

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE**

**DETECÇÃO E ANÁLISE MOLECULAR DO VÍRUS DA CINOMOSE
CANINA**

Michel Pozza
Biólogo / PUCRS

Dissertação apresentada como requisito à obtenção do
Grau de Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Porto Alegre (RS), Brasil
Junho de 2005

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE**

**DETECÇÃO E ANÁLISE MOLECULAR DO VÍRUS DA CINMOSE
CANINA**

Michel Pozza
Biólogo / PUCRS

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Amauri B. Simonetti, pela oportunidade de desenvolver esse projeto de Pós-graduação e pelos ensinamentos transmitidos.

- Ao Prof. Dr. Paulo Michel Roehle, por abrir as portas de seu laboratório para trabalhar com virologia e pelos ensinamentos transmitidos. Por seu otimismo, alegria e confiança.

- Aos professores do mestrado pelos conhecimentos transmitidos.

- Aos colegas e funcionários do IPVDF, Paulinho, Alessandra, Tamahine, Helena, Cíntia, Ana Cláudia, Franz, Rodrigo, Marco, Sílvia, Daiane, Samuel, Dirceu, Remo, Fernando, Dr. Angélica e demais colegas. O auxílio e as idéias de vocês foram ímpares na confecção deste projeto.

- Aos meus queridos pais Paulo e Vera por estarem presentes e sempre me apoiarem e a minha amada irmã Melissa.

- A Deus por me oferecer à oportunidade de aprender e conviver com todos vocês eu só tenho a agradecer.

DETECÇÃO E ANÁLISE MOLECULAR DO VÍRUS DA CINOMOSE CANINA ¹

Autor: Michel Pozza

Orientador: Amauri Braga Simonetti

Co-Orientador: Paulo Michel Roehe

RESUMO

O vírus da Cinomose Canina é uma doença multisistêmica cosmopolita com altos índices de mortalidade que afeta cães domésticos e diversos animais selvagens. Desde a década de 1960 tem sido controlado através de campanhas de vacinação porém, atualmente tem ocorrido o surgimento de diversos casos, em todo o mundo, de cães vacinados que desenvolveram a doença. O diagnóstico da Cinomose Canina é difícil e tem sido feito habitualmente através dos sinais clínicos da doença. No Brasil, bem como no Rio Grande do Sul somos carentes de dados sobre a epidemiologia e distribuição da Cinomose Canina. O objetivo deste estudo foi o desenvolvimento de uma técnica de RT-PCR para o diagnóstico do vírus da Cinomose Canina e a caracterização de amostras selvagens. Foram realizados testes de sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade para padronizar a técnica de RT-PCR. Foram analisadas 4 amostras suspeitas, 3 amostras vacinais e 3 amostras selvagens. As amostras suspeitas submetidas à técnica de RT-PCR não amplificaram, entretanto as 3 amostras selvagens e vacinais tiveram sua identidade confirmada sendo posteriormente caracterizadas. A enzima *PvuII* e *EcoRV* revelaram-se importantes na diferenciação das amostras selvagens e vacinais. Este estudo forneceu informações que devem ser melhor estudadas para se alcançar uma ferramenta abrangente no diagnóstico e caracterização do Vírus da Cinomose Canina em nossa região.

Palavras chave: Cinomose, RT-PCR, RFLP

¹Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Microbiologia molecular de Procaríotos, Eucariotos e Vírus, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (66 p.) Junho, 2005

DETECTION AND MOLECULAR ANALYSIS OF CANINE DISTEMPER VIRUS¹

Autor: Michel Pozza

Orientador: Amauri Braga Simonetti

Co-Orientador: Paulo Michel Roehe

ABSTRACT

Canine Distemper Virus (CDV) is the causative agent of a cosmopolitan multisystemic disease, presenting high mortality rate, infecting domestic dogs and different wild animals. Since 1960, the disease has been controlled through vaccination although an increasing number of vaccinated dogs developing pathology has occurred all over the world. Diagnosis of this disease is difficult and it has been done by clinical symptoms commonly. In Rio Grande do Sul, as well as in Brazil, data on the epidemiology of CDV is very scarce. The aim of this study was the development of a reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) for detection of CDV and characterization of wild strains. Tests of sensitivity, specificity and reproductibility were carried out for optimization of RT-PCR. Three vaccine strains, 3 wild strains and 4 strains isolated from animals with clinical symptoms of infection by CDV. The wild and vaccine strains, used as positive control, produced specific amplicons although with the samples from animals suspected of infection by CDV no amplification was observed. The 3 wild strains were compared to the reference strain (Lederle) by restriction fragment length polymorphism (RFLP) using restriction enzymes. RT-PCR optimized in this study might be used for detection of CDV for diagnosis purpose as well as for epidemiological studies.

Key words: distemper, RT-PCR, RFLP

¹Master of Science dissertation in Agricultural Microbiology, Faculty of Agronomy, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (66 p.) June, 2005.

SUMÁRIO

	Pág.
1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	1
1.1- Morbillivirus	1
1.2- Vírus da Cinomose Canina	7
1.3- Características físico-químicas	8
1.4- Proteínas virais	10
1.5- Replicação viral	13
1.6- Patogênese	15
1.7- Sinais Clínicos	16
1.8- Epidemiologia	18
1.9- Diagnóstico	21
2 – OBJETIVOS	24
2.1- Objetivos gerais	24
2.2- Objetivos específicos	24
3 – MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1- Local	25
3.2- Células	25
3.3- Cepas virais	25
3.4- Estoque viral	28
3.5- Titulação viral	28
3.6- Hemácias de cobaio	29
3.7- Hemaglutinação	29
3.8- Criando um ambiente livre de RNAses	30
3.9- Extração de RNA	30
3.10- Espectrofotometria	32
3.11- Oligonucleotídeos iniciadores	32
3.12- Síntese de cDNA (Transcrição Reversa)	34
3.13- Reação em cadeia da polimerase	34
3.14- Eletroforese em gel de agarose	35
3.15- Otimização da PCR	36
3.15.1- Sensibilidade	36
3.15.2- Especificidade	36
3.15.3- Reprodutibilidade	37
3.16- Digestão do DNA com enzimas de restrição	37

