram agrupados em três grupos: o grupo “A” formado pelo isolado do *Alagoas vesiculovirus* isolado por Andrade e colaboradores em 1964; o grupo “B” por isolados de estados da região nordeste e o grupo “C” por isolados do estado da Bahia, Goiás e Tocantins.

Palavras-Chave: *Alagoas vesiculovirus*, filogenia, reação em cadeia da polimerase, sequenciamento, validação.

ALAGOAS VESICULOVÍRUS - VALIDATION OF POLYMERASE CHAIN REACTION (RT-qPCR) AND PHILOGENETIC ANALYSIS.

Anapolino Macedo de Oliveira, Cristiano Barros de Melo

ABSTRACT

Vesicular stomatitis is an infectious disease of viral origin that affects ungulate and biungulate domestic animals, mainly cattle, horses, pigs, and classified as a zoonosis. The disease is characterized by the development of vesicular lesions in the tongue, mouth, gum, lips, coronary region of hooves and teats (Rodrigues et al. 2007). The virus belongs to the family *Rhabdoviridae*, order *Mononegavirales*, genus *Vesiculovirus*. Four species of the genus *Vesiculovirus* are responsible for outbreaks of stomatitis: New Jersey, Indiana, Cocal and *Alagoas vesiculovirus*. These viruses were previously classified into two serotypes: New Jersey and Indiana, and Indiana included subtypes 1, 2 (Cocal) and 3 (Alagoas). The objective of the present study was to develop and perform validation tests of an RT-qPCR (s) for *Alagoas vesiculovirus* RNA detection, considering the parameters of sensitivity and analytical specificity, analytical performance (repeatability criteria, reproducibility) and measurement. The validation parameters showed low coefficients of variation (CV) and equivalent to those found in other validation works, indicating that the tests presented excellent repeatability for each analyst, and reproducibility evaluated among the analysts and equipment. In addition, the study aimed to perform the sequencing of samples from *Alagoas vesiculovirus*, received for diagnosis and belonging to the strain bank of National Agricultural Laboratories. The generated phylogenetic trees showed that the viruses were grouped into three groups: the "A" group formed by the *Alagoas vesiculovirus* isolate isolated by Andrade et al. In 1964; The group "B" by isolates from states of the northeast region and group "C" by isolates from the state of Bahia, Goiás and Tocantins.

Key words: Validation, polymerase chain reaction, *Alagoas vesiculovirus*, sequencing, phylogeny.

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

A Estomatite Vesicular é uma enfermidade infecciosa de origem viral, que acomete animais domésticos ungulados e biungulados, principalmente bovinos, equinos, suínos, e classificada como uma zoonose. A enfermidade é caracterizada pelo desenvolvimento de lesões vesiculares na língua, boca, gengiva, lábios, região coronária dos cascos e tetas (Rodrigues et al. 2007). A Estomatite Vesicular é considerada uma zoonose e sua transmissão ocorre geralmente entre pessoas que mantiveram contatos com animais infectados (DE Stefano et al. 2002).

Nos bovinos e suínos, a doença clínica é semelhante da Febre Aftosa e por isso ela está incluída no Programa Nacional de Prevenção e Erradicação da Febre Aftosa como a principal enfermidade vesicular que necessita de diagnóstico diferencial (BRASIL, 2009).

O vírus da Estomatite Vesicular pertence à família *Rhabdoviridae*, gênero *Vesiculovirus* e encontra-se amplamente distribuído nas Américas, estando até 2012, catalogada como integrante da lista de doenças da OIE e citada no Código Zoossanitário Internacional, da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE, 2015).

As primeiras citações indicam que a Estomatite Vesicular ocorreu no século XIX no sudeste dos EUA da América (EUA) e na América Central. Em 1862, a enfermidade foi relatada em equinos durante a guerra civil americana (Rodrigues et al. 2007).

No Brasil, o primeiro isolamento foi feito em 1964 a partir de amostras de epitélio de equinos oriundos do estado de Alagoas (Andrade et al. 1980) e posteriormente, surtos foram relatados nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Ceará, Rio Grande do Norte, Pernambuco, Paraíba, Piauí, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Tocantins, Paraná e Santa Catarina, BRASIL (2012).

A doença é responsável por determinar perdas de ordem socioeconômica, uma vez que os rebanhos acometidos apresentam queda na produção de leite e carne (Bridges et al. 1997). Acrescenta-se que, a adoção das ações de defesa sanitária como a proibição do trânsito animal nas áreas do foco, a interdição de propriedades e o gasto

financeiro com medicamentos para o tratamento de complicações secundárias, determinam aumento do prejuízo aos produtores rurais, EFSA (2012).

Os serviços laboratoriais de diagnóstico devem responder com rapidez e acurácia às demandas do serviço oficial de defesa sanitária animal. O diagnóstico da Estomatite Vesicular é realizado com o isolamento viral e identificação de seus antígenos a partir de líquido de vesículas e epitélios e a pesquisa de anticorpos no soro dos animais infectados (OIE, 2012). No entanto, problemas de ordem pré-analítica como o encaminhamento de amostras conservadas ao laboratório de diagnóstico com celeridade, surgem pela característica continental do Brasil, e podem muitas vezes determinar a perda de seu valor diagnóstico.

Métodos de identificação dos agentes virais são considerados clássicos, porém demandam laboratórios e equipamentos especializados. O diagnóstico baseado na pesquisa de anticorpos requer cautela na interpretação de resultados pela possibilidade do aparecimento de reações cruzadas entre os sorotipos virais.

Métodos de biologia molecular como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e o sequenciamento gênico constituem elementos amplamente empregados no diagnóstico das enfermidades virais. Esses métodos necessitam de critérios de validação para serem disponibilizados como ferramentas seguras na execução de diagnóstico e na epidemiologia molecular dos agentes virais

2 PROBLEMÁTICA E RELEVÂNCIA

A Estomatite Vesicular (EV) é uma enfermidade de caráter viral clinicamente semelhante à Febre Aftosa em suínos e bovinos, cuja importância econômica está relacionada à queda na produção dos animais, restrições ao mercado e do trânsito de animais.

No Brasil, A EV é endêmica em algumas regiões e, de 2010 a 2014 foram notificados, para a OIE, 129 focos, distribuídos nos estados das regiões norte, nordeste, centro-oeste e sudeste. Nesses focos, o principal agente envolvido foi o Alagoas vesiculovírus, anteriormente classificado como vírus da estomatite vesicular Indiana 3.

O Programa Nacional de Erradicação da Febre Aftosa prevê o atendimento imediato, pelo Serviço de Defesa Sanitária Animal, a qualquer suspeita de enfermidade vesicular com a colheita amostras para diagnóstico laboratorial. Ensaio

laboratoriais destinados ao diagnóstico das enfermidades animais estão relacionados no Manual de Testes Diagnósticos e Vacinas para Animais Terrestres (2012) da Organização Mundial de Saúde Animal que contempla as enfermidades dos mamíferos e aves. Atualmente, o MAPA conta com uma unidade laboratorial nível 4- OIE, responsável pelo serviço de diagnóstico de enfermidades vesiculares no Brasil. Por sua grande variabilidade genética, os vesiculovírus responsáveis pelo surgimento de focos de estomatite vesicular nos países dos continentes americanos necessitam de estudos contínuos visando a sua caracterização e busca de métodos de diagnóstico rápidos e sensíveis.

A credibilidade dos laboratórios está cada vez mais relacionada ao atendimento às normas internacionais que estabelecem requisitos gerenciais e técnicos para ensaios laboratoriais tecnicamente válidos (ABNT NBR ISO/IEC17025).

3. OBJETIVOS

A biologia molecular é uma ferramenta de grande importância para o diagnóstico das enfermidades dos animais e, neste sentido, o objetivo do presente estudo é desenvolver e validar uma RT-qPCR voltada ao diagnóstico da Estomatite Vesicular. Constitui também objeto do trabalho, a caracterização gênica de amostras do *Alagoas Vesiculovirus* isoladas em laboratórios da rede oficial do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, por ensaios de sequenciamento gênico.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1 História

A estomatite vesicular teve seus primeiros relatos no continente americano a partir da metade do século XIX. O clássico trabalho de Hanson (1952) sobre a história da Estomatite Vesicular no mundo aponta que surtos da doença foram relatados na região leste dos Estados Unidos nos anos de 1801, 1802 e 1817, acometendo o rebanho bovino, suínos e cavalos.

Em 1862, surtos de estomatite incapacitaram mais de 4.000 cavalos de serviço durante a guerra civil americana. As principais epidemias de Estomatite Vesicular nos Estados Unidos ocorreram em bovinos e equinos em 1889, 1906, 1916, 1926, 1937, 1949, 1982 e 1995, (Letchworth, et. al., 1999; Schmitt, B., 2002).

Ainda segundo Hanson (1952), a primeira citação da estomatite vesicular no continente europeu data de 1915, durante a primeira guerra mundial, quando veterinários franceses observaram a presença de vesículas na língua e intensa salivação, em cavalos, oriundos dos Estados Unidos e Canadá.

Os primeiros casos de estomatite vesicular no continente africano foram relatados por Theiler (1901) em que descreveu o surto da doença em mulas no ano de 1897, na província de Transvaal, África do Sul, e ainda nesse país, a doença causou graves surtos no gado bovino nos anos de 1934, 1938 e 1943.

O surto nos Estados Unidos de 1916 acometeu um grande número de equinos, mulas e bovinos, porém a identificação do agente somente foi realizada em 1926 no estado de Indiana, e o vírus denominado, vírus da Estomatite Vesicular de Indiana (VSIV). Um ano após, um vírus isolado de um bovino no estado de Nova Jersey foi denominado de vírus da Estomatite Vesicular New Jersey (VSNJ) (Rodrigues et al. 2007). Deste modo, os dois principais sorotipos foram classificados como New Jersey e o Indiana, sendo o último conhecido como Indiana 1 (protótipo original) (Schmitt, 2002; Rodriguez et al. 2002; Sepúlveda et al. 2007; Rodrigues et al. 2007).

O New Jersey vesiculovirus foi o responsável por cerca de 80 % dos casos registrados nos EUA e no México ocorrido nas últimas duas décadas do século passado. (Rodriguez et al. 2000; Rainwater et al. 2007).

Velazquez-Salinas et al. (2014) estudaram isolados circulantes nos México e Estados Unidos, no período de 2005 a 2012. Eles classificaram um novo grupo emergente de vírus da estomatite vesicular New Jersey de origem Mexicana que determinou surtos nos Estados Unidos.

A doença assume o caráter endêmico no norte da América do Sul, América Central, sul do México e, esporadicamente, no norte desse último e no sudoeste dos Estados Unidos, (DE Stefano et al. 2002; Letchworth et al. 1999).

Os países da América do Sul como Venezuela, Colômbia, Equador e Peru ao sul do México, a doença é endêmica e ocorre na forma de surtos anuais e de caráter sazonal, associada à transição do período chuvoso para o seco (Rodriguez et al. 2002).

4.2 – A Estomatite Vesicular no Brasil

O primeiro isolamento do vírus da Estomatite Vesicular no Brasil foi realizado no estado de Alagoas, a partir de amostras de equinos. No episódio, o vírus

isolado foi classificado como Indiana 3, atual *Alagoas Vesiculovirus*, por apresentar diferenças antigênicas em relação ao sorotipo Indiana 1 e Indiana 2, atualmente classificados como *Indiana e Cocal vesiculovirus* (Andrade et al. 1980).

Pustiglione Netto et al. (1967) no município de Rancharia-SP, isolou o primeiro vírus Cocal no Brasil, êxito também alcançado por Arita & Arita (1983), em amostras de equinos oriundos do município de Ribeirão Preto-SP, no ano de 1979.

Alagoas vesiculovirus foram isolados por Rocha Araújo et al. em 1977 no município de Araçuaí, em Minas Gerais, por Alonso Fernandes & Sondal (1985), em Sergipe, e por Pituco et al. em 1989 na região do Vale do Paraíba, em São Paulo.

Kotait (1990), utilizando a prova de imunodifusão com antígeno produzido por *Alagoas vesiculovirus*, encontrou a presença de anticorpos em 1,64% das amostras de soros bovinos e 4,36% em amostras de soros equinos, oriundas de um surto no Vale do Paraíba no ano de 1986.

Pesquisa de anticorpos dirigidos para o *Alagoas vesiculovirus* em amostras de soro de bovinos de corte do estado de São Paulo foi realizada por DE Stefano et al. (2003), que encontraram em provas de soroneutralização títulos variando de 1,9 a 2,8 para o vírus Indiana 1 em 2,5% das 1.099 amostras analisadas.

Inzaurrealde (1997) realizou estudo com 5.200 resultados de testes laboratoriais para Estomatite Vesicular de amostras recebidas pelo Centro Panamericano de Febre Aftosa durante o período de 1964 e 1996. O autor descreveu o comportamento endêmico da enfermidade, apontando que, o *Cocal vesiculovirus* tem sua ocorrência em períodos com intervalo de 10 anos e que, o *Alagoas vesiculovirus* mantém-se presente, de maneira ativa, em vários estados brasileiros.

O *Indiana vesiculovirus* é considerado exótico no Brasil. No entanto, existe a necessidade da investigação epidemiológica da doença uma vez que são observadas reações sorológicas cruzadas entre os três sorotipos (BRASIL, 2012).

No Brasil, os focos de estomatite têm sido atribuídos ao *Cocal e Alagoas vesiculovirus*, sendo o primeiro responsável por focos nos estados de Santa Catarina e Paraná em 1998 e o *Alagoas* responsável por grande parte dos focos da região nordeste do Brasil (Pauszek et al. 2011).

Durante o período de 1997 a 2011, foram registrados pelo serviço veterinário brasileiro 164 focos de Estomatite Vesicular causados pelo *Alagoas vesiculovirus* e 219 pelo *Cocal vesiculovirus*, sendo este último ligado a ocorrências nos estados do Paraná e de Santa Catarina. No período de 2007 a 2011, o *Alagoas*

vesiculovirus estava relacionado a focos nos estados da região Sudeste, Centro-Oeste e do Nordeste (BRASIL, 2012).

Entre 2012 e 2017, focos da doença foram registrados em estados das regiões centro-oeste, nordeste e sudeste do país.

Cargnelutti et al. (2014) descreveram surtos de estomatite vesicular em bovinos e equinos nos estados da Paraíba e Rio Grande do Norte. O sequenciamento e a análise filogenética identificaram os isolados como pertencente à espécie *Alagoas vesiculovirus*, e os agruparam juntamente com outros registrados no sudeste e nordeste brasileiro.

4.3 Agente

O vírus da Estomatite Vesicular pertence à família *Rhabdoviridae*, gênero *Vesiculovirus*, contando com quatro espécies de interesse: New Jersey, Indiana, Cocal e Alagoas vesiculovirus (ICTV- 2015).

Pelo menos 28 vesiculovírus podem infectar vertebrados e invertebrados (Wunner et al. 1995) e, de acordo com Letchworth, et al. 2002, o *New Jersey*, o *Indiana*, o *Cocal*, o *Alagoas*, o *Chalchaqui*, o *Chandipura*, o *Isfahan* e o *Piry* podem infectar animais domésticos e o homem.

As partículas virais em forma de bastão medem de 100 nm a 430 nm de extensão por 40 nm a 100 nm de diâmetro. Os virions possuem uma estrutura helical interna (ribonucleoproteína-RPN) e, como membros da ordem *Mononegavirales*, possuem um RNA de fita simples de sentido negativo. As proteínas N, P e L envolvem o RNA viral constituindo o chamado ribonucleocapsídeo, e a proteína da matriz (M) forma a base estrutural das partículas (Rodrigues et al. 2007).

O envelope viral é derivado da membrana da célula hospedeira e contém a glicoproteína G, uma importante proteína transmembrana que medeia o reconhecimento e fusão celular e induz a produção de anticorpos sorotipo-específicos (Martinez et al. 2003).

O genoma do vírus possui de 11.000 a 12.000 nucleotídeos (nt) e uma organização conservada. Possui uma sequência leader não traduzida na extremidade 3' de 40 a 50 nt, seguida por sinal de iniciação da transcrição e pelos genes N, P, M, G e L. Sequências intergênicas separam estes genes, e próximo à extremidade 5', encontramos uma região trailer de 40 a 50nt. As regiões leader, trailer e as intergênicas desempenham

papel na regulação das etapas de transcrição e replicação do genoma viral (Rodrigues et al. 2007).

O RNA está envolvido por aproximadamente 1.200 cópias da nucleoproteína (N) e o nucleocapsídeo contém 466 cópias da fosfoproteína (P) e 50 cópias da polimerase (L). A polimerase viral não é ativa sobre o RNA sem que ele esteja envolvido pela proteína “N” e a fosfoproteína é responsável pela ligação da proteína “L” ao complexo RNA-nucleoproteína (Douglas et al. 2013).

Aproximadamente 1.200 a 1.800 cópias da proteína da matriz “M” são encontradas na partícula viral. A proteína da matriz está condensada junto com o nucleocapsídeo para formar o complexo helical que confere a forma de bastão as partículas. O envelope viral contém cerca de 300 a 400 cópias da glicoproteína “G”, responsável pela ligação e penetração do vírus na célula hospedeira (Douglas et al. 2013).

4.4 Ciclo Replicativo

O ciclo replicativo tem início com a ligação da proteína G do vírus presente no envelope viral com membrana celular e posterior formação de vesícula endocítica. O complexo ribonucleoproteína é então liberado no citoplasma e é iniciada a transcrição do RNA viral por ação da polimerase viral.

A transcrição é regulada por um mecanismo em que o nível de expressão de cada gene é determinado por sua distância em relação a um promotor único localizado na extremidade 3'. Cada RNA mensageiro é monocistrônico e possui uma estrutura cap na extremidade 5' e uma cauda poli A na região 3'. Sequências conservadas das regiões intergênicas possuem sinais para terminação da transcrição, adição de cap e poliadenilação. A sequência leader da extremidade 3' não recebe cap nem a cauda poli A. Ela é transportada para o núcleo da célula hospedeira, inibindo a transcrição de genes celulares (Rodrigues et al. 2007).

O transcrito leader é seguido pelo mRNA da proteína P que recebe o cap do complexo da polimerase viral. Na extremidade dos cinco genes, encontra-se a sequência 5'-AGUUUUUUUCAUA-3' que sinaliza para o fim da transcrição e poliadenilação do mRNA (Rodrigues et al. 2007).

Seguido a tradução das proteínas virais, o complexo polimerase inicia a etapa de replicação do genoma viral, produzindo cópias de RNA senso positivo que irão

se conjugar com a proteína N e servir de molde para a replicação do RNA com senso genômico.

As novas fitas negativas podem participar nas etapas da transcrição ou da replicação, ou mesmo serem encapsidadas junto com a proteína M nas novas partículas virais.

A proteína glicoproteína G é produzida no retículo citoplasmático e inserida na membrana na forma de trímeros. Os trímeros juntamente com a ribonucleoproteína formam os novos virions que adquirem o envelope lipoproteico após o brotamento (Rodrigues et al. 2007; Reis Jr et al. 2007).

4.5 Transmissão

Nos Estados Unidos, estudos genéticos, ambientais e sobre a influencia do hospedeiro sobre a ocorrência do vírus foram realizados por Mead et al. (2000) e Rodrigues, (2002), porém os fatores responsáveis pelos ciclos epidêmicos da estomatite permanecem não completamente esclarecidos.

No Brasil, poucos estudos foram realizados sobre a epidemiologia da Estomatite Vesicular, e segundo Inzaurre (1997), a doença possui um comportamento epidemiológico contraditório e que o padrão de sazonalidade de ocorrência dos surtos, indica o envolvimento de vetores na transmissão da doença.

O vírus da estomatite vesicular pode infectar várias espécies de hospedeiros como mamíferos domésticos, insetos e pássaros e também selvagens, como suínos selvagens (*sus scrofa*), Rodrigues et al. 2007.

A estomatite vesicular é uma zoonose que cursa com sintomas brandos, incluindo febre, dores musculares e de cabeça, e a ocorrência em humanos está relacionada a pessoas que tiveram contatos com animais infectados, fômites e tecidos contaminados. A transmissão por aerossóis por acontecer, particularmente para pessoas que manipulam o agente viral em laboratórios (Letchworth et al. 1999).

Os mecanismos da transmissão da estomatite não são completamente esclarecidos. A transmissão mecânica, a presença de vetores e a movimentação de animais contribuem potencialmente para a disseminação da doença.

Uma vez estabelecida no rebanho, a Estomatite Vesicular é transmitida de um animal infectado para um susceptível pelo contato direto com a saliva e fluidos

vesiculares. A presença de lesões na pele e mucosas facilita a entrada do vírus no organismo animal (Howerth, 2006).

Algumas espécies de insetos são consideradas vetores biológico do vírus, e três delas, a mosca-de-areia (*Lutzomyia ssp*), a mosca-preta (*Simulium sp*) e a pernilongos (*culicoides sp*) são imputadas como transmissoras da doença (EFSA, 2012).

Mead et al. (2000) demonstraram que existe a transmissão horizontal do vírus entre moscas-preta infectadas e não infectadas, que se alimentavam de um hospedeiro não virêmico.

Embora tenha sido demonstrado que ocorra a replicação viral na mosca-preta, acredita-se que os insetos tenham a função primária de vetores mecânicos entre um animal infectado para um susceptível (Rodrigues, 2002).

4.5 Diagnóstico

Para o diagnóstico da Estomatite Vesicular são empregadas ferramentas laboratoriais para o isolamento e identificação do agente viral por métodos de inoculação de cultivos sensíveis, camundongos lactentes e ovos embrionados ou por pesquisa de seus antígenos utilizando ELISA ou fixação do complemento (OIE, 2012).

Um teste de ELISA sanduíche indireto foi padronizado por Alonso et al. (1991) para a tipificação do *New Jersey e Indiana vesiculovirus*. O teste foi dez vezes mais sensível na detecção de antígenos visando à tipificação viral do que na prova de fixação de complemento.

Allende et al. (1992) desenvolveram um ELISA para a detecção de anticorpos dirigidos para o *New Jersey e Indiana vesiculovirus*. A correlação entre o ELISA e a neutralização viral não demonstrou diferença estatística significativa entre ambos, porém o ELISA permitiu ensaiar um maior número de amostras em menor tempo do que o teste de neutralização.

A pesquisa de anticorpos para o vírus da estomatite vesicular requer a padronização de testes que sejam sensíveis e ao mesmo tempo específicos, uma vez que provas como o teste de neutralização podem mostrar reatividade cruzada na diferenciação dos sorotipos da doença. A utilização de proteínas recombinantes em testes de ELISA visa produzir ensaios com mais sensíveis e específicos, o que foi alcançado por Kweon et al. (2005) e Heo et al. (2010) na padronização de ensaio para a detecção de anticorpos para o *Indiana e New Jersey vesiculovirus*, respectivamente.

Acrescenta-se ainda, a pesquisa de anticorpos por ELISA e testes de neutralização viral, considerados métodos clássicos, porém, demandantes de tempo e de estrutura laboratorial especializada. Métodos de tecnologia molecular como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e o sequenciamento gênico vem sendo empregados no diagnóstico da doença (Nuñez et al. 1998; Sepúlveda et al. 2007).

4.6 Diagnóstico Molecular

Nos últimos anos, ensaios de PCR em tempo real tem se tornado uma valiosa ferramenta na detecção de DNA, RNA e cDNA. Esta técnica é altamente sensível e permite a simultânea amplificação e quantificação de sequências de ácidos nucleicos e, dentre outras aplicações, a análise de expressão gênica, a determinação da carga viral e a genotipagem. A detecção das sequências alvos ocorre a partir da fluorescência geradas por corantes intercalantes, iniciadores marcados com fluoróforos e pela utilização de sondas específicas (Bustin et al. 2005).

A quantificação das sequências-alvo é alcançada pela determinação do número de ciclos de amplificação requeridos para gerar o produto da PCR e o que ocorre no início da fase exponencial da reação, observada pelo cruzamento da linha do limiar de fluorescência (threshold cycle-Ct), Hoffmann et al. (2009).

A PCR multiplex tem por objetivo a detecção de dois ou mais alvos em uma mesma reação e requer o emprego de sondas específicas desenhadas para cada um deles. Ela é indicada para a avaliação de amostras que tenham pouca quantidade de matriz (Belak et al. 2007).

Vários ensaios de qRT-PCR foram desenvolvidos para a detecção de alvos das doenças vesiculares dos animais, em especialmente, para a Febre Aftosa e enfermidades que necessitam o diagnóstico diferencial (Hole et al. 2010).

O ensaio de RT-PCR baseada na amplificação específica de três importantes agentes causadores de doenças vesiculares em suínos: Febre Aftosa, Doença Vesicular dos Suínos e Estomatite Vesicular foi desenvolvido por Núñez e colaboradores (1998). Cepas de referência do *Indiana e New Jersey vesiculovirus* foram propagadas em cultivos de células BHK-21, sendo empregado o método de fenol/clorofórmio para extração do RNA. Neste trabalho, os iniciadores genotípicos específicos para as cepas de referência foram desenhados para sequências do gene L, de acordo com Feldhaus e Lesnaw (1988), resultando na amplificação específica dos segmentos alvo.

Muitos estudos da biologia molecular e análise funcional do Indiana vesiculovirus baseiam-se nas sequências depositadas no GenBank, que é um banco de dados de Nucleotídeos do NLM/NCBI, localizado no National Institutes of Health (NIH) e segundo Rodriguez et al. (2002), elas representam resultados de cepas laboratoriais multiplicadas extensivamente em cultivos celulares, as quais podem não ser representativas dos isolados de campo. Nesse estudo foram descritas as sequências completas de quatro isolados do *Indiana vesiculovirus* oriundos das Américas do Norte, Central e do Sul.

Na extração do RNA, foi empregado o método do Trizol® e para transcrição reversa, hexameros randômicos (Invitrogen, EUA) e a transcriptase reversa Superscript II RNase H®, (Invitrogen, EUA), de acordo com instruções do fabricante.

Utilizando o método do trizol, os autores encontraram a estrutura e organização conservadas, com a sequência leader de 47 nt, seguida por cinco genes – N, P, M, G, L – e uma sequência 5' trailer de 59 nt. A região mais conservada foi a do gene N seguida pelos genes M, L e G, e a mais variável a do gene P. Sequências de poliadenilação responsáveis pela parada de transcrição e de sinais de iniciação encontravam-se completamente conservadas entre os vírus estudados.

Rasmussen et al. (2005) desenvolveram um ensaio quantitativo de RT-PCR para detecção, quantificação e diferenciação do *New Jersey e Indiana vesiculovirus*, no qual a extração de RNA foi realizada pela adaptação do método baseado em sílica e sua transcrição em cDNA pelo uso de iniciadores randômicos. A região gênica estudada foi a que codifica para a polimerase viral correspondente aos nt 7017 e 7131, empregando-se iniciadores específicos para os vírus New Jersey e Indiana, na presença de duas sondas fluorescentes específicas para os sorotipos. Os produtos amplificados gerados resultaram em sinais fluorescentes específicos para ambos os alvos. A avaliação da sensibilidade apontou que o método foi capaz de detectar menos que 10 TCID₅₀/ml e similar para ambos sorotipos estudados.

Hole et al. (2006), padronizaram uma RT-PCR multiplex visando a detecção simultânea do *New Jersey, do Indiana, do Cocal e do Alagoas vesiculovirus*, com iniciadores e as sondas dirigidas para o gene L.

A especificidade analítica da RT-qPCR padronizada por Hole et al. (2006) foi avaliada frente a agentes causadores de enfermidades vesiculares (Febre Aftosa, Doença Vesicular dos Suínos, Exantema Vesicular dos Suínos (VESV), já a sensibilidade analítica foi avaliada mediante diluições seriadas dos RNAs.

O ponto de corte foi calculado mediante a avaliação de 150 amostras de tecidos negativos para a presença do vírus estudados. Dentre os resultados, de 159 amostras positivas pela prova de fixação de complemento, 156 foram detectadas pela PCR (98,1 %).

Bonutti & Figueiredo (2005) padronizaram uma RT-PCR para a detecção do gene G do *Piry*, *Carajás*, *Cocal* e *Alagoas vesiculovirus*. Para a confirmação dos resultados da RT-PCR foi necessário o desenvolvimento de uma nested PCR e o genoma do *Alagoas vesiculovirus* foi detectado em amostras clínicas de cobaias infectados com o vírus.

Sepúlveda et al. (2007) avaliaram um ensaio de RT-PCR com iniciadores que amplificaram parcialmente, o gene que codifica a proteína “P” do *New Jersey* e *Indiana vesiculovirus*. Foram analisadas 10 cepas de vírus da Estomatite Vesicular e 12 isolados de campo. O método permitiu a amplificação específica da região estudada, gerando produtos de 642 pb para o *New Jersey* e 614 pb para o *Indiana vesiculovirus*.

Fernández et al. (2008) utilizaram iniciadores dirigidos para a amplificação específica de sequências do gene L para a diferenciação de cepas *New Jersey* e *Indiana vesiculovirus*. Três iniciadores (VSV1, VSV2 e VSV3) foram empregados nas PCRs e seus produtos submetidos à análise de restrição. O par VSV1/VSV2 forneceu os melhores resultados nas PCRs gerando um produto de 110 pb, que após a digestão com a endonuclease de restrição BsmA I forneceu fragmentos de 86 e 24 pb para o *Indiana Colorado*, e de 102 e 8 pb para o *New Jersey vesiculovirus*.

A descrição da sequência completa e da organização dos vírus da Estomatite Vesicular Cocal e Alagoas foi feita por Pauszek et al. (2008), que encontraram estruturas gênicas similares aos isolados de campo do sorotipo *Indiana*. A estrutura constou de uma sequência composta de 3' leader (47 nt), seguida por cinco genes estruturais e uma sequência 5' trailer com 57 nt para o protótipo *Cocal* e 58 nt para o *Alagoas*. O tamanho do genoma foi de 11.003 nt para o *Cocal* e 11.070 para o *Alagoas*, consideradas menores que o isolados de campo do *Indiana* 1 isolados por Rodriguez et al. (2002).

Wilson et al. (2009) padronizaram a RT-PCR para amplificação do gene N, com o objetivo de diferenciar os vírus *New Jersey* e *Indiana* oriundos de focos do América Central e do Norte. Seiscentas e sessenta e duas amostras de lesões provenientes de bovinos, equinos e suínos foram avaliadas pela PCR e pelo isolamento

viral. Deste total, 403 foram identificadas como New Jersey, 56 como Indiana e 163 negativas pela PCR. O isolamento viral em cultivo celular foi alcançado em 51,6 % das amostras analisadas.

Pauszek et al. (2011) estudaram as relações antigênicas e genética de amostras de isolados virais de Estomatite Vesicular em amostras brasileiras e argentinas. Foram encontrados valores de reatividade cruzada entre os isolados do *Cocal vesiculovirus* pela prova de fixação de complemento variando de 57 % a 85 % e baixa reatividade, menor que 30 %, entre os isolados do *Alagoas vesiculovirus*. Pela prova de neutralização viral, estes valores variaram de 33 % a 47 % entre os isolados do *Cocal vesiculovirus*, e foram menores que 5 % entre as amostras do *Alagoas vesiculovirus* estudados.

Tolardo et al. (2016) desenvolveram a RT-qPCR com iniciadores dirigidos para a região conservada da glicoproteína do *Piry vesiculovirus*. Os autores relataram que o ensaio foi capaz de detectar o genoma do *Alagoas vesiculovirus* em amostras de soro de animais oriundos do foco de 2013, ocorrido no estado da Paraíba e Rio Grande do Norte.

4.7 Filogenia

Pauszek et al. (2008) realizaram o sequenciamento completo dos protótipos *Cocal* e do *Alagoas vesiculovirus* e mostraram que as proteínas C/C', duas pequenas proteínas não-estruturais, codificadas na segunda ORF do gene "P" estavam ausentes no protótipo Alagoas. A análise filogenética resultou no agrupamento do Cocal, Alagoas e Indiana em um grupo monofilético diferente do vírus New Jersey.

A análise dos genes da fosfoproteína e da glicoproteína de vírus da estomatite foi feita por Pauszek et al. (2011) a partir de isolados brasileiros e argentinos. Todos os isolados do *Cocal vesiculovirus* tiveram a orf "G" com 1539 nt e o *Alagoas vesiculovirus* 1536 nt. Para a orf "P" o tamanho foi de 795 nt para o Cocal e de 786 nt para o Alagoas vesiculovirus..

Entre outros resultados, a sequência do gene "P" evidenciou a ausência das proteínas C/C' em todos os isolados do *Alagoas vesiculovirus*, fato este que forneceu suporte para a classificação taxonômica do vírus Alagoas.

Cargnelutti et al. (2014) realizaram o sequenciamento e análise filogenética do gene "P" de vírus da Estomatite Vesicular isolados em focos nos

estados da Paraíba e do Rio Grande do Norte, no ano de 2013. Os isolados foram classificados como *Alagoas vesiculovirus* e agrupados com outros isolados brasileiros obtidos entre os anos de 1970 a 1990.

Rainwater et al. (2007) estudaram a relação filogenética de 116 isolados de *New Jersey vesiculovirus*, sendo 69 oriundos de focos nos Estados Unidos durante 2004 e 2005 e os demais oriundos do México, entre 2000 e 2004. Entre os isolados americanos foi encontrada pouca divergência entre as sequências ($\leq 1,3\%$) sendo os mesmos agrupados com 11 isolados mexicanos dentro de uma linhagem genética.

Velazquez-Salinas et al. (2014) realizaram a filogenia de 181 isolados de *New Jersey vesiculovirus*, sendo 176 de origem mexicana e cinco de origem americana. Os autores encontraram alta heterogeneidade genética entre os isolados mexicanos com a média de 17% de divergência nucleotídica. Porém entre as amostras americanas este valor foi menor que 1%, sendo as mesmas consideradas quase idênticas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ALLENDE, R.; SEPÚLVEDA, L.; SILVA, A.M.; MARTINS, M. A; SÖNDAHL, M.; ALONSO, A. An enzyme immunosorbent assay for the detection of vesicular stomatitis virus antibodies. *Prev. Vet. Med.*, v. 40, p. 293-301, 1992.

ALONSO, A.; SÖNDAHL, M.S. Antigenic and immunogenic characterization of various strains of the Indiana serotype of vesicular stomatitis isolated in Brazil. *Boletim Centro Panamericano Fiebre Aftosa*, p. 25–30, 1985.

ALONSO, A.; MARTINS, M.A.; GOMES, M.P.D.; ALLENDE, R.; SÖNDAHL, M.S. Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection, typing and sub typing of vesicular stomatitis virus. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.3, p.287-292, 1991.

ANDRADE, C.M.; ROSAS, C.E.E.; AMORIM, L.M.; MOTA, J.P.; TEIXEIRA, E.N.; SANTOS, N.F. Vesicular Stomatitis in Brazil I -Isolation and identification of the Alagoas strain. *An. Microbiol.*, v.25, p.81-89, 1980.

ARITA, G.M.M.; ARITA, H. Isolamento do vírus da estomatite vesicular em equinos no Estado de São Paulo e persistência de anticorpos em animais inoculados experimentalmente. *Biológico, São Paulo*, v.49, p.193-194, 1983.

BELÀK, S. Molecular diagnosis of viral diseases, present e trends and future aspects. A view from the OIE Collaborating Centre for the Application of Polymerase Chain Reaction Methods for Diagnosis of Viral Diseases in Veterinary Medicine. *Vaccine*, v. 25, p.5444-5453, 2007.

BONUTTI, D.W.; FIGUEIREDO, L.T.M. Diagnosis of Brazilian vesiculoviruses by reverse transcription polymerase chain reaction. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, v. 100, n.2, 193-196, 2005.

BERGER RENTSCH, M.; ZIMMER, G. A vesicular stomatitis virus replicon-based bioassay for the rapid and sensitive determination of multi-species type I interferon. *PLoS ONE* 6, e25858, 2011.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária, 2009. Plano de Ação para Febre Aftosa - Atendimento à notificação de suspeita de doença vesicular, 96p. MAPA, Brasília.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária, 2012. Definição de caso de Estomatite Vesicular e Fluxo de doenças Vesiculares. Circular DSA nº 155 de 31.08.12, MAPA, Brasília.

BRIDGES, V.E.; MCCLUSKEY, B.J.; SALMAN, M.D.; SCOTT HURD, H.; DICK, J. Review of the 1995 vesicular stomatitis outbreak in the western United States. *J.Am.Vet. Med. Assoc.*, v.211, n.5. p. 556-560, 1997.

BUSTIN, S.A.; BENES, V.; NOLAN, T.; PFAFFL, M.W. Quantitative real-time RT-PCR, a perspective. *J. Mol. Endocrinol.*, v. 34 n. 3, p. 97–601, 2005.

CARGNELUTTI, J.F.; OLINDA, R.G.; MAIA, L.A.; AGUIAR, M.N.; NETO, E.G.M.; SIMÕES, S.V.D.T.; LIMA, T.G.; DANTAS, A.F.M.; WEIBLEN, R.; FLORES, E.F.; RIET-CORREA, F. Outbreaks of *Vesicular stomatitis Alagoas virus* in horses and cattle in northeastern Brazil *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.26, n.6, p. 788–794. 2014.

De STEFANO, E.; ARAÚJO, W.P; PASSOS, E.C.; PITUCO. E. M. Estomatite Vesicular- Revisão de Literatura. *Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo*, v.69, n.3, p. 127-133, 2002.

De STEFANO, E.; ARAÚJO, W.P; PASSOS, E.C.; PITUCO. E. M. Pesquisa de anticorpos contra o vírus da Estomatite Vesicular em bovinos de corte criados na região de Araçatuba, Estado de São Paulo, Brasil em 2000. *Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science*, v.40, p. 29-35, 2003.

EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW); Scientific Opinion on Swine Vesicular Disease and Vesicular Stomatitis. *EFSA Journal*, v.10, n.4, 2631, 97 p. 2012.

FERNANDÉZ, J.; AGUERO, M.; ROMERO, L.; SÁNCHEZ, C.; BÉLAK, S.; ARIAS, M.; VIZCAÍNO-SANCHEZ, J.M. Rapid and differential diagnosis of Foot-and-Mouth Disease, Swine Vesicular Disease, and Vesicular Stomatitis by a new multiplex RT-PCR assay. *Journal of Virological Methods*. v.147, p.301-311, 2008.

FELDHAUS, A. L.; LESNAW, J. A. Nucleotide sequence of the L gene of vesicular stomatitis virus (New Jersey): identification of conserved domains in the New Jersey and Indiana L proteins. *Virology*, v.163, n.2, p.359-68. 1998.

HANSON, R.P. The natural history of vesicular stomatitis. *Bacteriol. Rev.*, v.16, n.3, p. 179–204, 1952.

HEO, E. J.; LEE, H.S.; JEOUNG, H.Y.; KO, H.R.; KWEON, C.H.; KO, Y.J. Development of a blocking ELISA using a recombinant glycoprotein for the detection of antibodies to vesicular stomatitis New Jersey vírus. *J. Virol. Methods* v.164, p.96–100, 2010.

HOFFMANN, B.; BEER, M.; REID, S.M.; MERTENS, P.; OURA, C.A.L.; VAN RIJN, P.A.; SLOMKA, M.J.; BANKS, J.; BROWN, I.H.; ALEXANDER, D.J.; KING, D.P. A review of RT-PCR technologies used in veterinary virology and disease control: Sensitive and specific diagnosis of five livestock diseases notifiable to the World Organisation for Animal Health. *Veterinary Microbiology*, v.139, p.1–23, 2009.

HOLE, K.; CLAVIJO, A.; PINEDA, L.A. Detection and serotype-specific differentiation of vesicular stomatitis virus using a multiplex, real-time, reverse transcription-polymerase chain reaction assay. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.18, p.139–146 2006.

HOLE, K.; VELAZQUES-SAKINAS, L.; CLAVIJO, A. Improvement and optimization of a multiplex real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay for the detection and typing of Vesicular stomatitis virus. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.22, p.428–433, 2010.

HOWERTH, E.W.; MEAD, D.G.; MUELLER, P.O.; DUNCAN, L.; MURPHY, M. D.; STALLKNECHT D.E. Experimental Vesicular Stomatitis virus infection in horses: effect of route of inoculation and virus serotype. *Veterinary Pathology*, v.43, p.943-955. 2006.

ICTVdb: *International Committee on Taxonomy of Viruses*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/>. Accessed 12 jun 2015.

INZAURRALDE, A. L. Distribuição espacial e temporal da estomatite vesicular no Brasil, 1964-1996. Belo Horizonte, Minas Gerais. 1997, 68p. Tese. Universidade Federal de Minas Gerais.

KWEON, C.H.; KWON, B.J.; KIM, I.J.; LEE, S.Y.; KO, Y.J. Development of monoclonal antibody-linked ELISA for sero-diagnosis of vesicular stomatitis virus (VSV-IN) using baculovirus expressed glycoprotein. *J. Virol. Methods*. v.130 n.1, p.7–14, 2005.

KOTAIT, I. Estudo epidemiológico da estomatite vesicular no Vale do Paraíba, São Paulo. 1990. 85 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1990.

LETCHWORTH, G.J.; RODRIGUEZ, L.L.; DEL CBARRERA, J. Vesicular stomatitis. *Vet. J.* v.157 n.3, p. 239–260, 1999.

LICHTY, B. D.; POWER, A.T.; STOJDL, D. F.; BELL, J. C. Vesicular stomatitis virus: re-inventing the bullet. *Trends in Molecular Medicine*, v.10, p. 210-16, 2004.

LYLES, D. S.; KUZMIN, I.V.; RUPPRECHT, C. E. *Rhabdoviridae*. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. *Virology*. 6. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013 p. 885-921.

MARTINEZ I.; RODRIGUEZ L.L.; JIMENEZ C.; PAUSZEK S.J.; WERTZ G.W. Vesicular stomatitis virus glycoprotein is a determinant of pathogenesis in swine, a natural host. *J.Virol.*, v.77, p.8039–8047, 2003.

MEAGER, A. Biological assays for interferons. *J. Immunol. Methods*. v.261, p.21–36, 2002.

NÚÑEZ, J.I.; BLANCO, E.; HERNÁNDEZ, T.; GÓMES-TEJEDOR, C.; MARTÍN, M.J.; DOPAZO, J.; SOBRINO, F. A RT-PCR assay for the differential diagnosis of vesicular viral diseases of swine. *J. Virol.Methods*, v.72, p.227-235, 1998.

OIE - World Organization for Animal Health. Vesicular Stomatites: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Paris, FR, 2012, capítulo 2.1.19. Disponível em: <http://www.oie.int/Eng/normes/mmanual/A_index.htm>. Acesso em: 25 mar. 2013.

OIE - World Organization for Animal Health. Vesicular Stomatites: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/health_standards/tahm/2.01.23_VESICULAR_STOMATITIS.pdf. Acesso em: 23 mar 2015.

PAUSZEK, S. J.; ALLENDE, R.; RODRIGUEZ, L.L. Characterization of the full-length genomic sequences of vesicular stomatitis Cocal and Alagoas viruses. *Arch. Virol.*, v.153, p.1353-1357, 2008.

PAUSZEK, S. J.; BARRERA, J.C.; GOLDBERG, T.; ALLENDE, R.; RODRIGUEZ, L.L. Genetic and antigenic relationships of vesicular stomatitis viruses from South America. *Arch Virol.* 156 (11), 1961-1968, 2011.

PITUCO, E.M.; DE STEFANO, E.; PUSTIGLIONE NETTO, L. Isolamento do subtipo Indiana III do vírus da Estomatite Vesicular no Estado de São Paulo. *Biológico, São Paulo*, v.55, n.1/2, p.5-6, 1989.

PUSTIGLIONE NETTO, L.; PINTO, A.A.; SUGA, O. Isolamento do vírus, identificação sorológica e levantamento epizootiológico de um surto de Estomatite Vesicular no Estado de São Paulo. *Arq. Inst. Biol., São Paulo*, v.34, n.2, p.69-72, 1967.

RASMUSSEN, T.B.; UTTENTHAL, A.; FERNANDEZ J.; STORGAARD. T: Quantitative multiplex assay for simultaneous detection and identification of and New Jersey serotypes of vesicular stomatitis virus. *J. Clin. Microbiol.*, v.43, p.356–362, 2005.

REIS JR, J.L.; MEAD, D.; RODRIGUEZ, L.L.; BROWN, C.C. Transmission and pathogenesis of vesicular stomatitis viruses. *Brasilian Journal of Veterinary Pathology*, v.2, n.1, p.49-58, 2007.

RAINWATER-LOVETT, K.; PAUSZEK, S.J.; KELLEY, W.N.; RODRIGUEZ LL. Molecular epidemiology of vesicular stomatitis New Jersey virus from the 2004–2005 US outbreak indicates a common origin with Mexican strains. *J. Gen. Virol.*, v.88, p.2042–2051, 2007.

ROCHA ARAÚJO, M.L.; GALLETI, M.; MACÁRIO ROCHA, M.A.; ANSELMO, F.P.; MOREIRA, E.C. Isolamento do vírus da Estomatite Vesicular tipo Indiana, subtipo Indiana III no Estado de Minas Gerais, Brasil. *Arq. Esc. Vet. Univ. Fed. Minas Gerais*, v.29, n.2, p.185-189, 1977.

RODRIGUEZ, L.L.; BUNCH, T.A.; FRAIRE, M.; LLEWELLYN, Z.N. Re-emergence of vesicular stomatitis in the western United States is associated with distinct viral genetic lineages. *Virology*, v. 271, p.171–181, 2000.

RODRIGUEZ, L.L.; PAUSZEK, S.J.; BUNCH, T.A.; SCHUMANN, K.R.. Full-length genome analysis of natural isolates of vesicular stomatitis virus (Indiana 1 serotype) from North, Central and South America. *J. Gen. Virol.*, v.83, p.2475–2483, 2002.

RODRIGUEZ, L.; BATISTA, H. R.; ROEHE, P. M.; KURATH. G. Rhabdoviridae. In: FLORES, E. F. *Virologia Veterinária*. 1. ed. Santa Maria: Ed. UFSM, 2007. p. 689-719.

SEPULVEDA, L. M.; BERGMANN, I.E.; MANTILLA, A.; NASCIMENTO, E.R. Rapid diagnosis of vesicular stomatitis virus in Ecuador by the use of polimerase chain reactios. *Braz. J. Microbiol.*, vol.38, n.3, p.500-506, 2007.

SCHMITT, B. Vesicular stomatitis. *Vet. Clin. North. Am. Food. Anim. Pract*, v.18, p.453–459, 2002.

THEILER, S. Eine contagi6se Stomatitis de Pferds in Sud-Afrika. *Deut. tierarztl. Wochschr.*, v.9, p.131-132, 1901.

TOLARDO, A. L.; SOUZA, W. M.; ROMEIRO, M. F.; VIEIRA, L. C.; LUNA, L. K. S.; HENRIQUES, D. A.; ARAÚJO, J.; SIQUEIRA, C. E. H.; COLOMBO, T. E.; AQUINO, V. H.; FONSECA, B. A. L.; BRONZONI, R. V. M.; NOGUEIRA, M. L.; DURIGON, E. L.; FIGUEIREDO, L. T. M. A real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction for detection and quantification of Vesiculovirus. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.111 n.6, p.385-390, 2016.

VELAZQUEZ-SALINAS, L.; PAUSZEK, S.J.; ZARATE, S.; ALCANTARA, F.J.B.; RODRIGUEZ, A.V.; PEREZ, A.M.; RODRIGUEZ, L.L. Phylogeographic characteristics of vesicular stomatitis New Jersey viruses circulating in Mexico from 2005 to 2011 and their relationship to epidemics in the United States. *Virology*, p.17–24, 2014.

WILSON, W.C.; LETCHWORTH, G.J.; JIMENEZ C.; HERRERO, M.V.; NAVARRO, R.; PAZ, P.; CORNISH, T.E.; SMOLIGA, G.; PAUSZEK, S.J.; DORNAK, C.; GEORGE, M.; RODRIGUEZ, L.L. Field evaluation of a multiplex real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay for detection of Vesicular stomatitis virus. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.21, p.179–186, 2009.

WUNNER, W.H.; CALISHER, C.H.; DIETZGEN, R.G.; JACKSON, A.O.; KITAJIMA, E.W.; LAFON, M.; LEONG, J.C.; NICHOL, S.; PETERS, D.; SMITH, J.S.; WALKER, P.J. Rhabdoviridae. *Archives of Virology*, v.140, p.275–88, 1995.

ZIMMER, B.; SUMMERMATTER, K.; ZIMMER, G. Stability and inactivation of vesicular stomatitis virus, a prototype Rhabdovirus. *Veterinary Microbiology*, v.162, p. 78–84, 2013.

CAPITULO 2

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE RT-qPCR PARA DETECÇÃO DO VÍRUS DA ESTOMATITE VESICULAR – *ALAGOAS VESICULOVIRUS*

Anapolino Macedo de Oliveira, Cristiano Barros de Melo

RESUMO

A estomatite vesicular é uma enfermidade que ocorre principalmente nos países do hemisfério ocidental e, em espécies como os bovinos e suínos, a doença apresenta a mesma sintomatologia clínica da febre aftosa, o que gera a necessidade de um diagnóstico diferencial rápido e acurado. O objetivo do presente estudo foi desenvolver e realizar ensaios de validação de uma RT-qPCR(s) para a detecção do RNA do *Alagoas vesiculovirus*, considerando parâmetros de sensibilidade e especificidade analítica, desempenho analítico (critérios de repetitividade e reprodutibilidade) e a incerteza da medição. Os resultados obtidos foram analisados segundo o Guia de verificação de Desempenho da Coordenação Geral de Apoio Laboratorial (CGAL), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Os resultados mostraram que as RT-qPCRs tiveram ótima sensibilidade e especificidade na detecção do RNA do *Alagoas vesiculovirus*. Os parâmetros da validação mostraram coeficientes de variação (CV) baixos e equivalentes aos encontrados em outros trabalhos de validação, indicando que os ensaios apresentaram excelente repetitividade e reprodutibilidade.