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1- Extração de RNA viral	38
4.2- Otimização da PCR	38
4.3- Amostras suspeitas e selvagens	43
4.4- Análise das clivagens	43
5 – CONCLUSÕES	51
6 – PERSPECTIVAS	52
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
8– ANEXOS	59
8.1- Protocolos de extração de RNA viral	59
8.2- Soluções para cultivo celular e biologia molecular	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- °C - graus Celsius
- µg - microgramas
- µL - microlitros
- BHV-1- Herpevírus bovino tipo 1
- BSA – Albumina de soro bovino
- C - Proteína C
- CDV - Vírus da Cinomose Canina
- CMV - Morbillivirus de Cetáceos
- CPE - efeito citopático
- cm² - centímetros quadrados
- CPVDF- Centro de pesquisas veterinárias Desidério Finamor
- DEPC – Dietil Pirocarbonato
- dNTP- dideoxynucleotídeos
- ELISA - Ensaio Imunoenzimático
- EMV – Morbillivirus de Eqüinos
- F – Proteína de fusão
- FEPAGRO- Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária
- F⁰ – Precursor da proteína de fusão
- F¹ – Proteína de fusão sub unidade 1
- F² – Proteína de fusão sub unidade 2
- H – Proteína da hemaglutinina
- Kb – kilo bases
- KDa – Kilodaltons
- IPX - Immunoperoxidase
- L – Proteína grande
- M – Proteína Matriz
- MDCK – Células de linhagem de rim canino Madin-Darby
- MEM – meio essencial mínimo

- mL – Mililitros
- mM – Milimolar
- MV – Vírus do Sarampo
- ng - nanogramas
- nm – nanômetros
- nM – nanomolar
- NP – Proteína do nucleocapsídeo
- P – Proteína da fosfoproteína
- pb – pares de base
- PCR – Reação em cadeia da polimerase
- PDV- Vírus da Cinomose das Focas
- pg – picogramas
- RFLP – Polimorfismo no tamanho de fragmentos de restrição
- RNA – Ácido Ribonucléico
- RNAm – Ácido Ribonucléico mensageiro
- PPRV – Vírus da Peste de Pequenos Ruminantes
- RPV – Vírus da Rinderpeste de Bovinos
- RT – Transcrição reversa
- SFB – Soro fetal bovino
- SF-4 – Vírus Parainfluenza tipo 3
- SNC – Sistema nervoso central
- TAE – Tampão tris acetato
- TCID₅₀ – Dose infectante de cultivo celular para 50% do cultivo celular
- UEL – Universidade Estadual de Londrina
- UHA – unidade hemaglutinante
- V – Proteína V
- VERO – Células de linhagem de Rim Murino
- U – unidade enzimática
- UV – Ultra-violeta

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Quadro 1 - Animais suscetíveis à infecção por <i>Morbillivirus</i>	6
Tabela 2 - Resumo das 17 amostras virais utilizadas na RT-PCR	27
Tabela 3 - Oligonucleotídeonucleotídeos utilizados na RT-PCR	33
Tabela 4 - Sequências de CDV obtidas do banco de dados	33
Tabela 5 - Condições utilizadas para a PCR	35
Tabela 6 - Padrões de clivagem esperados	44
Tabela 7- Tabela comparativa dos resultados dos padrões de clivagem	50

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 - Árvore filogenética baseada nas seqüências conservadas do gene da Fosfoproteína de diferentes <i>Morbillivirus</i> .	1
Figura 2 - Representação esquemática do genoma de CDV com seus genes.	9
Figura 3 - Representação tridimensional de um vírion de CDV.	9
Figura 4 - Diagrama esquemático demonstrando a orientação das glicoproteínas de superfície: fusão e hemaglutinina.	13
Figura 5 - Representação esquemática da replicação viral de CDV.	15
Figura 6 – Teste de sensibilidade da PCR dos oligos H1, N1 e P1.	41
Figura 7 – Teste de especificidade da PCR dos oligos H1, N1 e P1.	42
Figura 8 - Resultado das clivagens com enzimas de restrição da cepa Lederle.	45
Figura 9 - Clivagem com enzimas da restrição da cepa SNC 1.	46
Figura 10 - Clivagem com enzimas de restrição da cepa SNC 2.	48
Figura 11 - Clivagem com enzimas da restrição da cepa SNC 3.	49

INTRODUÇÃO

O vírus da Cinomose Canina (CDV) é um membro do gênero *Morbillivirus*. A Cinomose canina representa um dos principais agentes virais na população canina, além de infectar outros carnívoros e mamíferos marinhos. Essa infecção ocorre geralmente em animais jovens e possui altos índices de mortalidade.

Desde 1960 quando foi produzida a vacina anti- CDV a partir de amostras isoladas na década de 50, houve uma drástica redução do impacto da CDV na população canina.

Entretanto atualmente tem ocorrido o surgimento, em escala mundial, de cães vacinados que desenvolveram a CDV, além da expansão dos hospedeiros suscetíveis a infecção por CDV.

A Cinomose Canina possui sinais clínicos que podem ser facilmente confundidos com outros agentes patogênicos, além de ser uma infecção de difícil diagnóstico laboratorial.

Através da sensibilidade e especificidade da técnica de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase RT-PCR detecta-se a presença de agentes virais em baixas concentrações ou inviáveis para o cultivo laboratorial. A análise do polimorfismo no tamanho de fragmentos de restrição RFLP é uma ferramenta útil para a distinção de diferentes genomas através das diferenças nos sítios de restrição em regiões amplificadas do genoma viral.

Este estudo objetivou desenvolver uma RT-PCR para o diagnóstico de CDV em nossa região bem como analisar os perfis de restrição enzimática dos amplificadores pelos oligonucleotídeos P1, N1 e H1.