Palavras-Chave: validação, reação em cadeia da polimerase, *Alagoas vesiculovirus*, Estomatite Vesicular.

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF RT-qPCR FOR DETECTION OF VESICULAR STOMATITIS VIRUS - *VESICULOVIRUS ALAGOAS*.

Anapolino Macedo de Oliveira, Cristiano Barros de Melo

ABSTRACT

Vesicular stomatitis is a disease that occurs mainly in countries of the Western Hemisphere, and in species such as cattle and swine, this disease presents the same clinical symptoms of foot-and-mouth disease, which generates the need for a fast and accurate differential diagnosis of other vesicular diseases. The objective of the present study was to develop and perform validation tests of an RT-qPCR (s) for the detection of *Alagoas vesiculovirus* RNA, considering parameters of sensitivity and analytical specificity, analytical performance (criteria of repeatability and reproducibility) and measurement uncertainty. The results obtained were analyzed according to the Performance Checking Guide of the General Coordination of Laboratory Support (CGAL) of the Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply (MAPA). The results showed that the RT-qPCRs had great sensitivity and specificity in the detection of *Alagoas vesiculovirus* RNA. The validation parameters showed low coefficients of variation (CV) and equivalent to those found in other validation works, indicating that the tests presented excellent repeatability and reproducibility.

Key words: validation, polymerase chain reaction, *Alagoas vesiculovirus*, Vesicular stomatitis.

1. INTRODUÇÃO

A estomatite vesicular é uma doença de origem viral que acomete principalmente, as espécies, bovina, equina e suína, caracterizada clinicamente pelo aparecimento de lesões vesiculares na língua, gengiva, lábios, tetas e região coronariana dos cascos. A doença pode ocasionalmente acometer humanos, na maioria, aqueles que tiveram contato com animais doentes e pessoas que manipulam o vírus em laboratório (Reif et al. 1987; Rodriguez et al. 2008).

O vírus pertence à família *Rhabdoviridae*, ordem *Mononegavirales*, gênero *Vesiculovirus*. Quatro espécies do gênero *Vesiculovirus* são responsáveis pelos surtos de estomatite: New Jersey, Indiana, Cocal e Alagoas vesiculovírus (ICTV, 2015). Estes vírus eram anteriormente classificados em dois sorotipos: New Jersey e Indiana, sendo que o Indiana incluía os subtipos 1, 2 (Cocal) e 3 (Alagoas).

Nos bovinos e suínos, a doença cursa com sintomas semelhantes aos da Febre Aftosa e deste modo, o diagnóstico diferencial entre as duas enfermidades deve ser feito com rapidez e acurácia, uma vez que o controle das enfermidades impõe significativas perdas econômicas diretas e indiretas devido a quarentenas e restrições de mercado (Wilson et al. 2009).

O diagnóstico da estomatite é realizado com base na pesquisa de anticorpos por métodos como a neutralização viral e ELISA, na técnica de isolamento viral em cultivo de células e por métodos moleculares como a reação em cadeia da polimerase- PCR (OIE, 2012). Em relação aos métodos moleculares, a alta variabilidade genética do vírus torna difícil a identificação de sequências conservadas necessárias ao desenvolvimento de RT-qPCR que detectem todos os isolados de campo (Wilson et al. 2009) e nos últimos anos, protocolos de PCR(s) foram desenvolvidos visando à diferenciação de isolados virais responsáveis por focos nas Américas (Rasmussen et al. 2005; Fernandez et al. 2008; Wilson et al. 2009)

Estudos têm sido realizados para a validação de PCR(s) na detecção de vários agentes infecciosos (Wang et al. 2007; Vandemeulebroucke et al. 2010; Drigo et al. 2014) incluindo alguns para as enfermidades vesiculares (Moonen et al. 2003; Li et al. 2009; Goris et al. 2009), porém, em sua maioria, a validação realizada se restringe à avaliação das sensibilidades e especificidades analíticas.

Normas internacionais estabelecem requisitos gerenciais e técnicos para a competência de laboratórios em fornecer resultados de ensaios e calibração

tecnicamente válidos são apresentados pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR ISO/IEC 17025).

Ensaio laboratoriais destinados ao diagnóstico das enfermidades animais estão relacionados no Manual de testes de diagnósticos e vacinas para animais terrestres (2012), da Organização Mundial de Saúde Animal que contempla as enfermidades dos mamíferos, aves e abelhas.

Atualmente, o MAPA conta com uma unidade laboratorial nível 4- OIE, responsável pelo serviço de diagnóstico de enfermidades vesiculares no Brasil e a credibilidade dos resultados só é alcançada, após a realização de estudos que visam à validação dos métodos utilizados pelo laboratório. Nesse sentido, o objetivo do presente estudo foi realizar ensaios de validação de uma RT-qPCR otimizada com três conjuntos de iniciadores e sondas, para a detecção do RNA do *Alagoas vesiculovirus*, levando-se em conta parâmetros de sensibilidade e especificidade analítica, desempenho analítico (critérios de repetitividade e reprodutibilidade) e a incerteza da medição.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local do estudo

Este estudo foi realizado nas unidades de Diagnóstico de Doenças Virais (LDDV) e Biologia Molecular (LBM) do Laboratório Nacional Agropecuário, em Minas Gerais (LANAGRO-MG), pertencente à Rede de Laboratórios Nacionais Agropecuários do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

2.2 Vírus, culturas celulares e amostras clínicas.

No estudo foi utilizado o *Alagoas vesiculovirus* amostras, BR 64 (AV-BR64) cedida pelo Centro Panamericano de Febre Aftosa e as amostras Porto Franco (AV-PF) e Custódia (AV-CTD), isoladas no LANAGRO-MG a partir de epitélio lingual de bovinos oriundos dos estados do Maranhão e de Pernambuco.

Cultivo de células de linhagem do rim de macaco verde africano (VERO) isenta de contaminantes avaliados segundo Pinheiro de Oliveira et al. (2013), foram utilizados para a produção das sementes virais utilizadas no estudo.

Para produção das sementes de cada um dos vírus, garrafas de cultivos de 75 cm² de área contendo 30 mL de suspensão celular na concentração de 1 x 10⁵ células/ mL, cultivadas em Meio Essencial Mínimo MEM (SIGMA-USA)

suplementado com 5 % de soro fetal bovino (Gibco- USA) foram inoculadas com 0,5 mL de suspensão contendo 500 TCID₅₀ do vírus. As culturas foram incubadas em estufa a 37 °C, mantidas com 5% de atmosfera de CO₂ e observadas diariamente para a visualização do desenvolvimento de efeito citopático (ECP). Seguido o desenvolvimento completo de ECP, os cultivos foram clarificados por centrifugação a 8.000 g, e os sobrenadantes alíquotados em criotubos de 2 mL e mantidos estocados em ultra freezer à - 80° C.

A verificação de desempenho foi também avaliada utilizando-se amostras de epitélios de animais naturalmente infectados pelo vírus, pertencentes ao conjunto de ativos do Laboratório de Diagnóstico de Doenças Virais do Lanagro-MG.

2.3. Titulação viral

A titulação de todos os vírus foi realizada, individualmente, em microplacas de 96 poços (Techno Plastic Products TPP - Switzerland). Os vírus foram diluídos em base 5 e 100 µL de cada diluição foram inoculados em oito poços. Em seguida, foi adicionado a cada poço, 50 µL de suspensão celular de VERO na concentração de 9×10^5 células/mL. As placas foram incubadas em estufa à 37 °C com 5 % de atmosfera de CO₂ e o registro da presença de ECP realizado após 72 horas.

O cálculo da titulação foi feito segundo método de Reed-Muench (1958) e expresso como a recíproca da diluição em doses infecciosas para o cultivo celular.

2.4. Extração do RNA

Para a extração do RNA total das amostras foi empregado o método do TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA). Um mL de Trizol foi adicionado ao microtubo contendo 400 µL da amostra a ser processada e deixada à temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 200 µL de clorofórmio a cada tubo, que após vigorosa agitação por 15 segundos, permaneceram à temperatura ambiente por 3 minutos.

Os tubos foram então centrifugados a 12.000 g por 15 minutos, à 4 °C para a separação das três fases do processo: a fase aquosa (superior), a fase intermediária, e a fase fenólica (inferior de coloração vermelha). Seiscentos microlitros da fase superior foram transferidos para um novo microtubo e o RNA foi precipitado pela adição de 500 µL de álcool isopropílico. Após 10 minutos à temperatura ambiente, os microtubos foram centrifugados a 12.000 g por 10 minutos à 4 °C. O sobrenadante

foi descartado e o RNA foi lavado com a adição de 1 mL de etanol 75 %. Os tubos foram novamente centrifugados a 7.500g por 5 minutos a 4 °C e o sobrenadante descartado. Os microtubos permaneceram a temperatura ambiente para a secagem e o RNA foi efluído pela adição de 20 µL de água livre de nucleases. Todas as amostras foram mantidas à – 80°C até o momento da realização das PCRs. A verificação da eficácia da extração foi feita mediante a amplificação de gene da beta-actina, segundo Bielanski et al. (2009), e do controle da contaminação, através de um tubo contendo apenas os reagentes utilizados no procedimento.

2.5 RT-qPCR

2.5.1 Iniciadores e sondas

Os iniciadores e sondas foram desenhados utilizando o programa Primer3 Plus (Untergasser et al. 2007) e tiveram como base o alinhamentos de sequências de nucleotídeos gene da glicoproteína. Os iniciadores foram localizados nos seguintes nucleotídeos e tiveram como referência as sequências do Genbank: Iniciador 78F (nt.7682-7701) e 78R (nt.7759-7740), número de acesso Genbank EU373658.1; iniciador 87F (nt.356-373) e 87R (nt.442-425), número de acesso Genbank JF795518.1; iniciador 95F (nt.164-181) e 95R (nt.258-241), número de acesso Genbank JF 795518.1.

A tabela 1 descreve a sequência dos iniciadores e sondas empregados no estudo.

Os ensaios foram feitos nos termocicladores da marca Roche, modelo LC 480 (Roche, Alemanha) e Biorad CFX 96 – C1000 (Singapura).

Tabela 1. Sequência dos iniciadores, sondas e tamanho dos produtos reações da RT-qPCR para o *Alagoas vesiculovirus*.

Agente	Seqüência	Tamanho do produto amplificado
VSV-GP	Iniciador 78F: GTCCATCAACCCATTGTTCC Iniciador 78R: ATCAATCCATCTGCGACTCC Sonda: FAMCGCGATTCTTAAGTGAGTTCAAATCAGGA IowaBlack	78 pb
VSV-GP	Iniciador 87F: GAGTGTGGATCAACCCAG Iniciador 87R: CTGTGGCTTGAACRATCA Sonda: Cy-5-CTGC+GGTTATG+CC+TCCA-Iowa	87 pb
VSV-GP	Iniciador 95F: GGGTWAACATCCGTGCTA Iniciador 95R: GTCACAAGTGGTGATCCA Sonda: FAM-cac+Atc+Cat+Cca+Tcagc-IowaBlack	95 pb

As RT-qPCRs foram desenvolvidas com três conjuntos de iniciadores e sondas, sendo que uma sonda foi marcada com Cy5 (iniciador 87) e duas com FAM (iniciadores 78 e 95) desenhadas para a glicoproteína dos *Alagoas vesiculovirus*. Foi realizada uma prévia avaliação dos iniciadores frente às cepas estudadas e a de referência Agulhas Negras, indicando a especificidade dos alvos (Tabela 2).

Tabela 2. Avaliação dos iniciadores frente às cepas de *Alagoas Vesiculovírus*.

Virus	Iniciador		
	78	87	95
<i>Alagoas vírus</i> EU373658.1 (AV- BR 64)	X	ND	ND
<i>Alagoas vesiculovírus</i> - PF 2014 (AV- PF)	ND	X	ND
<i>Alagoas vesiculovírus</i> - CTD 2013 (AV- CTD)	ND	ND	X
<i>Alagoas vesiculovirus</i> JF795529.1 86 Agulhas Negras	ND	X	ND

ND – não detectado ; X - detectado

2.5.2 Otimização da RT-qPCR

A RT-qPCR foi padronizada mediante a utilização dos três pares de iniciadores e sondas, na mesma reação. A RT-qPCR foi realizada empregando-se o Kit da Quantifast RT-PCR (Qiagen, Alemanha) e a reação ocorreu em passo único. Na padronização da RT-qPCR foram avaliados os resultados alcançados quanto a variação das concentrações de iniciadores (10, 20, 25, 30, 35 e 40 pmol) e sondas (7,5; 10; 12,5; 15 e 20 pmol), buscando-se encontrar os melhores valores para otimização da reação.

No estudo, foram utilizados termocicladores da marca Roche modelo LC 480 e Biorad CFX 96 – C1000.

2.6 Vírus trabalho e contaminação das amostras

2.6.1 Vírus trabalho

A partir das amostras dos vírus BR-64, Porto Franco e Custódia previamente titulados de acordo com o item 2.3, foram realizadas 10 diluições seriadas, em base 5, para serem utilizadas na contaminação dos epitélios de língua bovina.

2.6.2 Contaminação das amostras

Para cada vírus, 10 amostras de epitélio bovino pesando aproximadamente 200 mg, foram colocadas separadamente em microtubos com capacidade de 2mL. As amostras de epitélio foram contaminadas com 200 µL de cada

diluição viral obtida de acordo com o item anterior, deixadas em temperatura de geladeira para posterior processamento e produção de suspensão.

Em seguida, os epitélios foram macerados com uso de grau e pistilo e ressuspensos com 4 mL de MEM, centrifugados a 1.500g por 10 minutos. Foram coletados os sobrenadantes de cada diluição, alíquotados em criotubos com 400 µL e mantidos à -80°C até o início da etapa de extração do RNA. As amostras foram utilizadas para a verificação de desempenho das RT-qPCRs.

2.7 Sensibilidade analítica (LD) e eficiência

A avaliação do limite de detecção dos genes alvos foi feita após extração dos RNA (s) oriundos de matriz de epitélio de língua bovina, contaminados separadamente, com os vírus trabalho. As RT-qPCRs foram realizadas para cada um dos RNAs alvos obtidos na etapa anterior, em triplicata, e o limite de detecção correlacionado com a titulação do vírus expresso em TCID₅₀/ 200 µL, detectado nas três réplicas.

A eficiência da amplificação foi avaliada por meio do usando o slope da linha de regressão com a seguinte fórmula: $e = 100 \times (10^{-1/\text{slope}} - 1)$.

2.8 Especificidade analítica

A especificidade analítica foi avaliada com a realização da RT-qPCR frente à RNA e DNA extraídos de vírus responsáveis por enfermidades diferenciais das doenças vesiculares. Assim, foram empregados na especificidade analítica, RNAs do *Indiana vesiculovirus* (IVV) Costa Rica 72 (APHIS- NVSL), *Cocal vesiculovirus* (CVV) Ribeirão BR-79 e BR-98, *New Jersey vesiculovirus* (NJVV) Costa Rica 66 (APHIS-NVSL), *Foot and mouth disease virus* (FMD) O1 Campos, A-24 Cruzeiro e C3-Indaial, *Bovine viral diarrhea virus* (VDBV) ATCC -NADL -VR534, e DNAs do *Bovine alphaherpesvirus 1* (BoHV) ATCC VR 864, células MDBK, Vero e PK₁₅ e de epitélio lingual de bovinos.

2.9 Verificações de desempenho

Foi realizado a partir de ensaios de RT-qPCR de RNAs obtidos pela extração de amostras de epitélios linguais contaminadas e de amostras de animais naturalmente infectados.

2.9.1 Verificações de desempenho das amostras de epitélios contaminadas

As RT-qPCR foram realizadas a partir de amostras extraídas de epitélio lingual de bovinos, contaminados de acordo com o item 2.6.2. Foram escolhidas sete amostras para serem extraídas e submetidas as RT-qPCRs por dois analistas durante três dias consecutivos. Diariamente, cada analista realizou a extração de 200 µL de cada conjunto das sete diluições e em seguida submeteu os RNAs extraídos à RT-qPCR mantendo-se as mesmas condições como os reagentes e equipamentos durante o processo.

2.9.1.1 Repetitividade

A repetitividade avaliou o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas pelo mesmo analista. Os resultados da RT-qPCR foram lançados nas planilhas do Guia de verificação de Desempenho MAPA (2015) para avaliação da variância.

2.9.1.2 Reprodutibilidade

A reprodutibilidade das RT-qPCR mediu o grau de concordância entre os resultados das medições em condições variadas, neste caso por dois analistas e dois equipamentos. Assim, os resultados das RT-qPCRs obtidos pelos dois analistas e aqueles encontrados a partir da análise das amostras extraídas por um analista e submetidas às RT-qPCR em um segundo equipamento (Biorad CFX 96 – C1000), foram avaliados com os mesmos critérios da repetitividade.

2.9.2 Verificações de desempenho em amostras clínicas

Nesta etapa, foram empregadas amostras recebidas para o diagnóstico de enfermidades vesiculares pelo Laboratório de Diagnóstico de Doenças Virais (LDDV) e Laboratório de Biologia Molecular (LBM). Sete amostras de epitélios de animais naturalmente infectados foram maceradas com uso de gral e pistilo e suspensos com 4 mL de MEM.

Duzentos microlitros de cada amostra, em triplicata, foram mantidos à -80 °C até o início da etapa de extração do RNA.

Diariamente, um conjunto das sete amostras foi submetido à extração do RNA por dois analistas e, em seguida, à RT-qPCR, durante três dias consecutivos, mantendo-se os mesmos reagentes e equipamento durante o processo.

2.9.2.1 Repetitividade com amostras clínicas

Foram avaliadas de acordo com os critérios descritos no item 2.9.1.1

2.9.2.2 Reprodutibilidade com amostras clínicas

Foram avaliadas de acordo com os critérios descritos no item 2.9.1.2

2.10 Análises dos dados

A metodologia de validação seguiu diretrizes abordadas no Guia de verificação de Desempenho MAPA (2015). Os valores de ciclo limiar (Ct) obtidos em triplicata, a partir de cada amostra foram avaliados considerando as variações de dias, analistas e equipamentos para a análise de variância (ANOVA), visando a determinação das variâncias da repetitividade e reprodutibilidade.

Foram apresentados os valores da variância (S^2), do desvio (S), do coeficiente de variação (CV) e da significância. O CV de cada ensaio foi obtido pela divisão do desvio padrão pela média dos valores do Cts, multiplicado por 100 ($s/\mu \times 100$).

Para o cálculo da incerteza da medição, foram avaliados os valores da incerteza expandida que indica a possível variação dos Cts a partir do valor médio alcançado por cada analista.

Por último, são apresentados os valores percentuais dos componentes da variação de cada uma das fontes de variação do estudo. Os componentes da variação indicam, em porcentagem, o quanto da variação total corresponde a cada fonte de variação do mensurando. O valor é encontrado dividindo a variância da fonte pela variância total do experimento, sendo o resultado multiplicado por 100. Foram considerados como fonte de variação apenas os valores referentes aos componentes, dia, erro da análise e analista ou equipamento. Não foi considerada a variação das parcelas experimentais, devida às diluições das amostras. Na verificação de desempenho segundo o guia de desempenho da CGAL, o erro total da medida deve ser considerado de até 30 %.

2.11 Análise de concordância entre RT-qPCR e RT-PCR a partir de amostras clínicas.

Ainda no âmbito de avaliação de desempenho, foi realizado teste de Kappa para avaliar a concordância da RT-qPCR utilizada em nosso estudo, com uma RT-PCR padronizada no laboratório de Biologia Molecular do Lanagro-MG, que teve como alvo a amplificação do gene da fosfoproteína do vírus, resultando na amplificação de um fragmento de 722 pb e utilizada como parte dos ensaios de sequenciamento do vírus.

2.11.1 Amostras

No estudo da análise de concordância foram utilizados RNAs oriundos de amostras recebidas pelo Lanagros, em Minas Gerais e Pará, destinadas ao diagnóstico de enfermidades vesiculares.

2.11.2 Análise de concordância

Foi utilizado o teste de kappa com vista a avaliar a concordância dos resultados obtidos entre a RT-qPCR e a RT-PCR, sendo os valores definidos pela fórmula:

$$\text{Kappa} = 2 \times [(PP \times NN) - (PN \times NP)] / (N1 \times N4) + (N2 \times N3)$$

		RT-qPCR		
		Positivo	Negativo	
RT-PCR	Positivo	PP	PN	N1
	Negativo	NP	NN	N2
		N3	N4	Total

$$N1 = (PP + PN); N2 = (NP + NN); N3 = (PP + NP); N4 = (PN + NN)$$

A otimização da RT-PCR está descrita no item 2.4 do capítulo 3 da filogenia viral.

De acordo com Landis e Koch (1977), os valores de Kappa são definidos como: Kappa < 0 indica nenhuma concordância; entre 0 – 0,19, baixa concordância;

entre 0,2 – 0,39 concordância regular; entre 0,4 – 0,59, moderada concordância; entre 0,6 – 0,79, substancial concordância; entre 0,8 – 1,0, alta concordância.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A estomatite vesicular é reconhecida por acometer espécies domésticas de animais de interesse econômico como bovinos, equinos, suínos e cursa com a apresentação de sinais clínicos semelhantes aqueles observados na Febre Aftosa (Rodriguez et al. 2008). A doença é endêmica no norte da América do Sul, América Central, sul do México e esporadicamente no norte desse último e sudoeste dos EUA (DE Stefano et al.2002; Letchworth et al. 1999). No Brasil, a estomatite tem sido relatada principalmente nos estados da região norte e nordeste, tendo como principal agente vírus da espécie Alagoas. No entanto, foi relatada a ocorrência do Cocal vesiculovírus em focos nos estados de Santa Catarina e Paraná em 1998, (Alonso et al. 1985; A. Pauszek et al. 2011; Cargnelutti et al. 2014). Segundo o serviço oficial brasileiro de 1997 a 2011, 164 focos de estomatite foram causados pelo Alagoas vesiculovírus. No período de 2007 a 2011, o vírus se manteve endêmico nos estados das regiões centro-oeste, sudeste e nordeste (MAPA, 2012).

No diagnóstico da estomatite são empregados métodos clássicos para a pesquisa de anticorpos como a neutralização viral, a fixação do complemento e o ELISA, e para a detecção do agente, o isolamento viral em cultivo de célula.

Segundo Bélak (2007), organismos nacionais e internacionais, instituições de pesquisa e laboratórios de diagnóstico buscam o desenvolvimento de ensaios que levam à detecção rápida e específica dos agentes causadores das enfermidades. Nesse sentido, ensaios de diagnósticos baseados na biologia molecular e caracterizados por métodos rápidos com alta sensibilidade e especificidade estão sendo amplamente utilizados na área da medicina humana e veterinária.

O emprego da reação em cadeia da polimerase em tempo real constitui uma das ferramentas mais utilizadas no diagnóstico molecular e vários laboratórios tem desenvolvido e aplicado seus próprios métodos no diagnóstico de enfermidades (Drigo, 2014).

Os laboratórios de diagnóstico devem realizar ensaios de validação visando garantir a confiança e a correta determinação de status infeccioso de um animal. A Organização Mundial de Saúde Animal, em acordo com a ISO/IEC 17025, publicou o

guia para a validação completa dos métodos moleculares, mas que, no entanto, são de difícil aplicação, principalmente pela falta de amostras de animais naturalmente infectados e da disponibilidade de métodos padrão ouro (Vandemeulebroucke, 2010).

O presente estudo descreve a validação, em contexto experimental, de uma RT-qPCR feita com três conjuntos de iniciadores e sondas, sendo que uma sonda foi marcada com Cy5 (iniciador 87) e duas com FAM (iniciadores 78 e 95) desenhadas, respectivamente, para a amplificação do gene da glicoproteína do Alagoas vesiculovírus.

3.1 – RT-qPCR

3.1.1- Otimização

Após a avaliação das várias concentrações dos iniciadores e sondas, a reação da q-RT PCR apresentou os melhores resultados quando foi utilizada concentração de 10 pmol/ μL dos iniciadores e das respectivas sondas. As reações foram feitas em microplacas de 96 poços e para cada amostra, o mix foi composto de 1,25 μL de água livre de RNA, 12,5 μL do tampão (Quantifast probe RT_PCR mix), 1 μL de cada um dos pares de iniciador e respectivas sondas, 0,25 μL de enzima e 2 μL de RNA molde, totalizando 20 μL por amostra.

Cada ciclo da RT-qPCR foi realizado nas seguintes temperaturas: 50 °C por 10 minutos para a etapa de transcrição reversa; 95 °C por 5 minutos para a ativação da enzima; 45 ciclos de 95 °C por 10 segundos para desnaturação e 60 °C por 1 minuto para anelamento e extensão.

A aquisição da fluorescência foi programada para acontecer na última etapa do processo, ou seja, durante o anelamento e extensão. O resultado da reação foi determinado pelo número de ciclos, o threshold (Ct) e a fluorescência foi detectada e com base no limite de detecção foi determinado o ponto de corte da prova.

Estudos iniciais realizados com o iniciador 87 indicaram que ele não foi capaz de detectar a amostra de referência do *Alagoas vesiculovirus* (BR-64), mas, no entanto detectou a maioria das amostras oriundas dos focos brasileiros que foram encaminhadas ao LANAGRO-MG para diagnóstico. Assim, foram incluídos na RT-qPCR mais dois conjuntos de iniciadores e sondas (78, 95) que foram capazes de detectar além da amostra de referência BR-64 e a amostra Custódia, outras amostras de

campo anteriormente não detectadas pelo conjunto 87, o que aumentou consideravelmente a sensibilidade do ensaio.

A inclusão de mais de um conjunto de iniciadores e sondas foi também relatada por Wilson e colaboradores (2009) que, inicialmente, padronizaram a RT-qPCR com utilização de seis iniciadores direto, três reversos e uma sonda para a detecção do *New Jersey vesiculovirus*, e três iniciadores diretos, três reversos e uma sonda para a detecção do *Indiana vesiculovirus*. Esta RT-qPCR não foi capaz de identificar isolados do New Jersey vesiculovirus oriundos da Costa Rica, necessitando da inclusão de mais um conjunto de iniciadores e de sondas para o New Jersey. O autor explica ainda que a provável causa da não detecção das amostras se deve a alta variabilidade do vírus da estomatite vesicular que podem existir como quasi-espécies, sendo que muitos isolados podem mudar rapidamente. Ainda, de acordo com Vandemeulebroucke et al, (2010), o emprego mais de um conjunto de iniciadores e sondas leva à diminuição dos custos do ensaio e aumenta a capacidade de atendimento da rotina laboratorial.

3.2 - Titulações virais, sensibilidade analítica e eficiência.

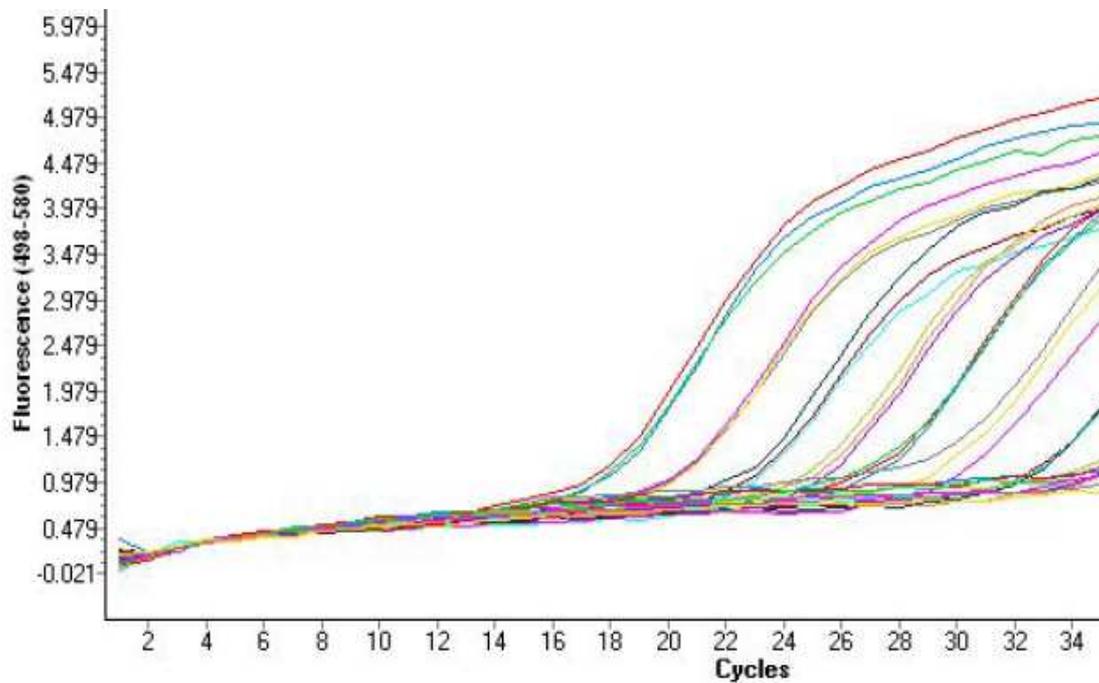
Após a multiplicação viral em cultivo de linhagem celular do AV- BR 64 forneceu os títulos de $1,25 \times 10^4$ TCID₅₀/ 200 µL, pelo método de Reed-Muench (1958). A tabela 3, apresenta os valores de Cts na avaliação da sensibilidade analítica do vírus, em diluições de base 5, e analisadas em triplicata. Não houve amplificação nas diluições posteriores a sétima diluição. A partir do valor do título viral, a sensibilidade analítica alcançada foi de $1,6 \times 10^{-1}$ TCID₅₀.

Tabela 3. Sensibilidade analítica da RT-qPCR para o AV- BR 64.

	Diluições							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Ct	19,36	21,84	24,64	26,81	28,93	31,78	34,37	ND
	18,96	21,93	24,78	27,01	28,69	31,16	34,48	ND
	19,31	21,99	24,01	26,40	28,78	31,16	34,36	ND
Média	19.21	21.92	24.48	26.74	28.80	31.18	34.41	ND
Sd Ct	0.22	0.08	0.41	0.31	0.12	0.59	0.07	ND

ND – não detectado

Na Figura 1, está representada a curva de amplificação na RT-qPCR AV- BR 64 e na Figura 2, a curva padrão gerada com valor de 1,966, o que resultou na eficiência de 96%.

**Figura 1.** Curva de amplificação da RT-qPCR para o AV- BR 64.

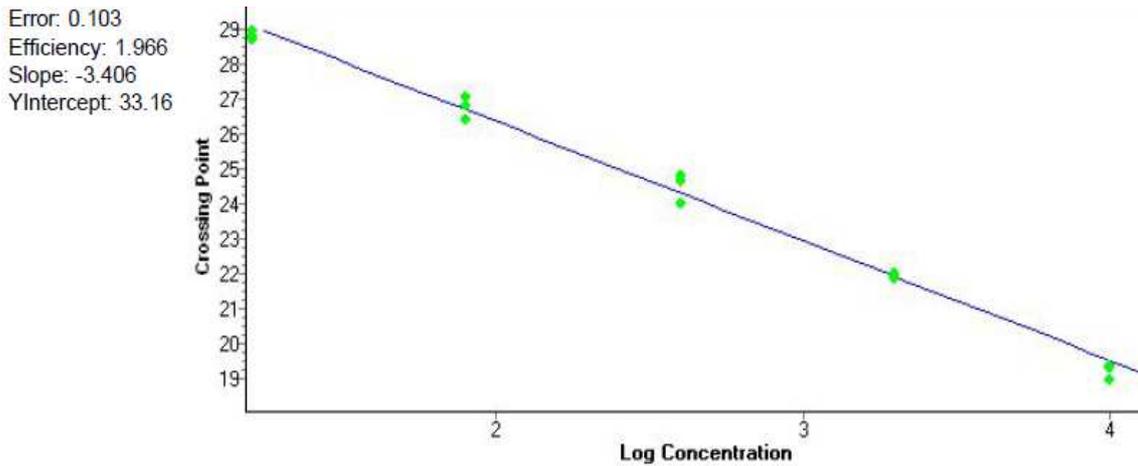


Figura 2. Curva padrão da RT-qPCR para o AV- BR 64.

A multiplicação do AV- PF resultou em um título de $1,02 \times 10^5$ TCID₅₀/200 µL, pelo método de Reed-Muench (1958).

A Tabela 4 apresenta os valores de Cts na avaliação da sensibilidade analítica, em diluições de base 5, analisadas em triplicata, destacando os valores da média e desvio padrão. Não houve amplificação nas diluições posteriores a oitava diluição. A partir do valor do título viral, a sensibilidade analítica alcançada foi de $2,6 \times 10^{-1}$ TCID₅₀.

Tabela 4. Sensibilidade analítica da RT-qPCR para o AV- PF

	Diluições							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Ct	17,64	19,66	22,27	24,27	26,22	28,43	31,08	33,92
	17,45	19,66	22,11	24,40	26,29	28,45	31,25	34,76
	17,44	19,76	22,11	24,43	26,27	28,46	31,05	35,58
Média	17,51	19,73	22,17	24,37	26,26	28,45	31,13	34,75
Sd Ct	0,11	0,06	0,09	0,09	0,03	0,01	0,11	0,83

Na Figura 3, está representada a curva de amplificação da RT-qPCR do AV - PF. A curva padrão apresentada na Figura 4 mostra que o valor de 2,082 resultou na eficiência foi 108%.

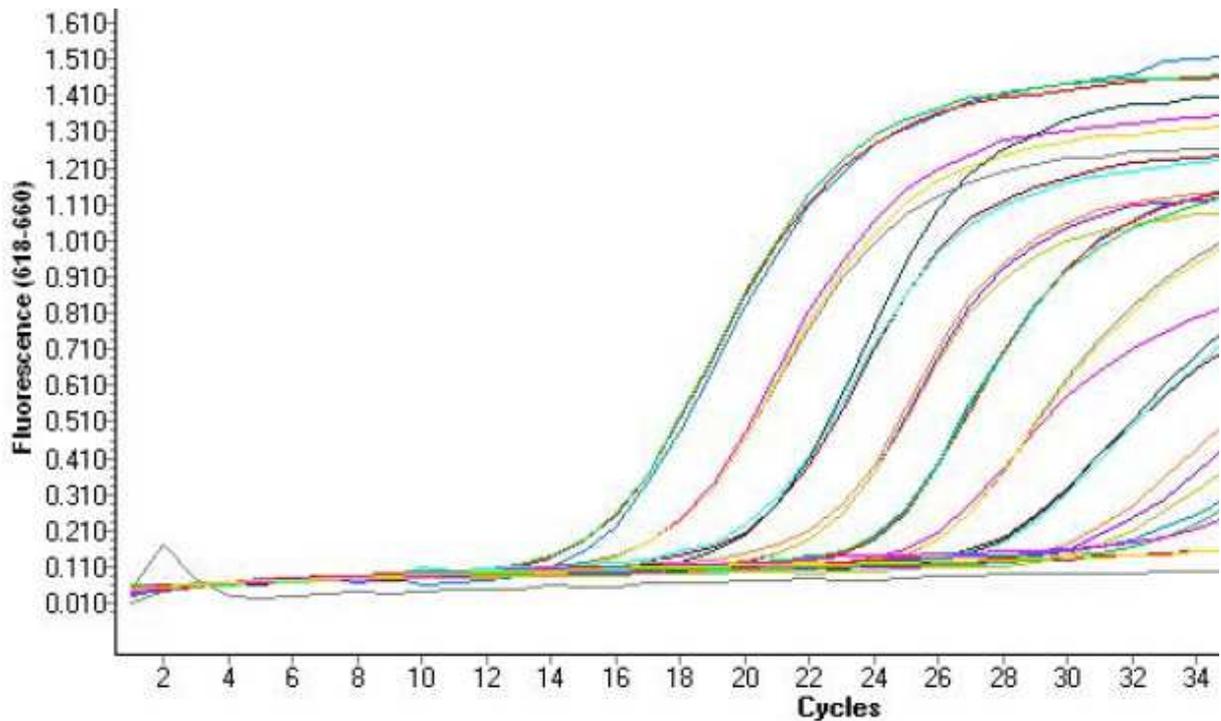


Figura 3. Curva de amplificação da RT-qPCR para AV- PF

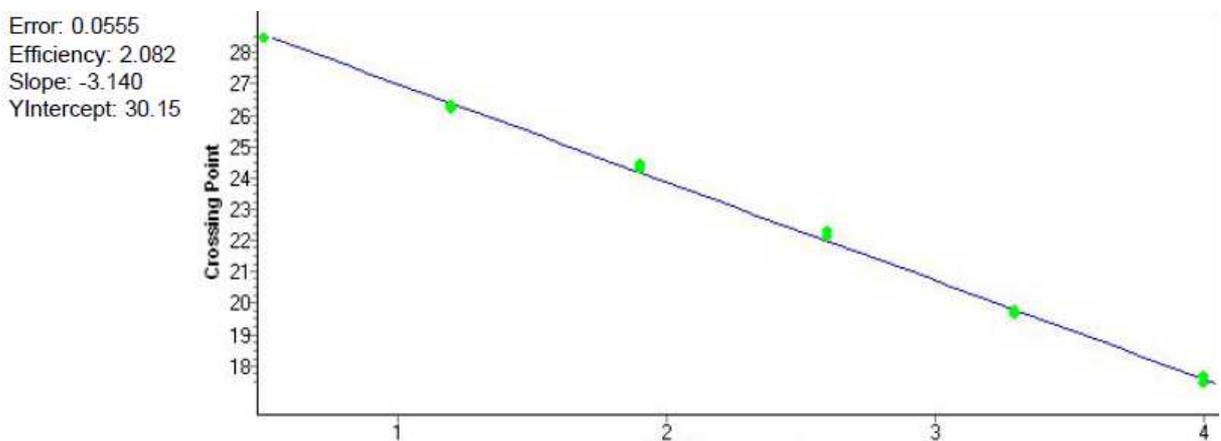


Figura 4. Curva padrão da RT-qPCR para o AV- PF

Os resultados da sensibilidade analítica das RT-qPCRs para o AV- BR-64 e AV – PF foi de, $1,6 \times 10^{-1}$ e $2,6 \times 10^{-1}$ TCID₅₀, respectivamente, e mostraram que os ensaios foram bastante sensíveis na detecção dos RNAs alvos. A eficiência das reações para esses vírus foi de 96% e 108%, respectivamente, e foram semelhantes aos encontrados por Hole et al. (2006) que apontaram a aceitabilidade $\geq 90\%$, e também aos encontrados por Drigo et.al. (2014) que relataram valores de 90 a 108%. Segundo

Broeders et al.(2014), os valores de eficiência para ensaios de uso qualitativos podem variar de 80% a 120%.

A titulação do AV- CTD forneceu o título de $1,12 \times 10^5$ TCID₅₀/ 200 µL de amostra pelo método de Reed-Muench (1958). A tabela 5 apresenta os valores de Cts na avaliação da sensibilidade analítica do vírus, em diluições de base 5, e analisadas em triplicata. A partir do valor do título viral, a sensibilidade analítica alcançada foi de $7,2 \times 10^0$ TCID₅₀.

Tabela 5. Sensibilidade analítica da RT-qPCR para o AV – CTD

	Diluições							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Ct	19,63	22,46	25,28	27,70	30,38	32,66	ND	ND
	19,58	22,00	25,25	27,80	30,34	32,66	ND	ND
	19,60	22,16	25,50	27,06	30,13	32,51	ND	ND
Média	19.60	22.21	25.34	27.85	30.29	32.61	ND	ND
Sd Ct	0.03	0.23	0.13	0.18	0.13	0.09	ND	ND

Na Figura 5 está representada a curva de amplificação da RT-qPCR AV-CTD, na Figura 6, a curva padrão gerada com valor de 1,840 que resultou na eficiência 84 %.

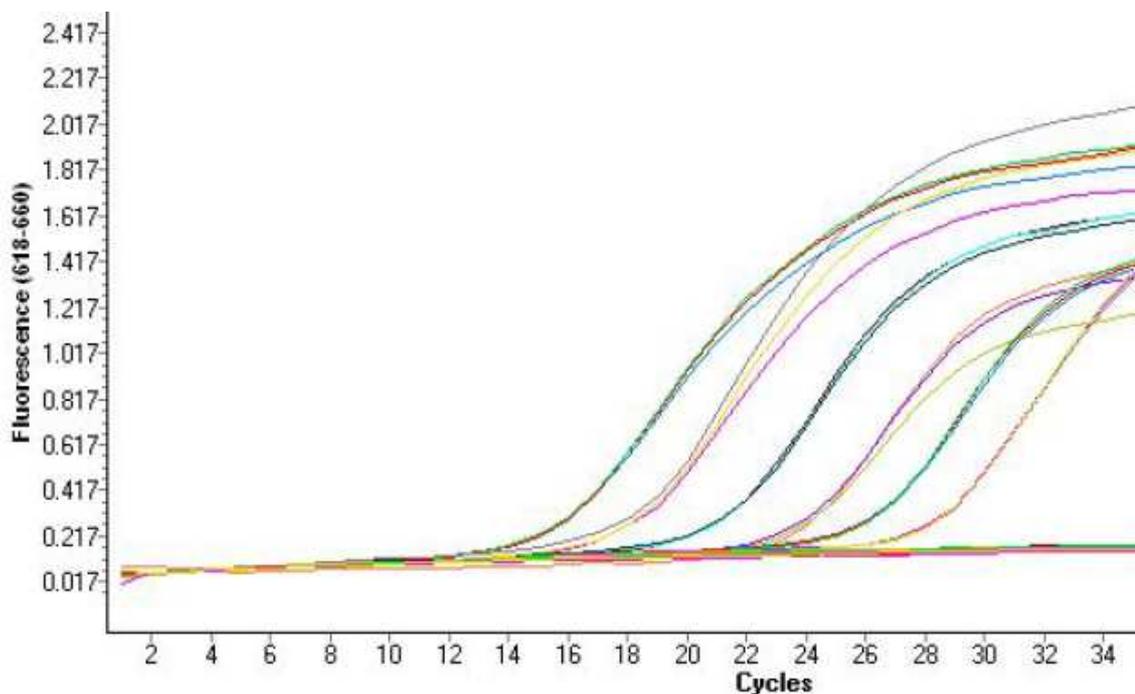


Figura 5. Curva de amplificação da RT-qPCR para o AV- CTD

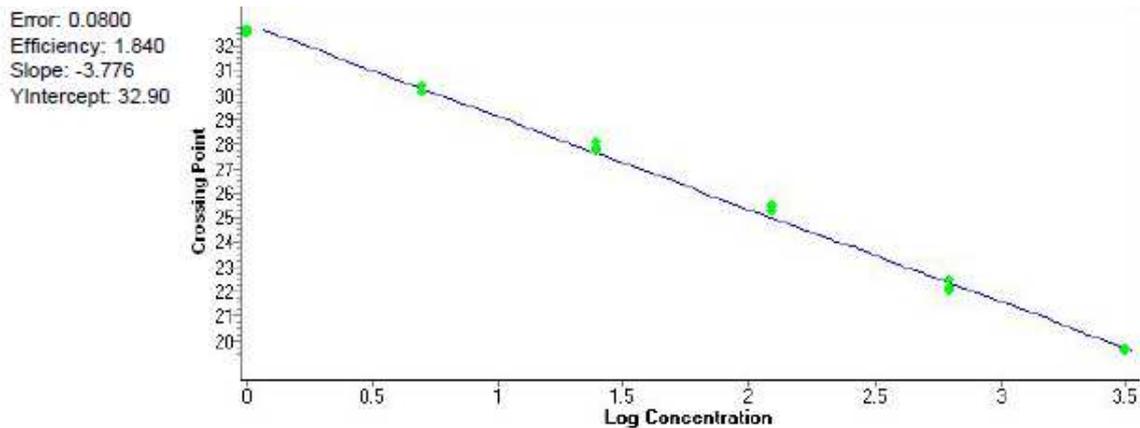


Figura 6. Curva padrão RT-qPCR para o AV-CTD

A avaliação dos resultados da sensibilidade AV-CTD mostrou a menor capacidade de detecção que foi de $7,2 \times 10^0$ TCID₅₀ viral. A curva de eficiência foi de 1,840, correspondente a 84%. Valores semelhantes foram encontrados por Rasmussen e colaboradores (2005), quando no desenvolvimento de RT-qPCR para o *New Jersey e Indiana vesiculovirus*. Apesar da menor sensibilidade analítica, justificou-se a manutenção dos iniciadores na formulação da RT-qPCR, visando aumentar a sensibilidade do ensaio principalmente para uso no diagnóstico de amostras recebidas de suspeitas de enfermidades vesiculares no campo.

3.3 - Especificidade analítica

Na avaliação da especificidade analítica não houve amplificação dos RNAs do *Indiana vesiculovirus* (IVV), Costa Rica 72 (APHIS- NVSL), *Cocal vesiculovirus* (CVV) Ribeirão BR-79 e BR-98, *New Jersey vesiculovirus* (NJVV) Costa Rica 66 (APHIS-NVSL), *Foot and mouth disease vírus* (FMD) O1 Campos, A-24 Cruzeiro e C3-Indaial, *Bovine viral diarrhea vírus* (VDBV) ATCC -NADL -VR534, e DNA do *Bovine alphaherpesvirus 1* (BoHV) ATCC VR 864, células MDBK, Vero, demonstrando a alta especificidade dos iniciadores e sondas utilizados no estudo. Nenhuma amplificação foi também observada nas amostras de células MDBK e Vero e epitélio lingual de bovinos, demonstrando a alta especificidade dos iniciadores e sondas utilizados no estudo.

A figura 7 apresenta a curva de amplificação do ensaio de especificidade, onde se observa apenas a amplificação específica do RNA controle do Alagoas vesiculovírus.

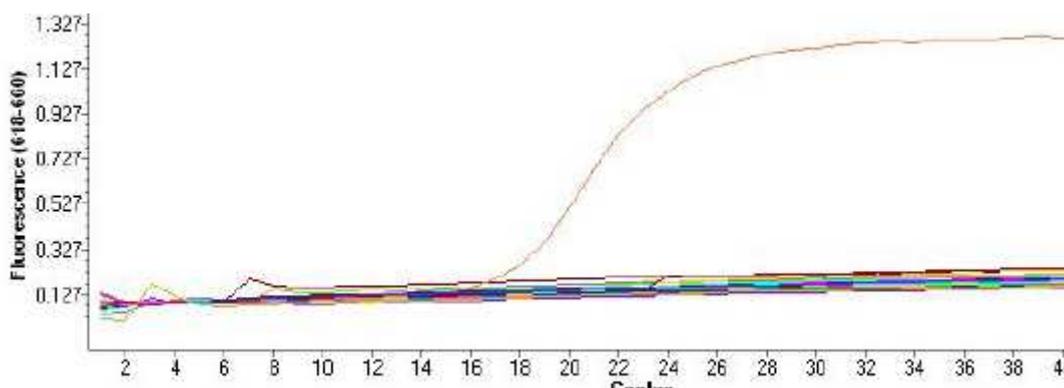


Figura 7. Curva de amplificação da RT-qPCR para ensaio de especificidade analítica, mostrando a amplificação apenas do controle positivo do *Alagoas vesiculovirus*.

3.4 - Verificações de desempenho das amostras de epitélios contaminadas

Os resultados das verificações de desempenho das RT-qPCRs são apresentados, separadamente para cada um dos RNAs estudados, indicando os valores da análise da variância, da incerteza da medição e dos valores percentuais dos componentes da variação.

Nas tabelas de análise da variância apresentadas nos estudos da repetitividade e da reprodutibilidade, atenção especial foi dada aos valores dos coeficientes de variação entre os analistas e a conclusão da significância.

Na incerteza da medição foi importante avaliar o grau de proximidade dos valores dos Cts médios entre os analistas e a incerteza da medição expandida (IPEX), e por último, na avaliação dos componentes da variação se houve alguma variável que mais impactou na composição do erro total da medida.

3.4.1 Verificação das RT-qPCRs para os RNAs do AV- BR 64

A tabela 6 apresenta os valores de Cts obtidos nas RT-qPCRs realizadas com o RNA do *Alagoas vesiculovirus* BR-64, pelos dois analistas durante os três dias consecutivos.

Tabela 6. Valores de Cts das RT-qPCRs com RNA do AV- BR 64.