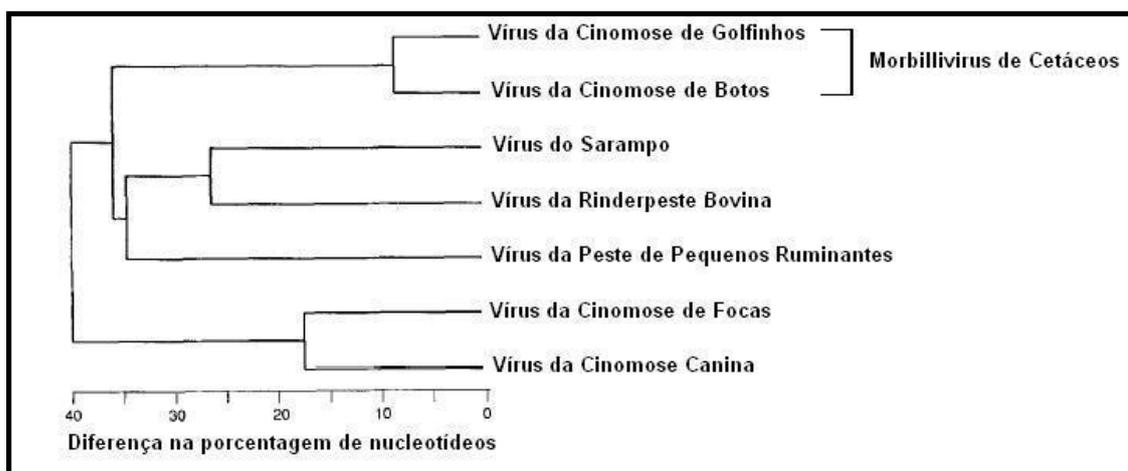
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 MORBILLIVIRUS

O gênero *Morbillivirus* está incluído na família *Paramixoviridae*, ordem *Mononegavirales*. Esse gênero é tradicionalmente representado pelos Vírus do Sarampo (“Measles Virus” –MV), Rinderpeste Bovino (RPV), Peste de Pequenos Ruminantes (PPRV) e Cinomose Canina (“Canine Distemper virus”- CDV). Todos estes *Morbillivirus* estão intimamente relacionados e compartilham características antigênicas. No final da década de 80 e na década de 90 ocorreu uma expansão no espectro de hospedeiros com o surgimento de novos membros do gênero *Morbillivirus* isolados de diversos mamíferos marinhos e eqüinos. Na FIGURA 1 esta exposta a árvore filogenética dos membros deste gênero.

Figura 1. Árvore filogenética baseada nas seqüências conservadas do gene da Fosfoproteína de diferentes *Morbillivirus*.

Adaptado de Barret et al., 1993.



O vírus do Sarampo provoca uma doença multisistêmica que possui uma distribuição mundial e é típica de crianças, entretanto em indivíduos mais velhos possui altos índices de mortalidade. Além dos humanos, os primatas também são hospedeiros naturais. Devido à indução de imunidade permanente e à ausência de reservatório, a manutenção desse vírus na população humana requer um amplo número de indivíduos suscetíveis (Collins, et al., 1996). Devido à desnutrição e à falta de cuidados básicos de saúde, a infecção aguda é uma das maiores causas de mortalidade infantil nos países em desenvolvimento (Santos et al., 2002).

O vírus RPV é uma das pragas mais antigas em bovinos, de origem asiática, descrita no século IV. No século XVIII e XIX causou uma epidemia devastadora em bovinos europeus e hoje permanece como uma das principais causas de perdas econômicas na África e em algumas regiões da Ásia. Com base em análises filogenéticas, têm sido sugerido que o RPV seria o arquétipo dentre os *Morbillivirus*, originando o MV e o CDV entre 5.000 e 10.000 anos atrás (Barret, 1987). Dentre os animais suscetíveis à infecção por RPV destacam-se os bovinos, caprinos e ovinos. Suínos domésticos desenvolvem sinais clínicos e servem como reservatórios deste vírus na Ásia. Dentre os animais selvagens, Antílopes, Hipopótamos e Cervídeos são suscetíveis à infecção. O RPV pode ser introduzido em novas áreas através da introdução de caprinos, ovinos e possivelmente outros ruminantes com infecção sub-clínica. Desde a década de 60, existe uma vacina muito eficaz na imunização, necessitando apenas de um programa adequado de manejo para eliminar a doença (Murphy et al., 1999).

O vírus da PPRV provoca uma doença sistêmica, altamente contagiosa que infecta caprinos e ovinos, muito similar ao RPV, entretanto, diferentemente de RPV pode se apresentar como uma infecção sub-clínica. Está presente principalmente no oeste da África com relatos freqüentes de epidemias. É uma doença que provoca grandes perdas econômicas, principalmente em caprinos podendo atingir 95% de mortalidade nesta população (Murphy et al., 1999). Além disso, devido às similaridades antigênicas, vacinas produzidas com RPV têm sido utilizadas para cessar as epidemias de PPRV.

O CDV é um vírus cosmopolita, que infecta vários carnívoros e está patológica e antígenicamente relacionado ao Sarampo. Vacinas heterólogas de Sarampo induzem imunidade total ou parcial a cães desafiados com CDV (Imagawa, 1968; Chalmers & Baxendale, 1994).

No ano de 1988, ocorreu o relato da primeira epidemia em mamíferos marinhos causada por um Morbillivírus, denominado “Phocine Distemper Virus-PDV”, que foi a causa primária da mortalidade em massa de Baleias nos mares do noroeste Europeu (Visser et al., 1993a; Osterhaus & Vedder, 1988, Jensen et al., 2002). Após este primeiro relato, outras espécies de cetáceos, como Golfinhos e Botos, tiveram suas mortes relacionadas à infecção por *Morbillivirus* bem como estudos sorológicos revelaram em todo o mundo que estes cetáceos já tiveram contato com este agente viral (Müller et al., 2002; van Bressen et al., 2001).

Foi proposto que o *Morbillivirus* responsável pela epidemia de 1988 pode ter sido originado de mamíferos terrestres infectados com uma cepa de CDV selvagem ou vacinal, uma vez que a vacina anti-CDV permanece com potencial

patogênico especialmente em espécies selvagens (Harder & Osterhaus, 1997). Além disso, foi comprovado que Marta (*Martes martes*), uma espécie de mustelídeo, exposto a Baleias infectadas desenvolveram a doença (Blixenkrone-Moller et al., 1990). Entretanto no trabalho de Mamaev et al. (1995) são apresentados resultados que afastam a hipótese de que uma cepa vacinal tenha originado a epidemia e que as cepas selvagens locais possuem maior similaridade genética com o PDV.

Atualmente foram identificadas duas linhagens de PDV (“Phocine Distemper virus”) ou Vírus da Cinomose de Focas, chamadas de PDV-1 e PDV-2. Com base em características morfológicas, biológicas, físicas e propriedades antigênicas, a linhagem PDV-1 pode ser considerada um novo membro do gênero, entretanto a linhagem PDV-2 foi intimamente relacionada ou representa uma cepa de CDV (Visser et al., 1993). No ano 2000 ocorreu uma epidemia que provocou a morte de 10.000 Baleias no Mar Cáspio na qual o agente etiológico foi CDV (Kennedy et al., 2000).