Amostras	Analista 1							Analista 2						
	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7
1d	22,15	24,58	27,38	26,14	28,27	29,63	30,86	24,61	25,65	25,75	26,80	29,83	33,06	29,84
	22,49	25,41	27,16	26,00	28,50	29,96	-	24,80	26,05	25,51	26,86	30,20	31,49	30,29
	22,35	25,21	27,51	26,85	27,89	29,94	30,80	24,81	25,40	25,31	26,08	30,20	33,00	29,98
2d	23,30	24,33	25,38	25,66	27,34	30,91	27,39	24,80	23,80	27,00	25,54	27,79	30,85	-
	24,52	24,15	25,45	25,74	27,26	30,06	28,21	24,07	24,55	26,99	25,89	29,42	29,85	30,90
	23,99	24,24	25,21	25,91	27,82	28,65	29,36	24,17	23,89	27,31	25,28	28,20	29,75	32,99
3d	22,97	28,29	24,30	27,07	28,77	32,87	32,96	22,43	27,41	27,34	29,54	28,02	-	31,00
	23,85	29,29	24,96	26,56	27,77	27,94	30,08	22,99	27,20	27,26	29,88	29,61	32,78	30,03
	22,59	28,37	25,30	27,00	27,51	33,70	30,18	22,98	27,16	26,90	28,60	27,93	31,90	29,97

(-) não detectado

As tabelas 7, 8 e 9 apresentam os resultados referentes à avaliação da repetitividade das RT-qPCRs para o AV- BR 64. Observa-se que houve diferença significativa entre as medidas tomadas por cada analista em relação aos dias de realização dos ensaios. O CV entre as medidas foi de 3,39 % para o primeiro analista e 1,96 % para o analista 2.

Tabela 7. Análise de variância, RT-qPCR para o AV- BR 64 (Repetitividade)¹

Analista 1				Analista 2			
S ²	S	CV	dias	S ²	S	CV	Dias
0,84	0,92	3,39 %	sign	0,30	0,54	1,96 %	Sign

A incerteza da medição apresentada na Tabela 8 mostrou que os valores médios dos CTs de aproximadamente 27 e o intervalo de confiança das medidas foram considerados semelhantes entre os analistas

Tabela 8. Incerteza da medição. RT-qPCR para o AV- BR 64 (Repetitividade)²

Analista 1			Analista 2		
IPEX	Média Ct	IC (95%)	IPEX	Média Ct	IC (95%)
U= 1,85	27,04	Y ± U	U= 1,10	27,70	Y ± U
1,45-2,25		25,18-28,89	0,86-1,34		26,20-28,80

Tabelas 9. Componentes da variação, RT-qPCR para o AV- BR 64 (Repetitividade)

Analista 1			Analista 2		
Componentes da variação (%)			Componentes da variação (%)		
Dias	Erro	Total erro da medida %	Dias	Erro	Total erro da medida %
17,03	10,37	27,40	18,63	3,43	22,06

A Tabela 10 apresenta os resultados referentes à avaliação da reprodutibilidade dos ensaios, considerando-se os resultados dos dois analistas. O coeficiente de variação foi de 2,76 %, havendo diferença significativa entre as medidas em relação aos dias, porém não em reação aos analistas.

¹ S² – variância, S- desvio padrão, CV- coeficiente de variação.

² IPex- Incerteza expandida, IC- intervalo de confiança

Tabela 10. Análise de variância, RT-qPCR para o AV- BR 64 (reprodutibilidade)

S ²	S	CV	dias	analista
0,57	0,76	2,76 %	sign	ns

A tabela 11 mostra que o valor do Ct médio dos ensaios dos dois analistas foi de 30,96 e o intervalo de confiança alcançou o valor de Ct de 32,47. Esses valores foram maiores que os obtidos na avaliação individual de cada analista apresentado na Tabela 8.

Tabela 11. Incerteza da medição, RT-qPCR para AV- BR 64 (reprodutibilidade)

IPEx	Média Ct	IC (95%)
U= 1,50		Y ± U
1,27-1,74	30,96	29,46-32,47

A avaliação dos componentes da variação (Tabela 12) mostrou que o erro total da medida foi também superior a 20 %, determinado apenas pelos componentes do dia e do próprio erro da análise.

Tabelas 12. Componentes da variação, RT-qPCR para o AV- BR 64 (reprodutibilidade)

Componentes da variação (%)			
Dias	Analista	Erro	Total erro da medida
17,23	0,00	6,60	23,83

3.4.2 Verificação das RT-qPCRs para os RNAs do AV- PF

A tabela 13 apresenta os valores de Cts obtidos nas RT-qPCRs realizadas com o RNA do AV- PF, pelos dois analistas durante os três dias consecutivos.

Tabela 13. Valores de Cts das RT-qPCRs, frente RNA do AV- PF

Amostras	Analista 1							Analista 2						
	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7
1d	19,03	21,26	21,31	24,46	24,89	28,31	30,79	19,87	20,18	24,82	24,97	24,76	26,30	25,98
	19,39	21,72	21,43	25,15	24,63	27,76	29,27	19,87	20,38	23,79	24,67	24,75	26,43	25,89
	18,92	21,34	21,44	25,19	23,75	27,69	28,86	20,13	20,46	24,80	24,81	24,32	26,14	26,07
2d	21,85	20,85	22,07	25,69	25,25	27,27	26,61	20,62	20,81	21,32	25,18	24,73	28,84	28,74
	20,16	20,71	22,09	25,95	25,22	27,27	26,78	19,82	21,02	21,90	25,44	24,47	28,44	29,44
	20,37	20,93	21,96	25,46	25,24	25,88	26,77	20,38	21,53	21,49	25,18	24,83	28,95	29,45
3d	17,82	18,80	20,39	23,97	26,65	27,58	26,78	23,00	19,30	22,72	24,90	25,95	27,26	25,07
	17,57	19,28	19,97	23,93	26,66	28,02	26,38	22,71	19,82	22,70	24,18	25,78	27,10	23,74
	17,23	18,87	19,87	23,55	26,64	27,62	26,86	22,57	19,69	21,98	24,66	25,56	27,58	25,51

A Tabela 14 apresenta os resultados referentes a avaliação da repetitividade dos ensaios da RT- qPCR AV- PF. A análise da variância de cada analista revelou valores de CV próximos e que houve diferença significativa entre as medidas tomadas por cada analista em relação aos dias de realização dos ensaios.

Tabela 14. Análise de variância, RT-qPCR para o AV- PF (Repetitividade)

Analista 1				Analista 2			
S ²	S	CV	dias	S ²	S	CV	dias
0,18	0,42	1,79%	sign	0,12	0,35	1,46 %	Sign

A avaliação da incerteza da medição indicou que os analistas tiveram resultados semelhantes, e os valores médios dos Cts de aproximadamente 23 (Tabela 15).

Tabela 15. Incerteza da medição. RT-qPCR para o AV- PF (Repetitividade)

Analista 1			Analista 2		
IPEx	Média Ct	IC (95%)	IPEx	Média Ct	IC (95%)
U= 0,86			U= 0,71		Y ± U
0,67-1,04	23,74	22,88-24,59	0,56-0,86	24,03	23,32-24,73

A tabela 16 mostra que o valor do erro da medida de 12,50% obtido pelo analista 1 foi maior que o obtido pelo analista 2, de 21,46%. Este valor foi influenciado pelo componente dia, que alcançou o valor de 20,05. Os valores do erro da análise foram considerados próximos entre os dois analistas.

Tabela 16. Componentes da variação, RT-qPCR para o AV- PF (Repetitividade)

Analista 1			Analista 2		
Componentes da variação (%)			Componentes da variação (%)		
Dias	Erro	Total erro da medida %	Dias	Erro	Total erro da medida %
11,13	1,37	12,50	20,05	1,41	21,46

As tabelas 17, 18 e 19 apresentam os resultados referentes à avaliação da reprodutibilidade dos ensaios. Do mesmo modo que apresentado para o *Alagoas vesiculovirus* BR-64, houve diferença significativa entre as medidas em relação aos dias, porém não em relação aos analistas.

O CV das medidas foi de 1,63 %. A avaliação da incerteza da medição mostrou o valor médio do Ct de 27,47, que foi maior do que aqueles apresentados na avaliação da repetitividade (Tabela 15).

Tabela 17. Análise de variância, RT-qPCR para o AV- PF (reprodutibilidade)

S ²	S	CV	Dias	analista
0,15	0,39	1,63 %	sign	ns

Tabela 18. Incerteza da medição, RT-qPCR para o AV- PF (reprodutibilidade)

IPE _x	Média Ct	IC (95%)
U= 0,77		Y ± U
0,66-0,89	27,47	26,69-28,24

Observa-se que o valor do erro total da medida de 16,05 % não foi influenciado pelos analistas, mas somente pelo dia e o erro da análise (tabela 19).

Tabelas 19. Componentes da variação, RT-qPCR para o AV- PF (reprodutibilidade)

Componentes da variação (%)			
Dias	Analista	Erro	Total erro da medida
14,66	0,00	1,39	16,05

3.4.3 Verificação das RT-qPCRs para os RNAs do AV- CTD

Por último, são apresentados os resultados referentes as RT-qPCRs dos RNAs extraídos com amostras contaminadas com o AV- CTD, um isolado do estado do Tocantins. A Tabela 20 apresenta os valores de Cts obtidos nas RT-qPCRs realizadas com o RNA do AV- CTD pelos dois analistas, durante os três dias consecutivos.

Tabela 20. Valores de Cts das RT-qPCRs, frente RNA do AV- CTD.

Amostras	Analista 1							Analista 2						
	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7
1d	19,14	19,85	21,98	25,28	24,05	26,09	25,85	17,53	20,90	22,88	23,29	23,34	27,96	27,87
	18,11	22,24	22,32	24,04	24,68	25,17	27,44	18,68	21,91	23,56	24,34	23,28	26,48	26,49
	18,54	21,86	21,70	24,98	24,23	-	27,09	18,57	19,80	22,71	24,66	22,89	27,57	23,49
2d	20,05	19,84	23,44	24,73	24,79	27,11	26,64	19,16	22,87	21,62	23,80	24,15	27,90	33,69
	20,59	21,86	22,72	25,64	24,65	26,73	26,88	19,47	24,66	21,95	23,78	24,41	28,21	29,25
	20,20	21,01	23,24	24,39	23,73	25,95	26,19	18,98	24,81	22,13	23,42	24,89	29,14	29,75
3d	17,34	19,79	22,00	22,97	23,86	27,02	33,63	18,86	20,61	21,74	25,06	28,70	30,64	-
	17,48	20,54	21,04	22,46	24,03	28,77	26,39	18,73	20,28	21,22	25,53	27,58	27,19	28,21
	18,10	20,47	21,15	21,68	24,20	24,91	28,91	18,76	19,61	20,40	24,27	33,26	-	27,55

(-) não detectado

As RT-qPCRs realizadas para o AV- CTD mostraram que na avaliação da repetitividade, o coeficiente de variação dos analistas se manteve próximo a 4,5%, sendo maiores que os encontrados para os AV- BR 64 e AV- PF e que houve diferença significativa entre as medidas em relação aos dias para os analistas (Tabela 21).

Tabela 21. Análise de variância, RT-qPCR para o AV- CTD (Repetitividade)

Analista 1				Analista 2			
S ²	S	CV	dias	S ²	S	CV	dias
1,18	1,09	4,64	sign	1,17	1,08	4,52 %	Sign

Os valores da incerteza da medição apresentados na Tabela 22 foram considerados semelhantes entre os analistas. No entanto, a avaliação dos componentes da variação mostrou que o analista 2 teve a maior porcentagem do erro total da medida influenciado pelo pela variável do dia, com valor de 19,48% (Tabela 23).

Tabela 22. Incerteza da medição. RT-qPCR para o AV- CTD (Repetitividade)

Analista 1			Analista 2		
IPE _x	Média Ct	IC (95%)	IPE _x	Média Ct	IC (95%)
U= 2,20		Y ± U	U= 2,19		Y ± U
1,72-2,67	23,42	21,22-25,61	1,71- 2,67	23,97	21,78-26,16

Tabelas 23. Componentes da variação, RT-qPCR para o AV- CTD (Repetitividade)

Analista 1			Analista 2		
Componentes da variação (%)			Componentes da variação (%)		
Dias	Erro	Total erro da medida %	Dias	Erro	Total erro da medida %
7,09	10,58	17,67	19,48	7,71	27,19

Os dados da análise da reprodutibilidade são apresentados nas tabelas 24, 25 e 26. O CV entre os analistas foi de 4,58% é semelhante aos valores da avaliação de repetitividade. Não houve diferença significativa das medidas entre os analistas, porém foi considerada significativa entre os dias.

Tabela 24. Análise de variância, RT-qPCR para o AV- CTD (reprodutibilidade)

S ²	S	CV	Dias	Analista
1,18	1,09	4,58 %	sign	ns

Na análise da incerteza observamos que o valor médio do Ct foi maior do que os obtidos na avaliação da repetitividade. Observou-se, mais uma vez, que o erro total não foi influenciado pelo analista, mas somente pelo dia e pelo próprio erro na análise.

Tabela 25. Incerteza da medição, RT-qPCR para o AV- CTD (reprodutibilidade)

IPE _x	Média Ct	IC (95%)
U= 2,16		Y ± U
1,83 - 2,49	27,30	25,14 - 29,46

Tabelas 26. Componentes da variação, RT-qPCR para o AV- CTD (reprodutibilidade)

Dias	Analista	Erro	Total erro da medida %
13,76	0,00	8,67	22,43

3.5 Verificações de desempenho das amostras de epitélios contaminadas nos equipamentos Roche LC 480 e Biorad CFX 96 – C1000

3.5.1 Verificação das RT-qPCRs para os RNAs do AV- BR 64 nos equipamentos Roche LC 480 e Biorad CFX 96 – C1000

A Tabela 27 apresenta os valores de Cts obtidos nas RT-qPCRs realizadas com o RNA do AV- BR 64, por um analista em dois equipamentos (termocicladores) diferentes, durante três dias consecutivos.

Tabela 27. Valores de Cts das RT-qPCRs com o RNA do AV BR 64 - Roche LC 480 e Biorad CFX 96 – C1000

Amostras	Equipamento 1							Equipamento 2						
	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7
1d	22,15	24,58	27,38	26,14	28,27	29,63	30,86	20,82	23,02	23,01	25,52	27,06	31,30	28,89
	22,49	25,41	27,16	26,00	28,50	29,96	-	20,57	22,89	23,03	25,39	27,20	28,78	28,91
	22,35	25,21	27,51	26,85	27,89	29,94	30,80	20,78	23,20	23,31	25,47	27,33	29,12	29,01
2d	23,30	24,33	25,38	25,66	27,34	30,91	27,39	22,25	23,00	23,47	25,67	26,15	-	27,19
	24,52	24,15	25,45	25,74	27,26	30,06	28,21	22,59	23,01	23,43	25,23	26,98	28,28	28,45
	23,99	24,24	25,21	25,91	27,82	28,65	29,36	22,58	22,10	23,03	25,57	26,02	29,71	28,41
3d	22,97	28,29	24,30	27,07	28,77	32,87	32,96	21,35	22,27	23,30	25,86	26,88	-	28,90
	23,85	29,29	24,96	26,56	27,77	27,94	30,08	20,88	22,68	23,29	25,77	29,50	31,07	28,98
	22,59	28,37	25,30	27,00	27,51	33,70	30,18	21,46	22,86	23,38	25,61	26,44	31,08	28,97

(-) não detectado

A reprodutibilidade foi avaliada com a realização das RT-qPCRs em um segundo equipamento. Os resultados para o AV- BR 64 são apresentados nas tabelas 28, 29 e 30. O coeficiente de variação de 2,93 % foi próximo ao encontrado na reprodutibilidade entre os dois analistas (Tabela 10). Houve diferença significativa entre as medidas tanto entre os dias, quanto entre os equipamentos.

Tabela 28. Análise de variância, RT-qPCR para o AV- BR 64 - Roche LC 480 e Biorad CFX 96 – C1000

S^2	S	CV	dias	equipamentos
0,59	0,77	2,93 %	sign	sign

Os valores da incerteza da medição também foram semelhantes aos valores da reprodutibilidade obtidas entre os dois analistas, apresentado na Tabela 11.

Tabela 29. Incerteza da medição, RT-qPCR para o AV- BR 64 - Roche LC 480 e Biorad CFX 96 – C1000

IPE _x	Média Ct	IC (95%)
U= 1,53		Y ± U
1,29-1,76	30,19	28,66-31,72

A avaliação dos componentes da variação mostrou que todas as fontes contribuíram na composição do percentual do erro da medida, influenciado principalmente pelo componente “equipamento”.

Tabelas 30. Componentes da variação, RT-qPCR para o AV- BR 64 - Roche LC 480 e Biorad CFX 96 – C1000

Componentes da variação (%)			
Dias	Equipamentos	Erro	Total erro da medida %
8,30	13,84	6,05	28,19

3.5.2 Verificação das RT-qPCRs para os RNAs do AV- PF nos equipamentos Roche LC 480 e Biorad CFX 96 – C1000

A Tabela 31 apresenta os valores de Cts obtidos nas RT-qPCRs realizadas com o RNA do AV- PF, por um analista, nos equipamentos Roche LC 480 e Biorad CFX 96 – C1000, durante três dias consecutivos.

Tabela 31. Valores de Cts das RT-qPCRs, frente RNA do AV- PF - Roche LC 480 e Biorad CFX 96 – C1000

Amostras	Equipamento 1							Equipamento 2						
	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7
1d	19,03	21,26	21,31	24,46	24,89	28,31	30,79	21,19	23,19	22,64	27,19	27,44	28,79	30,00
	19,39	21,72	21,43	25,15	24,63	27,76	29,27	21,72	23,25	23,03	26,48	25,98	29,11	29,72
	18,92	21,34	21,44	25,19	23,75	27,69	28,86	21,95	23,25	21,98	27,40	25,78	28,36	32,41
2d	21,85	20,85	22,07	25,69	25,25	27,27	26,61	21,17	21,34	22,73	25,73	26,02	26,10	28,00
	20,16	20,71	22,09	25,95	25,22	27,27	26,78	21,29	21,06	22,19	26,74	32,67	28,28	-
	20,37	20,93	21,96	25,46	25,24	25,88	26,77	20,54	21,09	22,19	26,16	25,42	28,49	27,26
3d	17,82	18,80	20,39	23,97	26,65	27,58	26,78	21,13	20,96	22,25	27,01	28,61	32,15	31,19
	17,57	19,28	19,97	23,93	26,66	28,02	26,38	21,28	21,45	22,65	26,48	27,46	31,73	-
	17,23	18,87	19,87	23,55	26,64	27,62	26,86	21,21	21,51	23,04	27,19	29,22	31,58	30,12

(-) não detectado

A análise da variância mostrou o coeficiente de variação de 3,35 % e do mesmo modo como apresentado para o AV- BR 64. Houve diferença significativa entre as medidas realizadas diferentes dias e em equipamentos distintos. Os valores da incerteza da medição foram semelhantes aos obtidos na avaliação da reprodutibilidade entre os dois analistas, porém na avaliação dos componentes da variação, o erro total foi influenciado por todas as fontes de variação. As tabelas 32, 33 e 34 apresentam os

valores da variância, incerteza da medição e dos componentes da variação da reprodutibilidade avaliada entre dois equipamentos.

Tabela 32. Análise de variância, RT-qPCR para o AV- PF - Roche LC 480 e Biorad CFX 96 – C1000

S ²	S	CV	Dias	Equipamentos
0,68	0,82	3,35 %	sign	sign

Tabela 33. Incerteza da medição, RT-qPCR para o AV- PF - Roche LC 480 e Biorad CFX 96 – C1000

IPE _x	Média Ct	IC (95%)
U= 1,64		Y ± U
1,39-1,89	28,44	26,81-30,08

Tabelas 34. Componentes da variação, RT-qPCR para o AV- PF- Roche LC 480 e Biorad CFX 96 – C1000

Componentes da variação (%)			
Dias	Equipamentos	Erro	Total erro da medida %
8,56	8,79	4,62	21,97

3.5.3 Verificação das RT-qPCRs para os RNAs do AV- CTD nos equipamentos Roche LC 480 e Biorad CFX 96 – C1000

A Tabela 35 apresenta os valores de Cts obtidos nas RT-qPCRs realizadas com o RNA do AV- CTD, por um analista em dois equipamentos (termocicladores) diferentes, durante três dias consecutivos.

Tabela 35. Valores de Cts das RT-qPCRs, frente RNA do vírus AV- CTD - Roche LC 480 e Biorad CFX 96 – C1000

Amostras	Equipamento 1							Equipamento 2						
	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7
1d	19,14	19,85	21,98	25,28	24,05	26,09	25,85	17,64	20,31	21,36	25,05	24,71	26,96	27,80
	18,11	22,24	22,32	24,04	24,68	25,17	27,44	17,82	19,78	21,41	29,91	24,34	-	27,02
	18,54	21,86	21,70	24,98	24,23	-	27,09	18,02	19,27	21,26	24,43	25,10	26,67	26,43
2d	20,05	19,84	23,44	24,73	24,79	27,11	26,64	19,32	21,09	22,69	23,70	25,17	26,15	27,02
	20,59	21,86	22,72	25,64	24,65	26,73	26,88	19,39	21,25	22,90	23,95	24,74	27,08	27,13
	20,20	21,01	23,24	24,39	23,73	25,95	26,19	18,41	21,28	22,11	23,48	25,00	26,26	26,23
3d	17,34	19,79	22,00	22,97	23,86	27,02	33,63	17,70	20,31	20,12	23,23	25,39	-	30,89
	17,48	20,54	21,04	22,46	24,03	28,77	26,39	18,00	20,55	20,29	23,36	24,61	28,06	25,46
	18,10	20,47	21,15	21,68	24,20	24,91	28,91	17,24	19,56	19,92		26,64	29,08	25,62

(-) não detectado

A tabela 36 mostra os valores da análise da variância para o AV- CTD. O coeficiente de variação de 4,62% foi semelhante ao encontrado na avaliação da reprodutibilidade entre os analistas. Houve diferença significativa entre as medidas com relação aos dias, o que não foi observado em relação aos equipamentos.

Tabela 36. Análise de variância, RT-qPCR para o vírus AV- CTD - Roche LC 480 e Biorad CFX 96 – C1000

S ²	S	CV	Dias	Equipamentos
1,16	1,08	4,62	sign	ns

Do mesmo modo que na avaliação de reprodutibilidade entre os analistas, os valores da incerteza da medição foram considerados semelhantes, e o erro total do

componente da variação foi influenciado apenas pelas variáveis do dia e erro da análise (Tabela 37 e 38)

Tabela 37. Incerteza da medição, RT-qPCR para o vírus AV- CTD - Roche LC 480 e Biorad CFX 96 – C1000

IPE _x	Média Ct	IC (95%)
U= 2,15		Y ± U
1,81-2,48	26,80	26,65-28,95

Tabelas 38. Componentes da variação, RT-qPCR para o AV- CTD - Roche LC 480 e Biorad CFX 96 – C1000

Componentes da variação (%)			
Dias	Equipamentos	Erro	Total erro da medida %
5,51	0,00	9,35	14,86

A partir dos dados anteriores, consideramos que em nosso estudo, a análise da variância para os três vírus demonstrou que todas as RT-qPCRs apresentaram valores de CV considerados baixos, sendo o maior encontrado nos ensaios com o AV-CTD de 4,64%. Estes valores assemelham-se aos obtidos por Rasmusse et al. (2005), Goris et al. (2009), e Vandemeulebroucke et al.(2010). Segundo o último autor, nenhum critério internacional de aceitabilidade foi descrito para os valores de CV nos ensaios de repetitividade e reprodutibilidade, a exceção do publicado para técnica de ELISA pela OIE, 2008, que indica o CV máximo de 20%.

Os valores encontrados em nosso estudo estão ainda em acordo com Barbosa (2010) que estabeleceram que os CV podem oscilar de 20 a 30%. Do mesmo modo, os coeficientes de variação foram considerados baixos quando as RT-qPCRs foram realizadas em um segundo equipamento, indicado que os ensaios apresentaram uma boa reprodutibilidade. Segundo Hole et al. (2010), isto constitui um excelente benefício por não haver necessidade de mudança nos protocolos para realização dos ensaios em um segundo equipamento.

Na avaliação da repetitividade, o AV- BR 64, AV- PF e AV-CTD apresentaram os mesmos resultados de significância para o componente “dia”, e na reprodutibilidade, os resultados foram também os mesmos tanto para o componente “dia” quanto para “analista”.

Referente aos resultados da reprodutibilidade avaliada frente aos dois equipamentos, para o AV BR 64 e AV- PF, os resultados da significância foram os mesmos e significativos para os componentes “dias” e “equipamentos”, porém foram diferentes para o AV- CTD, uma vez que foi significativo apenas para o componente “dia”, mas não para o “equipamento”.

Devemos considerar que as causas possíveis das variações das medidas podem estar ligadas as etapas da extração e manipulação volumétrica das amostras. Além disso, Goris et al. (2009) constataram que o efeito matriz é considerado fonte de variação dos resultados , o que em nosso estudo pode ter acontecido principalmente na etapa de contaminação das amostras. Ainda, segundo a OIE, (2008), as possíveis fontes de variação nos estudos da repetitividade incluem a amostragem, as condições de armazenamento das amostras, métodos de extração, manipulação volumétrica, analista, equipamentos, contaminações, condições ambientais, entre outras randômicas.

Em relação aos componentes da variação, os resultados indicam que a repetitividade foi influenciada pelo dia e pelo erro do ensaio, assim como a reprodutibilidade medida entre os dois analistas. Porém, quando a reprodutibilidade foi avaliada entre os dois equipamentos, evidenciou-se variação que contribuiu para o valor final do erro da medida, exceto para o AV- CTD.

Neste estudo, nenhum ensaio apresentou valor do erro total da medida superior a 30%, estando em conformidade com o recomendado pelo guia de verificação de desempenho do MAPA (2015). Por último, os valores da incerteza da medição foram apresentados na avaliação de repetitividade e da reprodutibilidade. Os valores da incerteza expandida, dos Cts médios e da zona de confiança variaram entre as RT-qPCRs. Para o AV- BR 64 os Cts médios foram aproximadamente de 27 para os analistas e de 30, na avaliação da reprodutibilidade.

O AV- PF e AV- CTD apresentaram valores de Cts médios próximos, entre 23 e 24, respectivamente, na avaliação da repetitividade e de aproximadamente 27 na reprodutibilidade. Na avaliação da reprodutibilidade entre os equipamentos os Cts médios variaram entre RNAs pesquisados e foram de 30.19, 28.44 e 26.80, para os AV- BR 64, AV- PF e AV- CTD, respectivamente.

Ainda em relação à incerteza da medição expandida o maior valor apresentado foi de $U= 2,20$, referente a incerteza da RT-qPCR do Alagoas vesiculovírus Custódia, (Tabela 22). Todos os valores encontrados foram menores do que os encontrados por Dias et. al., (2014), com $U= 3,12$ na avaliação da reprodutibilidade de uma PCR para Peste Suína Clássica.

Goris et al (2009), utilizaram a quantificação da incerteza da medição para avaliar a probabilidade da medida quantitativa em fornecer os mesmos resultados, em termos de qualitativos, positivo ou negativo, em repetidos testes. Ainda de acordo com Goris et al. (2009), a incerteza da medição constitui uma boa ferramenta para a decisão da escolha da utilização de um segundo método de diagnóstico para se alcançar com segurança, o verdadeiro *status* de infecção do animal.

De modo diferente, em nosso estudo, a incerteza da medição teve como objetivo apenas apresentar os valores da incerteza expandida, avaliada com a variação dos Cts a partir do valor médio alcançado por cada analista na repetitividade e daqueles da reprodutibilidade, entre os diferentes dias, analistas e equipamentos. Os valores apresentados para o intervalo de confiança indicaram com 95% de probabilidade a faixa do verdadeiro valor do Ct do mensurando, referentes unicamente aos dados amostrais do estudo. Assim, é importante dizer que a incerteza da medição não foi utilizada para se estabelecer valores de ponto de corte para as RT-qPCRs ensaiadas. Outra justificativa da implementação do estudo da incerteza da medição está em atender ao preconizado na normas de qualidade, uma vez que ele fornece parâmetros para a avaliação de desvios nos ensaios de diagnóstico (ABNT NBR ISO/IEC17025).

3.6 Verificações de desempenho das amostras clínicas

A tabela 39 apresenta os resultados dos valores dos Ct(s) das RT-qPCR(s) para amostras de isolados clínicos do *Alagoas vesiculovirus*. Os resultados das sete amostras são apresentados, em triplicata, para cada um dos dois analistas durante os três dias de prova.

Tabela 39. Valores de Cts das RT-qPCRs, frente RNA de *Alagoas vesiculovirus* em amostras clínicas.

		Analista 1							Analista 2						
		Amostras							Amostras						
		1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7
1d		19,14	23,95	28,52	23,95	25,25	23,90	24,43	17,53	25,21	28,10	24,88	25,78	23,82	25,91
		18,11	24,68	29,14	22,87	25,34	24,90	25,23	18,68	24,86	28,55	24,96	26,11	24,42	25,98
		18,54	24,41	27,84	23,64	25,32	24,61	25,53	18,57	24,63	28,78	24,51	26,41	24,13	25,49
2d		20,05	26,85	30,38	25,74	27,00	24,60	27,11	19,16	26,73	29,92	25,66	32,41	25,85	25,88
		20,59	26,93	30,50	25,80	27,16	25,02	26,55	19,47	26,75	29,92	25,22	27,42	25,30	26,27
		20,20	26,99	30,75	25,84	27,20	25,33	27,32	18,98	25,91	29,45	25,14	26,43	25,37	26,58
3d		17,34	25,93	30,74	25,29	26,29	24,81	27,89	18,86	26,04	29,83	24,96	27,14	24,84	26,51
		17,48	25,87	31,24	25,63	26,00	24,38	26,40	18,73	26,09	29,88	25,13	27,47	24,82	26,28
		18,10	26,06	30,55	25,10	25,86	24,32	27,00	18,76	25,87	29,57	25,03	27,64	24,80	26,78

As tabelas 40, 41 e 42 apresentam, respectivamente, os valores da análise de variância, da incerteza da medição e dos componentes da variação obtidos no estudo da repetitividade da RT-qPCR para o vírus *Alagoas*, amostras clínicas.

A análise da variância mostra que houve diferença significativa entre as medidas em relação ao dias, para ambos os analistas.

Tabela 40. Análise de variância, RT-qPCR para o *Alagoas vesiculovirus* em amostras clínicas (Repetitividade)

		Analista 1				Analista 2			
		S ²	S	CV	Dias	S ²	S	CV	Dias
		0,15	0,39	1,55 %	sign	0,57	0,76	2,99 %	Sign

A avaliação dos valores da incerteza da medição apresentados na tabela 41, mostra que os resultados foram semelhantes para os analistas, principalmente em relação aos valores do Ct médio.

Tabela 41. Incerteza da medição. RT-qPCR para o *Alagoas vesiculovirus* em amostras clínicas (Repetitividade)

Analista 1			Analista 2		
IPEX	Média	IC (95%)	IPEX	Média Ct	IC (95%)
U= 0,79	Ct	Y ± U	U= 1,53		Y ± U
0,62-0,96	25,23	24,44-26,02	1,20-1,85	25,34	23,81-26,86

Tabela 42. Componentes da variação, RT-qPCR para o *Alagoas vesiculovirus* em amostras clínicas (Repetitividade)

Analista 1			Analista 2		
Componentes da variação (%)			Componentes da variação (%)		
Dias	Erro	Total erro da medida %	Dias	Erro	Total erro da medida %
10,11	1,28	11,39	3,12	4,95	8,07

Os valores da análise de variância, da incerteza da medição e dos componentes da variação obtidos no estudo da reprodutibilidade das RT-qPCR em amostras clínicas são apresentados nas tabelas 43, 44 e 45. Não houve diferença significativa entre os analistas, porém, isto foi observado entre os dias.

Tabela 43. Análise de variância, RT-qPCR para o *Alagoas vesiculovirus* em amostras clínicas (reprodutibilidade)

S ²	S	CV	Rodadas	Analistas
0,36	0,60	2,38 %	sign	Ns

O Cts médio de 24,73 foi considerado próximo aos resultados obtidos por cada um dos analistas na avaliação de repetitividade.

Tabela 44. Incerteza da medição, RT-qPCR para o *Alagoas vesiculovirus* em amostras clínicas (reprodutibilidade)

IPEx	Média Ct	IC (95%)
U= 1,20		Y ± U
1,02-1,38	24,73	23,54-25,93

A verificação da reprodutibilidade das amostras clínicas aponta que o erro total não foi influenciado pelo componente dos analistas e que os valores foram semelhantes aos mostrados na tabela da repetitividade.

Tabelas 45. Componentes da variação, RT-qPCR para o *Alagoas vesiculovirus* em amostras clínicas (reprodutibilidade)

Componentes da variação (%)				
	Dias	Analista	Erro	Total erro da medida %
Total %	6,59	0,00	3,04	9,64

No estudo das amostras clínicas de animais naturalmente infectados, foi avaliado também o desempenho da RT-qPCR para *Alagoas vesiculovirus* em isolados do Lanagro-MG. Foram utilizadas sete amostras de epitélios e as RT-qPCRs apresentaram na análise de variância, valores de CV na repetitividade de 1,55 % e 2,99 % e para o primeiro e segundo analista respectivamente, e de 2,38 % na reprodutibilidade. Estes valores foram menores do que aqueles obtidos nos ensaios com

as amostras contaminadas. Do mesmo modo como apresentado para a verificação das amostras contaminadas, os valores de CV foram comparáveis aos obtidos por Rasmussem et al. (2005), Goris et al. (2009), e Vandemeulebrouckea et al. (2010).

Os erros totais das medidas da repetitividade e da reprodutibilidade foram menores que 10 %, influenciados pelos dias e erro da análise (tabelas 42, 45). Estes valores foram considerados bem menores que aqueles obtidos no estudo com as amostras contaminadas. Nenhum ensaio apresentou valor do erro total da medida superior a 30 %, conforme recomendado pelo guia de verificação de desempenho do MAPA (2015).

A incerteza da medição avaliada apresentou valores semelhantes para os dois analistas. Os ensaios com amostras clínicas mostraram na incerteza da medição, valores de Cts médios semelhantes de 25,23 e 25,34 para o primeiro e segundo analistas na avaliação da repetitividade, e de 24,73 para a reprodutibilidade e representaram com maior fidelidade, o real *status* infeccioso do animal.

3.7 Análise de concordância entre RT-qPCR e RT-PCR a partir de amostras clínicas.

A tabela 46 apresenta os resultados referentes à avaliação da concordância entre a RT-qPCR e a RT-PCR obtidos pelo teste de Kappa de 0,78.

Tabela 46. Resultado da concordância entre a RT-qPCR e RT-PCR

		RT-qPCR		
		Positivo	Negativo	Total
RT-PCR	Positivo	31	06	37
	Negativo	04	57	61
	Total	35	63	98

$N1 = (PP+PN)$; $N2 = (NP+NN)$; $N3 = (PP+NP)$; $N4 = (PN+NN)$

O valor de Kappa de 0,78 indicou que houve uma substancial concordância entre os dois ensaios e valores semelhantes foram também encontrados por Gasparini, (2014). Foi observado que quatro amostras foram positivas na RT-qPCR e negativas na RT-PCR, enquanto, seis amostras foram amplificadas somente na RT-

PCR, provavelmente pela possível ausência das sequências alvos para iniciadores utilizados na RT-qPCR.

Várias pesquisas têm sido realizadas visando à padronização de ensaios de RT e RT-qPCR para o diagnóstico da estomatite vesicular. Rasmussen e colaboradores (2005) desenvolveram uma RT-qPCR para amplificação do gene L e Wilson e colaboradores (2009) uma RT-qPCR, para amplificação do gene N, ambas objetivando a diferenciação do *New Jersey e Indiana vesiculovirus*. O objetivo daquele estudo com os referidos vírus se deve ao fato de serem eles os responsáveis pelo surgimento de focos da doença nas Américas do Norte e Central, mas, no entanto e de acordo com os autores, as RT-qPCRs não foram padronizadas para a detecção dos Alagoas e Cocal vesiculovírus. Hole et al. (2006 e 2010) padronizaram RT-qPCR para a diferenciação dos *New Jersey, Indiana, Cocal e Alagoas vesiculovírus*. Nestes trabalhos foram utilizadas amostras de isolados dos América do Norte, Central e alguns protótipos da América do sul. Os autores apontaram que as RT-qPCRs não foram capazes diferenciar o *Indiana*, o *Cocal* e o *Alagoas vesiculovírus*, indicando a necessidade da realização de ensaios com isolados de campo desses vírus.

No Brasil foram realizadas poucas as pesquisas relacionadas ao diagnóstico da estomatite vesicular com a utilização da biologia molecular. Sepúlveda et al. (2007) avaliaram um ensaio de RT-PCR com iniciadores que amplificaram parcialmente o gene que codifica para a proteína “P” dos sorotipos *New Jersey e Indiana vesiculovirus*. Bonutti & Figueiredo (2005) padronizaram uma RT-PCR para a detecção do gene G do *Piry, Carajás, Cocal e Alagoas vesiculovírus*, que necessitou da realização de uma nested PCR para a diferenciação entre eles. Tolardo et al. (2016) desenvolveram a RT-qPCR com iniciadores dirigidos para a região conservada da glicoproteína do *Piry vesiculovirus* e que foi capaz de detectar o genoma do *Alagoas vesiculovirus* em amostras de soro de animais oriundos do foco de 2013, ocorrido no estado da Paraíba e Rio Grande do Norte.

Atualmente, o LDDV e LBM pertencentes ao Lanagro-MG são os responsáveis pelo diagnóstico oficial das enfermidades vesiculares no território nacional. O MAPA conta ainda com mais duas unidades laboratoriais localizadas nos estados, do Pará e do Pernambuco, que participam dos programas das enfermidades vesiculares. Embora o principal objetivo do nosso trabalho fosse o desenvolvimento e a validação do ensaio para o diagnóstico diferencial do *Alagoas vesiculovírus*, ressalta-se,

baseado na característica de variabilidade dos vírus, a necessidade continua da pesquisa ensaios capazes de detectar o maior número de variantes presentes no campo.

Em face das características geográficas brasileiras, e de acordo com Wilson et al. (2009), fatores como, a coleta de amostras tardia, a qualidade e a inativação viral que pode ocorrer durante a etapa de encaminhamento das amostras ao laboratório, podem determinar a perda de valor de diagnóstico em provas de isolamento viral. Deste modo, considera-se que a reação em cadeia da polimerase ora validada, constituiu uma ferramenta de grande sensibilidade para o diagnóstico das doenças vesiculares.

Consideramos também que, a RT-qPCR padronizada em nosso estudo foi pioneira na utilização de iniciadores que visam à detecção de alvos para o *Alagoas vesiculovirus*, que é descrito como responsável pela maioria dos focos da doença no Brasil. O desenvolvimento e validação do presente ensaio de RT-qPCR vem ao encontro da necessidade contínua do estudo com o vírus da estomatite vesicular por ser o principal agente causador de enfermidades vesiculares indistinguíveis da febre aftosa.

4 CONCLUSÕES

Baseado nos dos apresentados concluímos que:

A RT-qPCR apresentada teve em sua padronização a utilização de um conjunto de iniciadores e sondas capazes de determinar ensaios com alta sensibilidade e especificidade na pesquisa de alvos do *Alagoas vesiculovirus*.

Em relação aos parâmetros da validação, o ensaio demonstrou ter excelente repetitividade avaliada para cada analista, e reprodutibilidade avaliada entre os analistas e equipamentos, tanto naqueles realizados com matrizes contaminadas como nas de amostras de animais naturalmente infectados.

A análise da variância mostrou que os coeficientes de variação encontrados no estudo estão em acordo com aqueles relatados por outros pesquisadores.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT NBR ISO/IEC 17025. Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração, 31p, 2005.

ALONSO, A.; SONDAHL, M.S. Antigenic and immunogenic characterization of various strains of the Indiana serotype of vesicular stomatitis isolated in Brazil. *Boletim Centro Panamericano Fiebre Aftosa*, p. 25–30, 1985.

ALONSO, A.; MARTINS, M.A.; GOMES, M.P.D.; ALLENDE, R.; SÖNDAHL, M.S. Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection, typing and sub typing of vesicular stomatitis virus. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.3, p.287-292, 1991.

BONUTTI D. W.; FIGUEIREDO, L. T. M. Diagnosis of Brazilian vesiculoviruses by reverse transcription polymerase chain reaction. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, v. 100, n.2, p.193-196, 2005.

BIELANSKI, A.; ALGIRE, J.; LALONDE, A.; NADIN-DAVIS, S. Transmission of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) via in vitro-fertilized embryos to recipients, but not to their offspring. *Theriogenology*, v.71, p.499- 508, 2009.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária, 2012. Definição de caso de Estomatite Vesicular e Fluxo de doenças Vesiculares. Circular DSA nº 155 de 31.08.12, MAPA, Brasília.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária, 2015. Manual de verificação de desempenho de métodos para diagnóstico molecular de doenças infecciosas na rede nacional de laboratórios agropecuários, 57p. MAPA, Brasília.

BELÀK, S. Molecular diagnosis of viral diseases, presente trends and future aspects. A view from the OIE Collaborating Centre for the Application of Polymerase Chain Reaction Methods for Diagnosis of Viral Diseases in Veterinary Medicine. *Vaccine*, v.25, p.5444-5453, 2007.

BROEDERS, S.; HUBER, I.; GROHMANN, L.; BERBEN, G.; TAVERNIERS, I.; MAZZARA, M.; ROOSENS, N.; MORISSET, D. Guidelines for validation of real-time PCR methods. *Trends in Food Science & Technology*, v.37, p.115-126, 2014.

CARGNELUTTI, J.F.; OLINDA, R.G.; MAIA, L.A.; AGUIAR, M.N.; NETO, E.G.M.; SIMÕES, S.V.D.T.; LIMA, T.G.; DANTAS, A.F.M.; WEIBLEN, R.; FLORES, E.F.; RIET-CORREA, F. Outbreaks of *Vesicular stomatitis Alagoas virus* in horses and cattle in northeastern Brazil *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.26, n.6, p. 788–794. 2014.

DRIGO, M.; FRANZO, G.; BELFANTI, I.; MARTINI, M.; MONDIN, A.; CEGLIE, L. Validation and comparison of different end point and real time RT-PCR assays for detection and genotyping of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of Virological Methods*, v.201, p.79–85, 2014.

De STEFANO, E.; ARAÚJO, W.P; PASSOS, E.C.; PITUCO. E. M. Estomatite Vesicular- Revisão de Literatura. *Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo*, v.69, n.3, p. 127-133, 2002.

DIAS, N. L.; FONSECA Jr, A. A.; OLIVEIRA, A. M.; SALES, E. B.; ALVES, B. R. C.; DORELLA. F. A.; CAMARGOS, M. F. Validation of a real time PCR for Classical Swine Fever diagnosis. *Hindawi Publishing Corporation Veterinary Medicine International*, p. 1-4, 2014.

FERNANDÉZ, J.; AGUERO, M.; ROMERO, L.; SÁNCHEZ, C.; BÉLAK, S.; ARIAS, M.; VIZCAÍNO-SANCHEZ, J.M. Rapid and differential diagnosis of Foot-and-Mouth Disease, Swine Vesicular Disease, and Vesicular Stomatitis by a new multiplex RT-PCR assay. *Journal of Virological Methods*, v.147, p.301-311, 2008.

GASPARINI, M. R. Desenvolvimento de testes para triagem de amostras de sêmen bovino para *Bovine viral diarrhoea virus* e *Bluetongue virus* utilizando RT-PCR convencional e em tempo real (qRT-PCR). 2014. 125p. Tese de doutorado. Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2014.

GORIS, N.; VANDENBUSSCHE, F.; HERR, C.; JEROME VILLERS, J.; VAN DER STEDE, Y.; DE CLERCQ, K. Validation of two real-time RT-PCR methods for foot-and-mouth disease diagnosis: RNA-extraction, matrix effect, uncertainty of measurement and precision. *Journal of Virological Methods*, v.160, p.157–162, 2009.

HOLE, K.; CLAVIJO, A.; PINEDA, L.A. Detection and serotype-specific differentiation of vesicular stomatitis virus using a multiplex, real-time, reverse transcription-polymerase chain reaction assay. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.18, p.139–146 2006.

HOLE, K.; VELAZQUES-SAKINAS, L.; CLAVIJO, A. Improvement and optimization of a multiplex real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay for the detection and typing of Vesicular stomatitis virus. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.22, p.428–433, 2010.

ICTVdb: *International Committee on Taxonomy of Viruses*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/>. Accessed 12 jun 2015.

LETCHWORTH, G.J.; RODRIGUEZ, L.L.; DEL CBARRERA, J. Vesicular stomatitis. *Vet. J.* v.157 n.3, p. 239–260, 1999.

LI, Y.; HUANG, X.; BO XIA.; ZHENG, C. Development and validation of a duplex quantitative real-time RT-PCR assay for simultaneous detection and quantitation of foot-and-mouth disease viral positive-stranded RNAs and negative-stranded RNAs. *Journal of Virological Methods*, v.161, p.161–167, 2009.

MOONEN, P.; BOONSTRA, J.; VAN DER HONING, R.; BOONSTRA-LEENDERTSE, C.; JACOBS, L.; DEKKER, A. Validation of a Light Cycler-based reverse transcription polymerase chain reaction for the detection of foot-and-mouth disease virus. *Journal of Virological Methods*, v.113, p.35-41, 2003.

OIE - World Organization for Animal Health. *Vesicular Stomatites: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. Paris, FR, 2012, capítulo 2.1.19. Disponível em: <http://www.oie.int/Eng/normes/mmanual/A_index.htm>. Acesso em: 12 jul. 2013.

PAUSZEK, S. J.; BARRERA, J.C.; GOLDBERG, T.; ALLENDE, R.; RODRIGUEZ, L.L. Genetic and antigenic relationships of vesicular stomatitis viruses from South America. *Arch Virol.*, v.156 n.11, p.1961-1968, 2011.

PEREZ, A.M.; PAUSZEK, S.J.; JIMENEZ, D.; KELLEY, W.N.; WHEDBEE, Z.; RODRIGUEZ, L.L. Spatial and phylogenetic analysis of vesicular stomatitis virus overwintering in the United States. *Preventive Veterinary Medicine*, v.93, p.258–264, 2010.

PINHEIRO DE OLIVEIRA, T.F.; FONSECA JR, A.A.; CAMARGOS, M.F.; OLIVEIRA, A.M.; COTTORRELO, A.C.P.; ADOS R. S.; ALMEIDA I.G.; HEINEMANN, M.B. Detection of contaminants in cell cultures, sera and trypsin. *Biologicals*. v. 41, p.407-14, 2013.

REED, L. J., MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *American Journal Hygiene*, v.27, n.3, 493-498, 1938.

REIF, J.S., WEBB, P.A., MONATH, T.P., EMERSON, J.K., POLAND, J.D., KEMP, G.E. & CHOLAS, G. Epizootic vesicular stomatitis in Colorado, 1982:infection in occupational risk groups. *American J. of Trop. Med. and Hyg.* **36**, 177–82, 1987.

RODRIGUEZ, L.; BATISTA, H. R.; ROEHE, P. M.; KURATH, G. Rhabdoviridae. In: FLORES, E. F. *Virologia Veterinária*. 1. ed. Santa Maria: Ed. UFSM, 2007. p. 689-719.

RASMUSSEN, T.B.; UTTENTHAL, A.; FERNANDEZ, J.; STORGAARD, T. Quantitative multiplex assay for simultaneous detection and identification of and New Jersey serotypes of vesicular stomatitis virus. *J. Clin. Microbiol.*, v.43, p.356–362, 2005.

RODRIGUEZ, L.L.; PAUSZEK, S.J.; BUNCH, T.A.; SCHUMANN, K.R.. Full-length genome analysis of natural isolates of vesicular stomatitis virus (Indiana 1 serotype) from North, Central and South America. *J. Gen. Virol.*, v.83, p.2475–2483, 2002.

SAMPAIO, I.B.M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. 3 ed. Belo Horizonte. FEP – MVZ, 2010.

SEPULVEDA, L. M.; BERGMANN, I.E.; MANTILLA, A.; NASCIMENTO, E.R. Rapid diagnosis of vesicular stomatitis virus in Ecuador by the use of polimerase chain reactios. *Braz. J. Microbiol.*, vol.38, n.3, p.500-506, 2007

UNTERGASSER, A.; NIJVEEN, H.; RAO, X.; BISSELING, T.; GEURTS, R.; LEUNISSEN, J.A. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res.*, v.35, p.71-4, 2007.

TOLARDO, A. L.; SOUZA, W. M.; ROMEIRO, M. F.; VIEIRA, L. C.; LUNA, L. K. S.; HENRIQUES, D. A.; ARAÚJO, J.; SIQUEIRA, C. E. H.; COLOMBO, T. E.; AQUINO, V. H.; FONSECA, B. A. L.; BRONZONI, R. V. M.; NOGUEIRA, M. L.; DURIGON, E. L.; FIGUEIREDO, L. T. M.. A real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction for detection and quantification of Vesiculovirus. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.111 n.6, p.385-390, 2016.

VANDEMEULEBROUCKEA, E.; DE CLERCQB, K.; VAN DER STEDEC, Y.; VANDENBUSSCHEA, F. A proposed validation method for automated nucleic acid extraction and RT-qPCR analysis: An example using Bluetongue virus. *Journal of Virological Methods*, v.165, p.76–82, 2010.

WANG, J.; O'KEEFE, J.; ORR, D.; LOTH, L.; BANKS, M.; WAKELEY, P.; WEST, D.; CARD, R.; IBATA, G.; VAN MAANEN, K.; THOREN, P.; ISAKSSON, M.; KERKHOFS, P. Validation of a real-time PCR assay for the detection of bovine herpesvirus 1 in bovine semen. *Journal of Virological Methods*, v.144, p.103–108, 2007.