No trabalho de van Bildt et al., (2005) baseado em estudos filogenéticos é proposto que a Cinomose de Golfinhos e Botos seja unificada como Vírus dos Morbillivírus de Cetáceos (CMV). Entretanto, para que estes *Morbillivirus* sejam classificados de forma conclusiva, é necessária a análise de genomas completos associados às informações referentes ao tropismo celular, hospedeiros suscetíveis, características patogênicas e distribuição geográfica.

Embora muitos trabalhos tenham revelado novas informações sobre os Morbillivírus de cetáceos e PDV, algumas questões sobre a epizootiologia destes

vírus permanecem desconhecidas. Dentre as especulações que tentam explicar o surgimento destas infecções em curto espaço de tempo nesta população está a poluição do meio ambiente que pode estar alterando a resposta imunológica destas populações marinhas (Osterhaus et al., 1995).

Em 1994, ocorreu um surto em eqüinos causado por um vírus caracterizado como Morbillivirus de eqüinos (EMV) que provocou a morte de 14 eqüinos e uma pessoa. Este vírus foi isolado e inoculado experimentalmente em um eqüino onde se observou a reprodução dos sinais clínicos (Murphy et al., 1999). No QUADRO 1 estão expostos vários hospedeiros suscetíveis à infecção natural ou experimental pelos *Morbillivirus*.

Quadro 1. Animais suscetíveis à infecção por *Morbillivirus*. Modificado de Osterhaus et al., 1995; Appel 1998; van Moll et al., 1995.

		Infecção Natural		Infecção Experimental	
Vírus	Espécies Domésticas	Espécies Selvagens		Espécies Domésticas	Espécies Selvagens
Sarampo	Humanos / Primatas	Primatas		Primatas / Roedores	
RPV	Bovinos	<u>Africanos</u>	<u>Asiáticos</u>	Bovinos	
	Suínos	Búfalos	<i>Bibos sondaicus</i>	Coelhos	
	Caprinos	Girafas	Antílopes		
	Ovinos	Antílopes	Bisão		
		Javali	Cervídeos		
PPRV	Caprinos	Antílope		Caprinos	Cervídeos
	Ovinos	Íbex		Bovinos / Suínos	
CMV		Cetáceos		Bovinos / Canídeos	
				Caprino / Ovinos	
CDV	Cães	<i>Canidae / Felidae</i>		Canídeos	Mustelídeos
		<i>Procyonidae / Mustelidae</i>		Roedores	
		<i>Hyaenidae / Phocidae</i>		Marta – <i>Martes martes</i>	
		<i>Ailuridae / Viverridae</i>		Suínos	
		<i>Tuyussuidae / Cercopithecidae</i>		Felinos	
PDV		Focas		Canídeos	Baleias
		Baleias		Marta– <i>Martes martes</i>	
EMV	Equinos/ Humanos	<i>Pteropus bats</i>		Felinos	

1.2 Vírus da Cinomose Canina

O vírus da Cinomose Canina é um dos patógenos virais mais importantes em cães, está amplamente disseminado na população canina e é conhecido desde 1760. Teve seus sinais clínicos descritos em cães por Edward Jenner em 1806 e sua etiologia viral foi demonstrada em 1906 por Carré (Murphy et al., 1999).

O vírus é altamente contagioso e produz uma doença grave multisistêmica com altos índices de morbidade e mortalidade, principalmente em filhotes com menos de três meses de idade (Biazonno et al., 2001; Baker et al., 1959; Mccaw et al., 1998). Além de cães domésticos, alguns membros das famílias *Canidae*, *Procyonidae*, *Mustelidae* e *Felidae* são suscetíveis a infecção por CDV com vários relatos em zoológicos dos Estados Unidos, Europa e em Parques na África (Cabasso et al., 1956; Van Moll et al., 1995; Carpenter et al., 1998; Appel et al., 1995).

Na década de 1950, surgiram as primeiras vacinas de vírus vivo atenuado que reduziram drasticamente o impacto da CDV na população canina (Harder et al., 1997). Porém, desde a década de 1960 é utilizada a mesma vacina na proteção de cães em todo o mundo e vários relatos e estudos epidemiológicos revelaram um aumento na incidência da infecção por CDV tanto em cães vacinados como em não vacinados (Józwik et al., 2002). Além disso, vários trabalhos evidenciam diferenças antigênicas entre as cepas vacinais e selvagens (Hashimoto et al., 2001; Wakasa et al., 1999; Haas et al., 1999; Ohashi et al., 1998; Iwatsuki et al., 2000).

1.3 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS

O Vírus da Cinomose Canina é morfológicamente caracterizado como uma estrutura esférica ou filamentosa com um diâmetro que varia de 100 a 700 nm (Appel M. J. G., 1987). O capsídeo viral está organizado numa estrutura helicoidal que guarda a molécula de RNA e o complexo transcriptase.

O genoma do CDV é composto de uma molécula de RNA fita simples de polaridade negativa não segmentado com aproximadamente 15.900pb. Possui 6 genes que codificam 8 proteínas virais (Harder & Osterhaus, 1997): duas não estruturais: C e V, e 6 proteínas estruturais: a proteína do o nucleocapsídeo (NP), a fosfoproteína (P), a proteína da matriz (M), a proteína de fusão (F), a hemaglutinina (H) e a grande proteína (L). Entre cada unidade transcricional do RNAm existe uma região intergênica que pode desintegrar o complexo transcriptase e conseqüentemente, um gradiente de RNAm policistrônico é formado (Harder & Osterhaus, 1997)(FIGURA 2).

Essa estrutura é externamente circundada por uma bicamada lipídica (envelope) que é originada da membrana celular da célula hospedeira. Dessa estrutura ficam evidenciadas duas glicoproteínas responsáveis pela adsorção e fusão viral, denominadas de Hemaglutinina e Fusão respectivamente, ambas medindo entre 8 e 12 nm na superfície da membrana viral (figura 3). O CDV possui uma densidade de flutuação em gradiente de cloreto de cézio de 1,31 g/mL (Lamb & Kolakofsky, 1996).