WILSON, W.C.; LETCHWORTH, G.J.; JIMENEZ C.; HERRERO, M.V.; NAVARRO, R.; PAZ, P.; CORNISH, T.E.; SMOLIGA, G.; PAUSZEK, S.J.; DORNAK, C.; GEORGE, M.; RODRIGUEZ, L.L. Field evaluation of a multiplex real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay for detection of Vesicular stomatitis virus. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.21, p.179–186, 2009.

CAPITULO 3

ANÁLISE FILOGENÉTICA DO *ALAGOAS VESICULOVÍRUS*, OBTIDO DE AMOSTRAS ISOLADAS EM LABORATÓRIOS OFICIAIS DO MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO.

RESUMO

A estomatite vesicular é uma enfermidade infecciosa que acomete de animais como os equinos, bovinos, suínos, e que cursa com sintomas semelhantes aos apresentados em animais acometidos com Febre Aftosa. O vírus da estomatite vesicular pertence à família *Rhabdoviridae*, gênero *vesiculovirus*, sendo as espécies *New Jersey*, *Indiana*, *Cocal* e *Alagoas* as responsáveis por focos da doença em países do hemisfério ocidental. No Brasil, o *Alagoas vesiculovirus* é responsável pelos principais focos da doença principalmente nos estados da região Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste do país. O presente estudo teve como objetivo realizar o sequenciamento de amostras de *Alagoas vesiculovirus* recebidas para diagnóstico, e pertencentes ao banco de cepas dos Laboratórios Nacionais Agropecuários. Os resultados do sequenciamento foram submetidos ao programa BLAST para comparação com sequências depositadas nos bancos de dados e identificação do sorotipo e em seguida a estudo de filogenia utilizando o programa MEGA 6.0. As árvores filogenéticas geradas mostraram que as sequências do *Alagoas vesiculovirus* foram agrupados em três grupos: o grupo A, formado pelo isolado do *Alagoas vesiculovirus* obtido por Andrade e colaboradores em 1964; o grupo B, por isolados de estados da região nordeste e o grupo C, por isolados do estado da Bahia, Goiás e Tocantins. Os valores de distância genética entre os grupos foram considerados altos, indicando que o *Alagoas vesiculovirus* do grupo A constitui uma cepa distante geneticamente dos isolados de campo do estudo. Os valores da distância calculados dentro de cada grupo mostraram que os grupos B e C apresentaram baixo nível de variação gênica.

Palavras chave: sequenciamento, filogenia, doença vesicular.

PHILOGENETIC ANALYSIS OF *ALAGOAS VESICULOVIRUS*, OBTAINED FROM
SAMPLES ISOLATED IN OFFICIAL LABORATORIES OF THE MINISTRY OF
AGRICULTURE, LIVESTOCK AND SUPPLY.

Anapolino Macedo de Oliveira, Cristiano Barros de Melo

ABSTRACT

Vesicular stomatitis is an infectious disease that affects animals such as horses, cattle, pigs, and has symptoms similar to those seen in animals affected with foot-and-mouth disease. The vesicular stomatitis virus belongs to the family *Rhabdoviridae*, genus *vesiculovirus*, which has a *New Jersey*, *Indiana*, *Cocal* and *Alagoas* species responsible for the disease in countries of the Western Hemisphere. In Brazil, the *Alagoas vesiculovirus* is responsible for the main outbreaks of the disease, that occurs in the states of the Northeast, Midwest and Southeast of the country. The present study aimed the sequencing of samples of *Alagoas vesiculovirus* received for diagnosis and belonging to the bank of strains of the National Agricultural and Livestock Laboratories. The sequencing results were submitted to the BLAST program for comparison with sequences deposited in the databases and identification of the serotype and then to phylogeny study using the MEGA 6.0 program. The phylogenetic trees generated showed that the *Alagoas vesiculovirus* were grouped into three groups: group A, formed by the *Alagoas vesiculovirus* isolate obtained by Andrade et al. In 1964; The group B, by isolates from states of the northeast region and group C, by isolates from the state of Bahia, Goiás and Tocantins. The genetic distance values between the groups were considered high, indicating that *Alagoas vesiculovirus* from group A constitutes a genetically distant strain of the field isolates from the study. The distance values calculated within each group showed that groups B and C presented low level of gene variation.

Key words: sequencing, phylogeny, vesicular disease.

1. INTRODUÇÃO

A estomatite vesicular é uma enfermidade infecciosa de origem viral, presente nos países do hemisfério ocidental que acomete espécies como os bovinos, suínos e equinos, e, excepcionalmente humanos, na maioria, aqueles que tiveram contato com animais doentes e trabalhadores de laboratório. A apresentação clínica da estomatite vesicular é semelhante à vista por animais acometidos com a febre aftosa, o que gera a necessidade imediata, do diagnóstico diferencial entre essas enfermidades, (Reif et al. 1987; Rodriguez et al. 2008).

O agente da estomatite vesicular pertence à família *Rhabdoviridae*, gênero *vesiculovirus*, com um genoma constituído de um RNA de fita simples e polaridade negativa, de 11 kb e que codifica para cinco proteínas: N (nucleocapsídeo), fosfoproteína (P), matriz (M), glicoproteína (G) e polimerase (L), (Rodriguez et al., 2008). Quatro espécies de interesse são responsáveis pelos focos da doença: *New Jersey*, *Indiana*, *Cocal* e *Alagoas vesiculovirus* (ICTV, 2015).

O diagnóstico da doença é feito através da pesquisa de anticorpos por métodos como, ELISA e teste de neutralização, (Allende, 1992), na pesquisa de antígenos e isolamento viral em cultura de células e, atualmente, por métodos moleculares como a reação em cadeia da polimerase (Nuñez, et. al. 1998; Sepúlveda et al. 2007; Rasmussen et al. 2005; Fernández et al. 2008). Métodos moleculares podem falhar na detecção de isolados virais de amostras oriundas de focos, e segundo Wilson, (2009), muitas vezes determinada pela variabilidade gênica do vírus.

Poucas pesquisas têm sido realizadas para a caracterização gênica de amostras de isolados brasileiros de VSAV. Pauszek et al. (2008) realizaram o sequenciamento completo do *Cocal* e *Alagoas vesiculovirus*, que foram agrupados em dois grupos monofiléticos distintos. Novamente Pauszek et. al., (2011) estudaram as relações genéticas e antigênicas sorológicas de isolados do Brasil.

Cargnelutti et al. (2014), realizaram o sequenciamento da fosfoproteína de isolados dos focos da Paraíba ocorridos em 2013 e a análise filogenética indicou que eles estavam proxicamente relacionados a outros isolados brasileiros caracterizados como *Alagoas vesiculovirus*.

Rainwater-Lovet et al. (2005), apontaram a importância de estudos de análise filogenética na investigação da cepas virais envolvidas em surtos de estomatite vesicular nos Estados Unidos. Os autores apontaram que o gene da fosfoproteína é

recomendado para estudos de análises filogenéticas, principalmente por ser uma região de hipervariabilidade e que acumula grande número de substituições nucleotídicas que podem refletir em mudanças no genoma.

Assim, o objetivo do presente estudo é realizar a caracterização gênica de amostras de vírus da estomatite vesicular, espécie *Alagoas*, pertencentes ao banco de estirpes dos Laboratórios Nacionais Agropecuários.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local do estudo

Este estudo foi realizado nas unidades de Diagnóstico de Doenças Virais e Biologia Molecular do Laboratório Nacional Agropecuário, de Minas Gerais (Lanagro-MG), pertencente a Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

2.2 Amostras

Foram empregadas amostras pertencentes aos bancos dos Laboratórios Nacionais Agropecuários do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, localizados em Belém-PA e Pedro Leopoldo-MG. As amostras foram dirigidas ao diagnóstico diferencial de enfermidades vesiculares e mantidas em ultra freezer a -80° C. As amostras oriundas do Lanagro-PA foram recebidas durante o período de 2008 a 2013, totalizando 18 amostras, e as demais 22 foram recebidas pelo Lanagro-MG no período de 2013 a 2017.

A Tabela 47 apresenta a relação de distribuição por município, ano de isolamento e laboratório responsável pelo diagnóstico, das amostras utilizadas na análise genética do *Alagoas vesiculovirus*.

Tabela 47. relação de amostras/ano, laboratório e município de isolamento.

Amostra Nº	Nº de registro- Ano	Laboratório	Município/estado
1	0072-08 MT	Lanagro-PA	Cocalinho-MT
2	0294-08 GO	Lanagro-PA	Cavalcanti-GO
3	0232-08 PE	Lanagro-PA	Petrolina-PE
4	0270-10 PB	Lanagro-PA	Pombal-PB
5	0486-11 RN	Lanagro-PA	Umarizal-RN
6	0232-11 PE	Lanagro-PA	Santa Maria da Boa Vista-PE
7	0339-13 PE	Lanagro-MG	Custódia-PE
8	3018-13 PB	Lanagro-PA	São Mamede-PB
9	3350-13 PB	Lanagro-PA	Mossoró-RN
10	3037-13 PB	Lanagro-PA	Upanema-RN
11	1785-13 PB	Lanagro-PA	Serra Grande-PB
12	1786-13 PB	Lanagro-PA	Serra Grande-PB
13	1827-13 PB	Lanagro-PA	Serra Grande-PB
14	2702-13 CE	Lanagro-PA	São Luís do Curu-CE
15	2703-13 CE	Lanagro-PA	São Luís do Curu-CE
16	2937-13 CE	Lanagro-PA	São Gonçalo do Amarante-CE
17	3078-13 CE	Lanagro-PA	Ibicuitinga-CE
18	2873-13 CE	Lanagro-PA	Morada Nova-CE
19	2791-13 CE	Lanagro-PA	Coreau-CE
20	2657-13 CE	Lanagro-PA	Ocara-CE
21	0001-14 MA	Lanagro-MG	Porto Franco-MA
22	0153-14 BA	Lanagro-MG	Wanderley-BA
23	0043-14 BA	Lanagro-MG	Angical-BA
24	0056-14 BA	Lanagro-MG	Paratinga-BA
25	0057-14 BA	Lanagro-MG	Bom Jesus da Lapa-BA
26	0059-14 BA	Lanagro-MG	Bom Jesus da Lapa-BA
27	0075-001-14 BA	Lanagro-MG	Brejolândia-BA
28	0075-002-14 BA	Lanagro-MG	Brejolândia-BA
29	0075-003-14 BA	Lanagro-MG	Brejolândia-BA
30	0096-14 BA	Lanagro-MG	Riacho de Santana-BA
31	0097-14 BA	Lanagro-MG	Riacho de Santana-BA
32	0182-14 BA	Lanagro-MG	Wanderley-BA
33	0162-14 BA	Lanagro-MG	Macaúbas-BA
34	0011-12-16 MA	Lanagro-MG	Porto Franco-MA
35	0011-13-16 MA	Lanagro-MG	Porto Franco-MA
36	0011-14-16 MA	Lanagro-MG	Porto Franco-MA
37	0011-15-16 MA	Lanagro-MG	Porto Franco-MA
38	0011-16-16 MA	Lanagro-MG	Porto Franco-MA
39	0421-16 TO	Lanagro-MG	Santa Rosa do Tocantins-TO
40	0004-17 BA	Lanagro-MG	Santa Maria da Vitória-BA

2.3 Extração do RNA

O RNA total das amostras foi extraído usando o método do TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA). Um mL de trizol foi adicionado a microtubo contendo 400 µl de cada amostra do vírus e deixados à temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 200 µL de clorofórmio a cada tubo, que após vigorosa agitação por 15 segundos, permaneceram à temperatura ambiente por 3 minutos. Os tubos foram então centrifugados a 12000g por 15 minutos, a 4 °C para a separação das três fases do processo: a fase aquosa (superior), a fase intermediária, e a fase fenólica (inferior de coloração vermelha). Seiscentos microlitros da fase superior foram transferidos para um novo microtubo e o RNA foi precipitado pela adição de 500 µL de álcool isopropílico. Após 10 minutos à temperatura ambiente, os microtubos foram centrifugados a 12.000g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o RNA foi lavado com a adição de 1mL de etanol à 75%. Os tubos foram novamente centrifugados a 7.500g por 5 minutos a 4° e o sobrenadante descartado. Os microtubos permaneceram a temperatura ambiente para a secagem e o RNA foi ressuspensão pela adição de 20 µL de água livre de nucleases. Todas as amostras foram mantidas a – 80 °C até o momento da realização das PCRs. A verificação da eficácia da extração foi feita mediante a amplificação de gene da beta-actina, segundo Bielanski et al. (2009), e do controle da contaminação, através de um tubo contendo apenas os reagentes utilizados no procedimento.

2.4 Iniciadores e RT-PCR

Os iniciadores do presente estudo foram desenhados utilizando o programa Primer3 Plus (Untergasser et al. 2007) e tiveram como alvo a fosfoproteína do vírus. Os iniciadores foram localizados nos nucleotídeos 722F (55-74) e 722R (776-752) e tiveram como referência a sequências do Genbank JF95530.1. A tabela 48 descreve a sequência dos iniciadores empregados no estudo. Os ensaios foram feitos no termociclador ProFlex (ThermoFisher, Estados Unidos).

Tabela 48. Iniciadores do gene da fosfoproteína do *Alagoas vesiculovírus*

 Iniciadores

722 F GGGGCCATTCAAGAGATAGA

722 R TGATATCTCACTCTGGCCTGATTAT

Na otimização da reação da RT-PCR foram avaliadas a concentração de iniciadores (15, 20, 25, 30, 35 e 40 pmol), e temperaturas de anelamento (46, 48, 52 e 54 °C) . A reação da RT PCR que apresentou os melhores resultados foi a que utilizou concentração de 20 pmol por microlitro dos iniciadores e a temperatura de anelamento de 54° C. Assim, as reações foram feitas em microtubo de 200 µL e para cada amostra, foi utilizado um mix composto de 8,4 µL de água livre de RNA, 4,0 µL do tampão (Qiagen One Step PCR buffer – 1X), 2,0 µL de cada um dos iniciadores, 0,8 µL de enzima, 0,8 µL de dNTP (160 µM de cada) e 2 µL de RNA molde, totalizando 20 µL por amostra.

Cada ciclo da RT-PCR observou as seguintes temperaturas: 50°C por 30 minutos para a etapa de transcrição reversa; 95°C por 15 minutos para a ativação da enzima; 40 ciclos de 94° por 1 minuto para desnaturação e 54°C por 1 minuto para anelamento e 72° para extensão.

Terminada a reação da RT-PCR foi adicionado 2 µL de tampão de corrida (10x) Bluejuice gel loading buffer – cat. nº 10816-015) ao produto da PCR e procedida a eletroforese em gel de agarose. O gel foi preparado com agarose na concentração final de 1,5% (Invitrogen, Carlsbad CA, USA) em tampão de TBE (89 mM Tris-Borato, 2 mM EDTA, pH 8,2) ao qual foi adicionado 4,0 µL de brometo de etídio (Sigma- E 1510). O produto da PCR e o padrão de peso molecular (Invitrogen Life Technologies - cat.nº 10787-018) foram aplicados no gel sendo iniciada a corrida eletroforética (fonte-Fisher Scientific TB 300). Ao final, o gel foi fotografado no transiluminador (L-Pix Chemi – Loccus Biotecnologia), sendo as bandas com tamanho molecular específico, cortadas com uso de lâmina de bisturi, transferidas para microtubos de 1,5 mL e armazenadas a -4 °C para a etapa de purificação do DNA.

2.5 Purificações do DNA a partir do gel

O produto da PCR presente no gel foi purificado utilizando-se o MWGAquick-spin™ Total Fragment DNA purification Kit (Intron Biotechnology).

Inicialmente, um microtubo contendo aproximadamente 100 mg de gel, foi adicionado 300 μ L de tampão BNL. O microtubo foi vortexado e incubado a 55 °C para a completa solubilização do gel. Após esta etapa, a mistura contendo o gel dissolvido foi transferida para a coluna MEGA quick-spin que foi montada em um microtubo de 1,5 mL e centrifugada a 13.000 rpm por 1 minuto (centrífuga eppendorf 5804R, rotor F 45-30-11). O DNA permaneceu ligado à coluna, sendo descartado todo o volume do material eluído. Setecentos microlitros de tampão de lavagem foram adicionados à coluna, sendo o microtubo centrifugado a 13.000 rpm. O volume do eluído foi novamente descartado e a coluna transferida para um microtubo limpo de 1,5 mL. Na etapa final, o DNA foi eluído pela adição de 30 μ L de tampão de eluição diretamente no centro da coluna, O microtubo foi centrifugado a 8.000 rpm por 2 minutos e o volume eluído contendo o DNA foi armazenado em ultra freezer a -80°C, para a etapa do sequenciamento.

2.6 Sequenciamento

As amostras de DNA foram sequenciadas com a utilização do ABI BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit. De acordo com o fabricante, a quantidade de molde utilizada dependeu do tamanho do produto da PCR que em nosso estudo variou de 500 a 1000pb, seria de 20 a 50 ng de DNA. A reação foi feita empregando-se 0,5 μ L de BigDye mix 2,5x, 1,75 μ L de tampão de sequenciamento BigDye 3.1 5x, 2,5 μ L de DNA alvo (concentração 20 ng/ μ L), 1 μ L de cada iniciador senso e antisenso, analisados separadamente na concentração de 10 pMol/ μ L e 4,25 μ L de água livre de nuclease.

Foram utilizadas placas de 96 poços, sendo a PCR realizada no termociclador (Biocycler – Gradient thermal Cycler MJ 96+) com o seguinte programa: 96° por 1 minuto para a etapa de desnaturação inicial; 35 ciclos sendo cada um de 95° por 15 segundos para a desnaturação, 50° por 15 segundos para o anelamento e 60° C por 4 minutos para a extensão. Ao término, as placas foram mantidas à temperatura de 4 °C até a etapa de precipitação dos produtos.

2.7 Precipitações, purificação dos produtos e sequenciamento

Com o objetivo da precipitação e purificação para eliminação do excesso de reativos como o BigDye, iniciadores e oligonucleotídeos não consumidos na reação foi realizada esta etapa com a adição a cada amostra de 10 μ L de uma solução composta de 30 μ L de etanol 100% e 2,5 μ L de EDTA 125 mM. A placa foi novamente selada,

vortexada a 185 g por 15 segundos e em seguida deixada a temperatura ambiente por 15 minutos ao abrigo da luz para a precipitação dos produtos. Após isso, a placa foi centrifugada a 2.000 g por 45 minutos e o sobrenadante descartado. A placa foi então vertida em toalha de papel e vortexada a 185 g por 30 segundos para a completa retirada da solução. A cada reação foi adicionados 70 μ L de etanol a 70%, sendo o conjunto novamente vortexado a 185 g por 15 segundos. Em seguida, a placa foi centrifugada a 1.650 g por 15 minutos e o sobrenadante descartado. A placa colocada de modo invertido em uma toalha de papel e centrifugada a 185 g por 30 segundos. Ao final, ela foi deixada à temperatura ambiente e ao abrigo da luz para a secagem completa dos pocinhos. Antes de ser levado ao sequenciador, o DNA foi eluído com a adição de 20 μ L de formamida Hi-Di a cada reação. Os sequenciamentos foram realizados no equipamento da Applied Biosystems HITACHI-3500 Genetic Analyzer.

2.8 Análises filogenéticas

As sequências foram analisadas no programa Seqman (Sequencing & Genetic Analysis Software - Thermo Fisher Scientific) para a obtenção das regiões de consenso e alinhadas utilizando o Clustal W. Em seguida foi feita a escolha do melhor modelo de substituição pelo programa MEGA 6.0, (Tamura et al., 2013). Após a escolha do modelo de substituição, as sequências foram submetidas a reconstrução filogenética pelo método Neighbor-Joining, Maximum Likelihood utilizando-se Bootstrap como parâmetro do teste da filogenia com 1000 replicatas. Além disso, a média das distâncias dentro dos grupos e entre eles foram determinadas com base nos modelos K2 usando o programa MEGA 6.0. Nas árvores filogenéticas, as sequências foram identificadas com o número da cepa, seguida do local e ano de isolamento, e as aquelas obtidas de outros trabalhos foram identificadas com o número de acesso e nome da cepa informado no Genbank.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O vírus da estomatite, inicialmente isolado em 1964 por Andrade e colaboradores a partir de amostras clínicas de mueres oriundos dos estados de Sergipe e Bahia, foi denominado VISV- 3 Alagoas (Andrade et al. 1980).

Com o advento da biologia molecular, o estudo comparativo de sequências genômicas tem se tornado uma importante ferramenta na investigação

epidemiológica das enfermidades dos animais e humanos, uma vez que fornece métodos para a avaliação das sequências de nucleotídeos, proteínas e possibilita realizar inferências sobre a evolução dos agentes infecciosos.

A figura 8 mostra a árvore compactada que foi reconstruída com a adição de sequências do *New Jersey*, *Indiana*, *Cocal*, *Marabá* e do *Alagoas vesiculovírus* EU373657. Esta árvore foi reconstruída com o objetivo de demonstrar que as sequências dos isolados do estudo são bastante divergentes dos outros vesiculovírus causadores da estomatite vesicular. Os isolados do nosso estudo estão agrupados em clados separados das demais sequências consideradas.

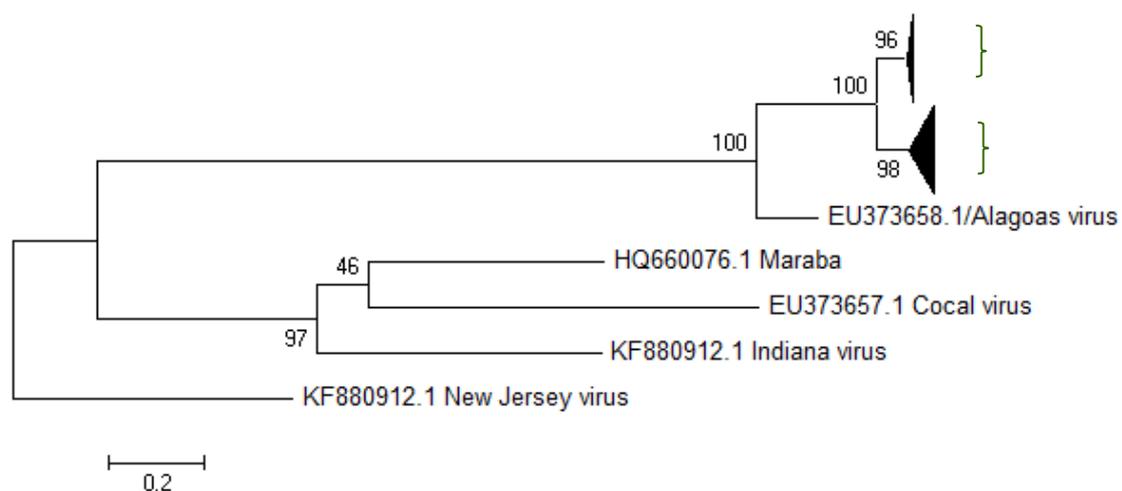


Figura 8. Árvore filogenética baseada nas sequências do gene da fosfoproteína (P) do *Alagoas vesiculovírus* construída usando programa MEGA 6.0, método Neighbor-joining com 1000 replicatas de bootstrap e modelo K2.

As figuras 9 e 10 apresentam as árvores filogenéticas Neighbor Joining e Maximum likelihood, respectivamente. O melhor modelo de substituição foi o K2p e apenas os valores de bootstrap acima de 70 são demonstrados. Na análise inicial das árvores foi possível definir a criação de três grupos, denominados de A, B e C, suportada com alto valor de bootstrap. No grupo A encontra-se apenas a sequência do vírus isolado por Andrade e colaboradores em 1964 e que recebeu o número de acesso EU363758.1 Alagoas vírus.

No grupo B encontram-se 18 amostras que pertenciam ao banco de vírus do Lanagro-Pará. Os 18 focos foram assim distribuídos: sete localizados no estado da Paraíba sendo um em 2010 e os demais em 2013; sete focos no Ceará em 2013; três focos em Pernambuco nos anos 2008, 2011 e 2013; um foco no Rio Grande do Norte em 2011. A figura 11 apresenta o mapa da distribuição dos municípios onde ocorreram os referidos focos, ilustrados em amarelo. Observamos que os focos encontram-se agrupados na região dos estados citados e bem separados dos dois outros grupos estudados.