Como outros vírus envelopados, o CDV é inativado por solventes lipídicos como clorofórmio e éter. Também é inativado por formalina, fenol, agentes

oxidantes e soluções de hipoclorito. Além disso o calor e a radiação ultra violeta (UV) destróem o CDV rapidamente. O período de meia-vida do vírus é de 2 a 3.4 minutos a 56°C; 10 minutos a 45°C; 1 a 3 horas a 37°C; 2 horas a 21°C e 9 a 11 dias a 4°C. O vírus liofilizado é estável por 3 anos (Appel M. J. G., 1981).

Figura 2. Representação esquemática do genoma de CDV com seus genes. Cada traço vertical representa uma região intergênica. Adaptado de Osterhaus et al., 1997.

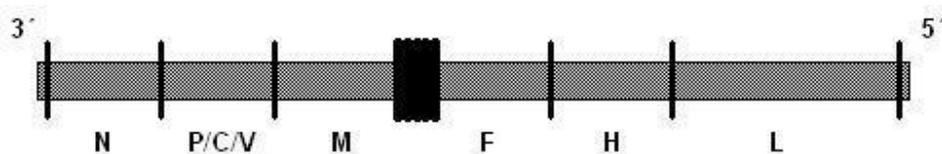
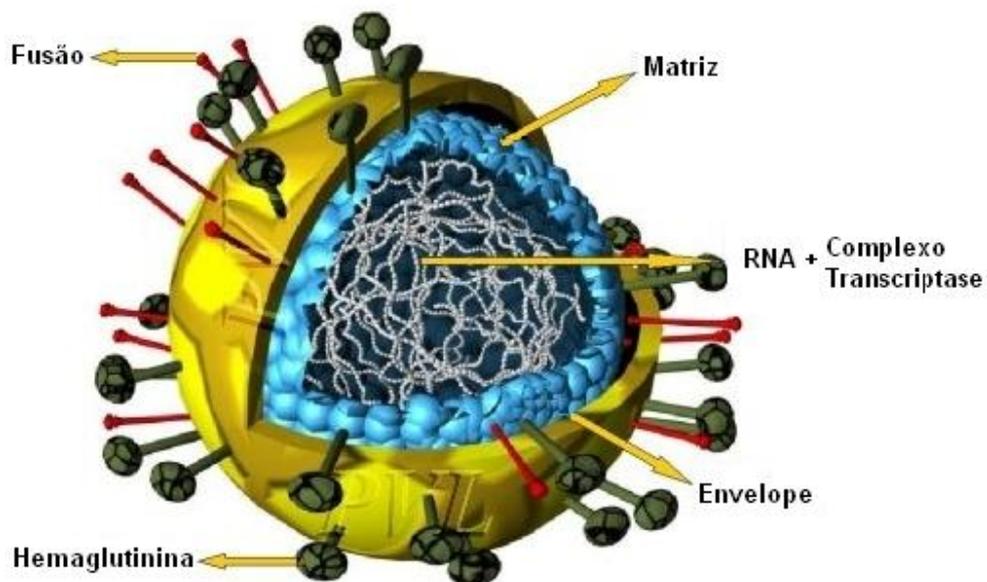


Figura 3. Representação tridimensional de um vírion de CDV. Modificado de

http://www.virology.net/big_virology/EM/3dvirus.jpgm (último acesso em 20/3/2005)



1.4 PROTEÍNAS VIRAIS

O genoma viral é flanqueado por regiões extracistrônicas que o delimitam. A extremidade 3' possui uma região de aproximadamente 50 nucleotídeos, chamada líder, que sinaliza para o complexo polimerase o local de início da transcrição ou replicação; a extremidade 5' chamada trailer, representa o final do genoma viral e também é composta de 50 nucleotídeos. Estas regiões controle, também estão presentes entre os genes virais (Lamb & Kolakofsky, 1996). A maioria dos genes é monocistrônica, porém o gene da fosfoproteína é policistrônico, por codificar a proteína P, C e V através da mudança da fase de leitura e edição do RNA (Harder & Osterhaus, 1997).

O complexo polimerase é composto pela polimerase viral associada as proteínas NP, P e L. No final da geração de cada RNAm policistrônico, o complexo polimerase pode desintegrar-se, gerando um gradiente de RNAm no qual o RNAm do gene N é mais abundante em detrimento do RNAm do gene L (FIGURA 1)(Diallo, 1990).

A proteína do nucleocapsídeo (NP) possui várias funções, sendo responsável por empacotar o RNA viral dentro do capsídeo RNase-resistente, associar-se com as proteínas P-L -polimerase durante a transcrição e replicação e por agrupar os componentes virais quando interage com a proteína M. Essa proteína possui aproximadamente 60 a 62 KDa e é considerada o antígeno de maior reatividade cruzada entre os *Morbillivirus* (Diallo, A., 1990).

A fosfoproteína (P) é assim denominada pela sua natureza altamente fosforilada e possui aproximadamente 73 a 80KDa. O gene que codifica a

fosfoproteína é um exemplo de compactação da informação genética, pois, através de mudanças na fase de leitura bem como na edição do RNA, pode gerar três proteínas diferentes a partir do mesmo gene: P, C e V (Lamb & Kolakofsky, 1996). A fosfoproteína atua na formação do complexo polimerase para a síntese de RNA. A proteína C é sintetizada através da mudança da fase de leitura +1 e ainda não teve sua função totalmente esclarecida; entretanto, em alguns estudos “in vitro”, inibiu a síntese de RNA sendo proposto que sua atuação residiria na inibição seletiva da síntese de RNA, auxiliando desta forma na transição da transcrição primária para a replicação do genoma viral (Curran et al., 1992). A proteína V é produzida através da edição do RNA pois requer a adição de resíduos de guanina ao RNAm e é composto da metade N-terminal do gene da P. Sua função também não é clara, mas estudos com o vírus do Sarampo demonstram possuir influência na síntese de RNAm (Tober et al., 1998).

A proteína matriz (M) possui um importante papel na maturação e no agrupamento das partículas virais. Ela pode ser encontrada associada à bicamada lipídica da célula hospedeira, servindo como um ponto de ancoragem para a NP e as duas glicoproteínas de superfície, a hemaglutinina e a proteína de fusão. Embora não tenha sido experimentalmente comprovado, acredita-se que sua associação com a nucleoproteína encerra a síntese de RNA preparando as partículas virais para a formação do vírion (Lamb & Kolakofsky, 1996).

A grande proteína “large” (L) possui aproximadamente 200 KDa, sendo a proteína menos abundante durante a replicação viral (aproximadamente 50 cópias por vírion). Sua função está relacionada com a atividade da Polimerase viral

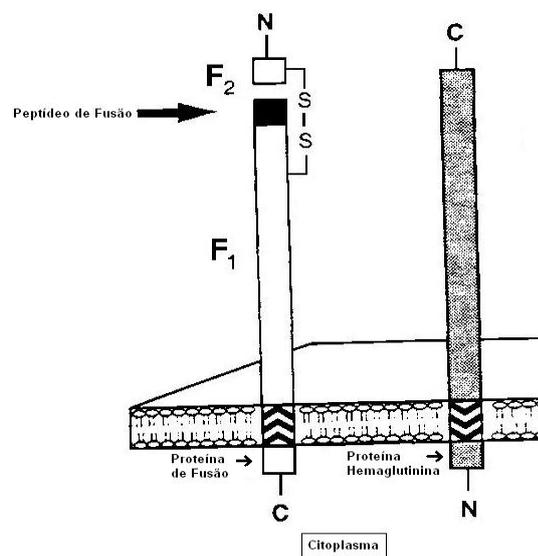
devido a sua baixa abundância, seu tamanho e sua localização centralizada na transcrição viral (Fields et al., 1996). A proteína P associada a L formam um complexo necessário para a atividade da Polimerase viral em união a outra associação NP:RNA, entretanto a exata composição do complexo da Polimerase viral ainda não foi elucidada.

A hemaglutinina (H) é uma das duas glicoproteínas de superfície do vírus e sua função está relacionada à adsorção viral na célula hospedeira. A extremidade N-terminal desta proteína representa uma região hidrofóbica bastante conservada e que supostamente serve como ponto de ancoragem no envelope viral (Diallo A., 1990). Os Paramixovírus são reconhecidos pela atividade hemaglutinante e neuraminidásica. Essa afinidade da hemaglutinina com os receptores celulares compostos de ácido siálico é alta o suficiente para provocar a aglutinação de eritrócitos de mamíferos e aves. Vinculada a essa forte afinidade da H por receptores celulares, está a atividade da neuraminidase que tem por objetivo reduzir essa afinidade para liberar os vírions da superfície celular. Nos *Morbillivirus*, com exceção do vírus do sarampo, a hemaglutinina não possui esta afinidade por receptores da célula e há escassez de atividade neuraminidásica detectável (Lamb & Kolakofsky, 1996).

A glicoproteína de fusão (F) tem um papel fundamental na dispersão do vírus no hospedeiro por mediar sua penetração na célula hospedeira. Esta proteína é sintetizada como um precursor inativo F^0 que precisa ser clivado por proteases da célula hospedeira para formar duas subunidades F^1 e F^2 (FIGURA 4). Esta modificação é fundamental para que a proteína revele a sua atividade

biológica e suas subunidades são interligadas através de pontes dissulfeto (Diallo, 1990).

Figura 4. Diagrama esquemático demonstrando a orientação das glicoproteínas de superfície: fusão e hemaglutinina. Adaptado de Lamb & Kolakofsky, 1996.



1.5 REPLICAÇÃO VIRAL

Como nos demais *Morbillivirus*, a replicação do CDV ocorre no citoplasma da célula hospedeira (FIGURA 5). O vírion se liga a receptores celulares através da hemaglutinina. A proteína F, como diz o próprio nome, vai mediar a fusão do envelope viral com a membrana citoplasmática, em pH fisiológico (pH=7,0), sendo o nucleocapsídeo liberado no citoplasma, onde será dado início à transcrição viral. O genoma é transcrito em RNA mensageiros, (RNAm) subgenômicos através da RNA polimerase RNA-dependente (transcriptase viral). As proteínas virais são

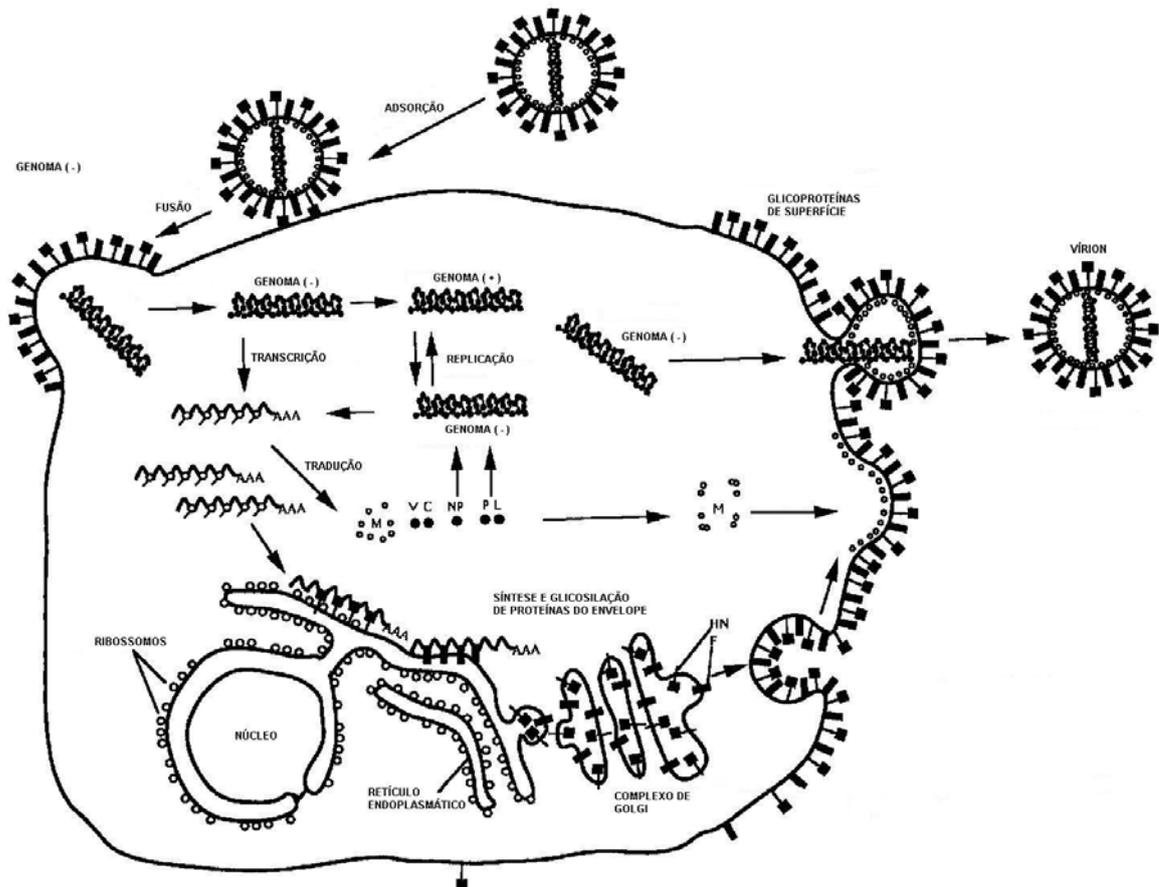
traduzidas nos ribossomos livres, exceto as glicoproteínas de superfície: H e F, que são sintetizadas no retículo endoplasmático, sendo posteriormente, transportadas ao complexo de Golgi, onde sofrem uma etapa final de processamento (Santos et al., 2002).