As sequências JF795528.1 Minas Gerais, e JF795530.1 Espinosa, JF795529 Agulhas Negras e dos isolados por Cargnelutti et. al. (2014) identificadas por KJ746668.1 2013 Paulista/ParaíbaB e KJ74666.1 2013 São Bento/ParaíbaB foram incluídas no estudo. Os isolados de Cargnelutti foram agrupados junto à maioria dos isolados naquele estado no ano de 2013. Por outro lado, nos trabalhos de Pauszek et. al., (2011) e também Cargnelutti et. al., (2014), os vírus Minas Gerais, Espinosa e Agulhas Negras encontram-se nas árvores agrupados em clados próximos, o que não aconteceu no estudo, uma vez que o vírus Agulhas Negras que foi agrupado no grupo C. A possível explicação para este fato pode estar na pouca quantidade de sequências de Alagoas vesiculovírus que encontravam-se depositadas no banco de dados, quando da realização dos trabalhos dos referidos autores.

No grupo C encontram-se 22 amostras assim distribuída: um em Mato Grosso em 2008; um em Goiás em 2008; treze na Bahia em 2014; seis no Maranhão, sendo um de 2014 e cinco de 2016 e um do estado do Tocantins em 2017. A figura 11 apresenta o mapa da distribuição dos municípios onde ocorreram os referidos focos, ilustrados em gotas verdes e azuis. Conforme observado, as amostras destes dois grupos foram oriundas de municípios localizados em municípios de região central e sudoeste da Bahia, leste do Maranhão e duas isoladas de Goiás e Tocantins.

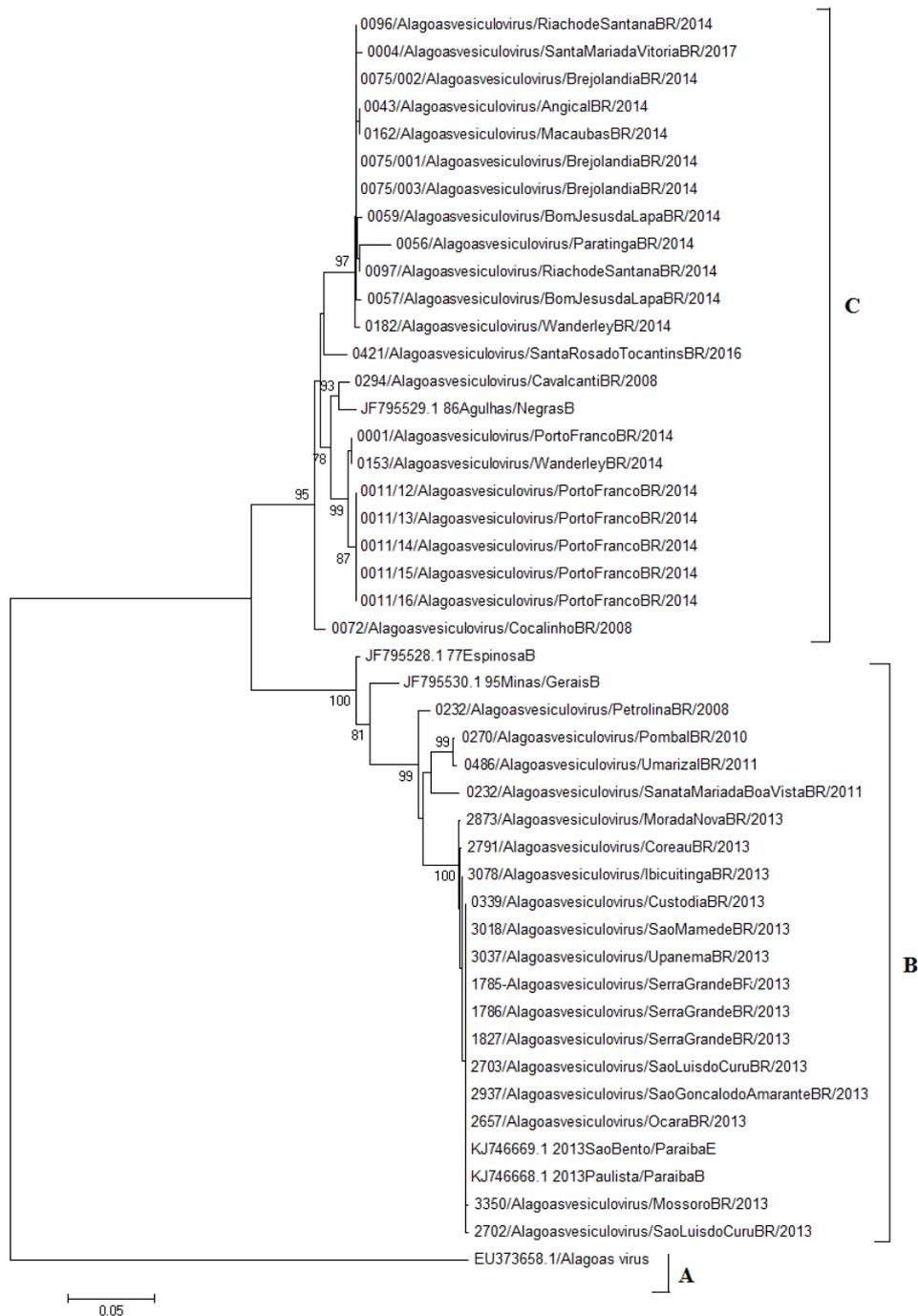


Figura 9. Árvore filogenética baseada nas sequências do gene da fosfoproteína (P) do *Alagoas vesiculovirus*, construída usando o programa MEGA 6.0, método Neighbor-joining com 1000 replicatas de bootstrap e modelo K2. Somente valores > 70% são mostrados.

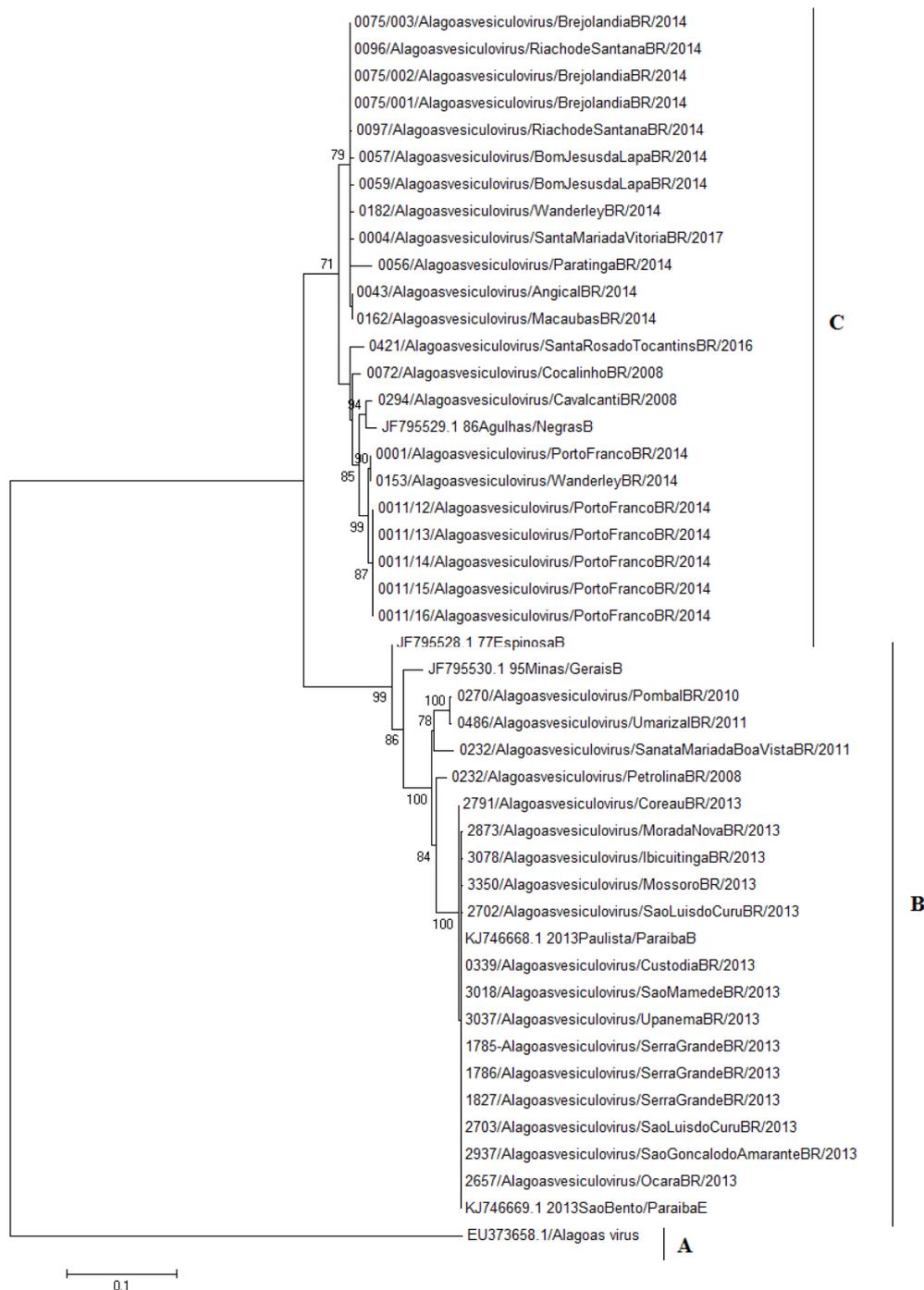


Figura 10. Árvore filogenética baseada nas sequências do gene da fosfoproteína (P) do *Alagoas vesiculovirus*, construída usando programa MEGA 6.0, método da verossimilhança (ML) com 1000 replicatas de bootstrap e modelo K2. Somente valores > 70% são mostrados.

As árvores de Neighbor-joining e Maximum Likelihood apresentaram topologias similares, confirmando a criação dos grupos suportada com alto valor de bootstrap. Não houve diferença no agrupamento das sequências entre as árvores e, dentro os grupos, o pouco suporte de bootstrap indicaram pouca divergência genética entre os isolados.



Figura 11. Distribuição dos focos de estomatite vesicular por grupo. Os focos representados por 📍 e 📍 representam os municípios do grupo B e por 📍 e 📍 os do grupo C.

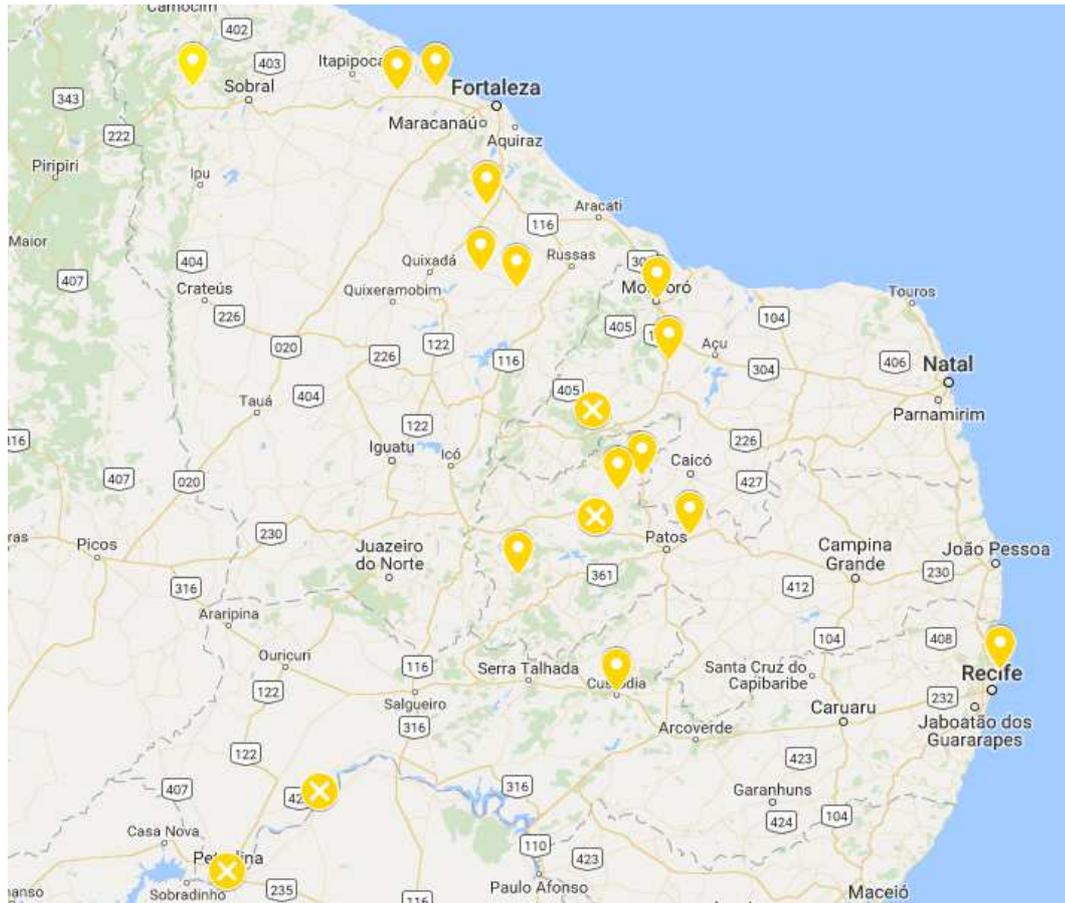


Figura 12. Focos de estomatite vesicular grupo B.  representa os municípios onde ocorreram focos durante 2008, 2010 e 2011, e  em 2013.

O grupo B das árvores filogenéticas é formado por 22 sequências sendo quatro delas obtidas junto ao GenBank. A figura 12 apresenta a distribuição de 17 municípios onde ocorreram focos da doença localizados nos estados do Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte e Ceará. Observamos que os isolados dos anos de 2008, 2010 e 2011 se agruparam em clados mais próximos dentro das árvores, onde também se encontra a sequência do vírus Espinosa que é uma sequência de um antigo isolado de 1977. As demais sequências foram obtidas de isolados virais de focos do ano de 2013.

A figura 12 mostra, ainda, que o foco mais antigo desse estudo ocorreu em 2008 no município de Petrolina-PE, e que existe uma dispersão do vírus para os demais estados até alcançar a região norte do Ceará.

A distância entre os dois clados formados dentro do grupo C foi de 3,7%, maior do que a distância intraclados (Tabela 49). Apesar de ser uma distância relevante, este valor não pode ser utilizado para se formar um subgrupo dentro do clado pelo

pouco número de sequências analisadas. Porém é importante considerar que em estudos futuros nos quais serão agregadas novas sequências isso possa acontecer como anteriormente relatado com as sequências dos vírus Espinosa, Minas Gerais e Agulhas Negras.

O cálculo da média das distâncias inter e intragrupos formados pelas árvores filogenéticas foram determinados pelo número de diferenças e feitos usando o MEGA 6.0, empregando-se os mesmos métodos de reconstrução das árvores. A Tabela 49 apresenta os resultados da distância calculada inter e intragrupos (A, B e C).

Tabela 49. Distância genética inter e intragrupos do *Alagoas Vesiculvirus*

	Distância Intergrupos (%)			Distância Intragrupos (%)	
	A	B	C		
				40 *	35 *
A	–	–	–	–	–
B	56,1	–	–	2,4	2,7
C	49,2	17,6	–	2,8	3,1

- Número de amostras utilizadas na análise.

Os resultados mostram que os valores de distância entre os grupos foram considerados altos entre A e B (56,1%) e A e C (49,2%). Entre B e C os valores foram considerados menores (17,6%). A distância intergrupos A e B e A e C foi de aproximadamente três vezes maiores do que aquela encontrada entre os B e C. Os resultados de divergência encontrados permitem inferir que o *Alagoas vesiculovírus* originário do isolamento por Andrade e colaboradores em 1964, constituem uma cepa geneticamente diferente dos isolados de campo do estudo.

Os resultados da distância intergrupos foram calculados para o conjunto de 40 sequências e para um segundo conjunto de 35 sequências, uma vez que algumas delas pertenciam ao mesmo foco e eram idênticas, sendo retiradas do cálculo. Os valores da distância calculadas dentro de cada grupo mostrou que os grupos B e C apresentaram baixo nível de variação gênica, sendo de 2,4% e 2,7% para o grupo B e de 2,8 e 3,1% para o grupo C.

Estes resultados estão em acordo com trabalhos de Rainwater-Lovett et al. (2007) de epidemiologia molecular de *New Jersey vesiculovirus* isolados nos Estados

Unidos nos anos de 2004 e 2005 e no México de 2000 e 2004, em que relataram baixo nível de variação genética dentre os grupos. Por outro lado, Velazquez-Salinas et al. (2014), na análise filogenética do gene P do *New Jersey vesiculovirus* de 176 focos no México e cinco dos Estados Unidos de 2005 a 2011, encontram alta heterogenicidade genética de isolados mexicanos (> 17% de divergência de nucleotídeos) e baixa divergência somente nos focos americanos (< 1%).

A característica de baixa divergência pode ser relacionada a sequências oriundas de focos que aconteceram em curtos períodos de tempo, como nos observados por Rainwater-Lovett et al. (2007) e aqueles relacionados no grupo B e C do nosso estudo, que ocorreram na sua maioria em 2013 e 2014, respectivamente.

Pouca pesquisa tem sido feita com os vesiculovírus responsáveis por focos no Brasil. Destacam-se os estudos de Pauszek et al. (2008) que fizeram a completa caracterização do genoma do *Cocal e Alagoas vesiculovírus* e de Pauszek et al. (2011) que estudaram as relações genéticas e antigênicas sorológicas de isolados do Brasil e Argentina, agrupando os isolados em dois distintos grupos monofiléticos. Consideramos de grande importância à realização de futuros estudos de relações genéticas e antigênicas com novos isolados brasileiros, visando dar continuidade à pesquisa da epidemiologia molecular do vírus no Brasil. Ainda no Brasil em 2014, Cargnelutti et al. fizeram a caracterização gênica de vírus isolados no estado da Paraíba que tiveram seu agrupamento próximo aos vesiculovírus Espinosa e Minas Gerais. Acrescenta-se que nestes trabalhos foram utilizadas poucas sequências do *Alagoas vesiculovírus*.

Este foi primeiro estudo com a caracterização molecular de amostras destinadas ao diagnóstico em Laboratórios da rede oficial do MAPA, no qual os isolados foram agrupados em três grupos nas árvores filogenéticas. Além disso, a pesquisa contribuiu de maneira relevante para o depósito das sequências do *Alagoas vesiculovírus* junto ao banco de dados do GenBank, que conta na sua maioria com sequências de vesiculovírus responsáveis por focos em países da América do Norte, América Central e norte da América do Sul.

4. CONCLUSÕES

O sequenciamento gênico dos isolados de *Alagoas vesiculovirus* pertencentes aos permitiu a reconstrução de árvores filogenéticas com a criação de três grupos filogenéticos;

O grupo “A”, constituído pelo *Alagoas vesiculovirus* isolado por Andrade e colaboradores em 1964, apresentou grande divergência gênica com outros isolados do estudo;

O grupo “B” foi composto em sua maioria por amostras que foram isoladas de focos nos estados do Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba e Pernambuco, enquanto que, as do grupo “C” foram responsáveis pela maioria dos focos de 2014 no estado da Bahia e de 2016 no Maranhão.

O cálculo da distância permitiu concluir que existe divergência genética entre os grupos, porém ela foi considerada baixa quando avaliada dentro de cada um deles.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ALLENDE, R.; SEPÚLVEDA, L.; SILVA, A.M.; MARTINS, M. A; SÖNDAHL, M.; ALONSO, A. An enzyme immunosorbent assay for the detection of vesicular stomatitis virus antibodies. *Prev. Vet. Med.*, v. 40, p. 293-301, 1992.

ANDRADE, C.M.; ROSAS, C.E.E.; AMORIM, L.M.; MOTA, J.P.; TEIXEIRA, E.N.; SANTOS, N.F. Vesicular Stomatitis in Brazil I -Isolation and identification of the Alagoas strain. *An. Microbiol.*, v.25, p.81-89, 1980.

BIELANSKI, A.; ALGIRE, J.; LALONDE, A.; NADIN-DAVIS, S. Transmission of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) via in vitro-fertilized embryos to recipients, but not to their offspring. *Theriogenology*, v.71,;p.499- 508, 2009.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária, 2012. Definição de caso de Estomatite Vesicular e Fluxo de doenças Vesiculares. Circular DSA nº 155 de 31.08.12, MAPA, Brasília.

CARGNELUTTI, J.F.; OLINDA, R.G.; MAIA, L.A.; AGUIAR, M.N.; NETO, E.G.M.; SIMÕES, S.V.D.T.; LIMA, T.G.; DANTAS, A.F.M.; WEIBLEN, R.; FLORES, E.F.; RIET-CORREA, F. Outbreaks of *Vesicular stomatitis Alagoas virus* in horses and cattle in northeastern Brazil *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.26, n.6, p. 788–794. 2014.

FERNANDÉZ, J.; AGUERO, M.; ROMERO, L.; SÁNCHEZ, C.; BÉLAK, S.; ARIAS, M.; VIZCAÍNO-SANCHEZ, J.M. Rapid and differential diagnosis of Foot-and-Mouth Disease, Swine Vesicular Disease, and Vesicular Stomatitis by a new multiplex RT-PCR assay. *Journal of Virological Methods*. v.147, p.301-311, 2008.

ICTVdb: *International Committee on Taxonomy of Viruses*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/>. Accessed 12 jun 2015.

NÜÑEZ, J.I.; BLANCO, E.; HERNÁNDEZ, T.; GÓMES-TEJEDOR, C.; MARTÍN,M.J.; DOPAZO, J.; SOBRINO, F. A RT-PCR assay for the differential diagnosis of vesicular viral diseases of swine. *J. Virol.Methods*, v.72, p.227-235, 1998.

OIE.WAHISInterface.Disponível em:http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/statusdetail Acessado em 20/04/2016.

PAUSZEK, S. J.; ALLENDE, R.; RODRIGUEZ, L.L. Characterization of the full-length genomic sequences of vesicular stomatitis Cocal and Alagoas viruses. *Arch. Virol.*, v.153, p.1353-1357, 2008.

PAUSZEK, S. J.; BARRERA, J.C.; GOLDBERG, T.; ALLENDE, R.; RODRIGUEZ, L.L. Genetic and antigenic relationships of vesicular stomatitis viruses from South America. *Arch. Virol.*, v.156 n.11, p.1961-1968, 2011.

RAINWATER-LOVETT, K.; PAUSZEK, S.J.; KELLEY, W.N.; RODRIGUEZ LL. Molecular epidemiology of vesicular stomatitis New Jersey virus from the 2004–2005 US outbreak indicates a common origin with Mexican strains. *J. Gen. Virol.*, v.88, p.2042–2051, 2007.

RASMUSSEN, T.B.; UTTENTHAL, A.; FERNANDEZ J.; STORGAARD. T. Quantitative multiplex assay for simultaneous detection and identification of and New Jersey serotypes of vesicular stomatitis virus. *J. Clin. Microbiol.*, v.43, p.356–362, 2005.

REIF, J.S.; WEBB, P.A.; MONATH, T.P.; EMERSON, J.K.; POLAND, J.D.; KEMP, G.E.; CHOLAS, G. Epizootic vesicular stomatitis in Colorado, 1982, infection in occupational risk groups. *American J. of Trop. Med. and Hyg.*, v. 36, p.177–82, 1987.

RODRIGUEZ, L.; BATISTA, H. R.; ROEHE, P. M.; KURATH. G. Rhabdoviridae. In: FLORES, E. F. *Virologia Veterinária*. 1. ed. Santa Maria: Ed. UFSM, 2007. p. 689-719.

SEPULVEDA, L. M.; BERGMANN, I.E.; MANTILLA, A.; NASCIMENTO, E.R. Rapid diagnosis of vesicular stomatitis virus in Ecuador by the use of polimerase chain reactios. *Braz. J. Microbiol.*, vol.38, n.3, p.500-506, 2007

TAMURA. K.; STECHER. G.; PETERSON. D.; FILIPSKI. A.; KUMAR. S. Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.*, v.30, n.12, p.2725-29, 2013.

VELAZQUEZ-SALINAS, L.; PAUSZEK, S.J.; ZARATE, S.; ALCANTARA, F.J.B.; RODRIGUEZ, A.V.; PEREZ, A.M.; RODRIGUEZ, L.L. Phylogeographic characteristics of vesicular stomatitis New Jersey viruses circulating in Mexico from 2005 to 2011 and their relationship to epidemics in the United States. *Virology*, p.17–24, 2014.

UNTERGASSER, A.; NIJVEEN, H.; RAO, X.; BISSELING, T.; GEURTS, R.; LEUNISSEN, J.A. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res.*, v.35, p.71-4, 2007.

WILSON, W.C.; LETCHWORTH ,G.J.; JIMENEZ C.; HERRERO, M.V.; NAVARRO, R.; PAZ, P.; CORNISH, T.E.; SMOLIGA, G.; PAUSZEK, S.J.; DORNAK, C.; GEORGE, M.; RODRIGUEZ, L.L. Field evaluation of a multiplex real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay for detection of Vesicular stomatitis virus. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.21, p.179–186, 2009.