A replicação do genoma viral originalmente negativo também é mediada pela Polimerase do vírus através da formação de um intermediário replicativo (+) seguido da cópia do genoma viral (-) (Diallo, 1990).

Os nucleocapsídeos são montados no citoplasma e migram para a superfície celular. Eles se associam à membrana onde estão inseridas as glicoproteínas de superfície. A proteína matriz é essencial à formação das partículas virais, estabilizando a ligação entre o envelope viral e o nucleocapsídeo (Lamb & Kolakofsky, 1996).

A liberação do vírion se dá por brotamento através da membrana plasmática da célula infectada. A glicoproteína de fusão promove a fusão da célula infectada com a membrana das células adjacentes resultando na formação de sincícios o que possibilita a dispersão do vírus (Santos et al., 2002).

Figura 5. Representação esquemática da replicação viral de CDV. Adaptado de Lamb & Kolakofsky, 1996.



1.6 PATOGÊNESE

A rota natural de infecção por CDV é através da inalação de aerossóis com partículas virais (Appel & Summers, 1999). Na forma sistêmica, o vírus se aloja no trato respiratório e se inicia a replicação viral nas células do tecido linfóide associado; devido a isso, pode-se observar a primeira elevação na temperatura corporal. Após multiplicação inicial, o vírus é transportado por linfócitos para todos

os tecidos linfóides causando uma viremia primária e pode ser encontrado no baço, timo, linfonodos, medula-óssea, estômago, intestino e fígado (Appel M. J. G., 1987). Em nível celular, os efeitos da replicação viral nos órgãos linfóides pode ser caracterizado por hiperplasia, e presença de células gigantes multinucleadas (Murphy et al, 1999). Aproximadamente, no sétimo dia, o CDV pode ser extraído de linfócitos sanguíneos bem como de tecidos linfóides (Appel M. J. G., 1987).

Do 7° ao 14° dia de infecção, dependendo da cepa viral, o cão inicia uma vigorosa resposta imune humoral e celular e recupera-se. Entretanto, aqueles animais com uma resposta imune deficiente morrem na forma aguda ou subclínica da doença ou tornam-se persistentemente infectados. Nestes animais imunodeficientes, o CDV se dispersa pelo epitélio do trato digestório, respiratório e urogenital, glândulas exócrinas, endócrinas e pelo sistema nervoso central (SNC) (Appel., 1987).

Na infecção do SNC, o grau da resposta imune do hospedeiro interfere na dispersão do CDV. O vírus livre ou associado a linfócitos pode infectar as células endoteliais nas meninges, células endimais do sistema ventricular e células epiteliais do plexo coróide do 4° ventrículo (Appel., 1998).

1.7 SINAIS CLÍNICOS

Diversas variações na duração e gravidade da doença têm sido reveladas em animais experimentalmente e naturalmente infectados com o CDV e contribui para essa variação a virulência da cepa viral, as condições ambientais, a idade do

animal e a resistência individual de cada hospedeiro (Appel., 1987). Além disso infecções virais secundárias e bacterianas contribuem para um aumento na gravidade do sintomas clínicos.

Cães de todas as idades estão suscetíveis à infecção por CDV, porém, os animais com idade entre 3 e 4 meses não vacinados, que perderam a imunidade passiva (materna), são mais comumente infectados (Biazonno et al., 2001).

Na forma amena da doença pode ser observado um decréscimo no apetite, febre e infecção do trato respiratório superior. Dispnéia, tosse e descarga mucopurulenta oculonasal (Appel M. J. G., 1998).

Na forma aguda, os sintomas mais comuns de CDV ocorrem após uma incubação de 3 a 6 dias na qual o hospedeiro desenvolve uma condição bifásica na temperatura corporal atingindo picos superiores a 41°C, onde o segundo pico corresponde ao conjunto de severa leucopenia (especialmente linfopenia) com outros sinais clínicos Podem ser observados no decorrer da infecção anorexia, descarga nasal, conjuntivite, tosse, vômitos, diarréia e depressão (Murphy., 1999).

Alguns cães desenvolvem sintomas neurológicos após os sintomas sistêmicos, entretanto estes sintomas também podem derivar de uma infecção subclínica sistêmica. Incoordenação motora e ataques convulsivos são comuns. Também pode ocorrer hiperqueratose, tremores, paresia, miclonismo, torcicolo, nistagmo e rigidez cervical. Os animais acometidos de sintomas neurológicos geralmente morrem, nos cães recuperados permanecem algumas seqüelas (Appel., 1987).

1.8 EPIDEMIOLOGIA

Em meados da década de 1950, foi produzida uma vacina eficaz anti-CDV que foi largamente utilizada na década de 60 com uma drástica redução do impacto do CDV na população canina (Harder & Osterhaus, 1997). Estas vacinas são oriundas do isolamento de amostras selvagens de CDV que sofreram diversas passagens seriadas em cultivos de células de rim canino (cepa Rockborn), em ovos embrionados (cepa Onderstepoort) ou em fibroblasto de aves (cepa Lederle) sendo, por isso, atenuadas. Entretanto, estas vacinas de vírus vivo atenuado ainda retêm alta patogenicidade em espécies selvagens, representando um risco se utilizada nestas populações sem a devida avaliação ou sendo necessária à produção de novas vacinas para estas espécies selvagens (Leisewitz et al., 2001). O controle do CDV só pode ser realmente atingido com o uso da vacinação mesmo que medidas clássicas de higiene sejam aplicadas em paralelo (Chappuis., 1995).

O espectro de hospedeiros de CDV têm aumentado desde a década de 1990, quando diversas espécies de animais selvagens foram infectadas e morreram em zoológicos nos Estados Unidos da América e em parques na África (Carpenter et al., 1998).

Os membros das famílias *Canidae*, *Mustelidae*, *Procyonidae*, *Hyaenidae*, *Ailuridae*, *Viverridae*, *Phocidae*, *Tuyussuidae*, grandes felinos e primatas (*Cercopithecidae*) são suscetíveis à infecção natural por CDV (Deem et al., 2000). A patogenicidade das infecções do CDV em animais selvagens varia de espécie

para espécie, podendo causar altos índices de mortalidade ou infecções inaparentes (van Moll et al., 1995). Devido a esse amplo espectro de hospedeiros suscetíveis ao CDV torna-se difícil erradicar esse vírus em nível mundial.

Atualmente, em muitos países desenvolvidos a CDV têm recebido especial atenção, sendo que altos índices de vacinação reduziram sua incidência. Entretanto, diversos relatos têm revelado que animais vacinados têm desenvolvido infecções por CDV. Diversos grupos no Japão, Alemanha, Finlândia, Itália, Estados Unidos da América (EUA), Polônia, Índia, Dinamarca e África do Sul têm realizado estudos epidemiológicos sobre a CDV em suas regiões. Na África do Sul, o CDV representa um grande risco à população canina, pois, além de ser baixo o índice de animais vacinados, o contato com espécies selvagens é freqüente possibilitando o aparecimento de epidemias (Leisewitz et al., 2001). Na Alemanha, um estudo revelou que espécies selvagens que vivem em regiões próximas às áreas urbanas tiveram uma alta prevalência de anticorpos anti-CDV em relação às espécies presentes em áreas rurais, demonstrando o importante papel dos animais selvagens na epidemiologia de CDV (Frölich et al., 2000). Na Polônia, um estudo com 224 cães apresentando sinais clínicos de CDV revelou que 72% dos animais positivos para CDV tinham menos de 1 ano. Dentre estes, 66% não eram vacinados (Józwik & Frimus, 2002). Um recente trabalho realizado nos EUA revelou que as epidemias que ocorreram entre 1998 e 2001 na área suburbana de Chicago foram causadas por 2 diferentes linhagens sugerindo que ocorreram múltiplas reintroduções de cepas distintas de CDV (Lednicky et al., 2004).

No Japão, onde a CDV é considerada uma zoonose, um estudo demonstrou que mais de 66% dos animais que desenvolveram infecção por CDV eram vacinados e tinham altos títulos de anticorpos frente à amostra vacinal (Gemma et al., 1996). A partir da constatação destes casos, alguns trabalhos foram realizados com o objetivo de demonstrar as diferenças antigênicas entre as cepas selvagens e vacinais. Alguns trabalhos evidenciaram as diferenças antigênicas entre a proteína hemaglutinina das amostras vacinais e selvagens através da RT-PCR e RFLP (Hashimoto et al., 2001; Ohashi et al., 1998; Mochizuki et al., 1999) e de análise com anticorpos monoclonais (Iwatsuki et al., 2000). Também foi analisado o gene da P que de maneira similar aos resultados dos trabalhos envolvendo o gene da H, revelou uma similaridade relativamente baixa com as amostras vacinais de CDV (Wakasa et al., 1999).

No trabalho de Scagliarini et al., (2003), que analisou o gene do nucleocapsídeo de amostras isoladas na Itália, foi reforçada a hipótese de que as diferenças entre as amostras vacinais e selvagens de CDV são mudanças significativas que separam estas amostras em grupos distintos.

No Brasil, a epidemiologia de CDV é pouco estudada e carece de informações. Um estudo de achados epidemiológicos realizado no Rio Grande do Sul revelou que 11,7% dos animais submetidos à necropsia tiveram sua morte relacionada à infecção por CDV (Headley & Graça, 2000). Uma pesquisa realizada no Pará revelou que, embora o contato entre animais selvagens e cães domésticos seja alto e possa propiciar uma fonte de transmissão interespecie, a presença de anticorpos anti-CDV foi relativamente abaixo do esperado (Courtenay

et al., 2001). Um estudo que objetivou avaliar a resposta pós-vacinal de lobos-guará cativos no Estado de Minas Gerais revelou ser a vacina de vírus vivo atenuada segura e eficaz (72%) no desenvolvimento de resposta imune nesta espécie (Maia et al., 1999).

1.9 DIAGNÓSTICO

Uma variedade de parâmetros clínicos e diferentes tipos de ensaios têm sido sugeridos para uso no diagnóstico antemortem e postmortem de CDV. Entretanto, o curso imprevisível e variável do CDV dificulta a escolha de um método diagnóstico definitivo (Frisk et al., 1999).

O diagnóstico inicial de CDV é feito com base nos sinais clínicos e histórico de vacinas. Por compartilhar os sintomas com outras doenças, pode ser facilmente confundido com hepatite canina, parvovirose, leptospirose, toxoplasmose e raiva (Murphy, et al., 1999).

Amostras de tecidos ou das secreções do animal infectado são colocados em células permissivas ao vírus (MDCK ou VERO) e após um período de incubação variável é observada a presença de efeito citopático (ECP), caracterizado pela formação de sincícios. Uma vez que o vírus tenha sido isolado, existe material suficiente para diversas análises (sorológica, morfológica e molecular), razão pela qual o isolamento viral representa a metodologia preferencial (Lamb & Kolakofsky, 1996). Entretanto, o isolamento viral pode se tornar demasiadamente demorado e com pouca chance de sucesso na fase aguda da doença.

Dentre os testes sorológicos, a imunofluorescência direta ou indireta, a imunoperoxidase, o ensaio imunoenzimático (“Enzyme Linked Immunosorbent Assay”- ELISA), a soroneutralização e a imunohistoquímica representam métodos tradicionalmente utilizados. A qualidade de todos os métodos sorológicos depende do tipo de anticorpo utilizado. Para se obter um resultado específico, anticorpos monoclonais são preferencialmente escolhidos. Entretanto, no diagnóstico da infecção por CDV, anticorpos monoclonais são produzidos a partir de cepas padrão (vacinais) e em alguns trabalhos fica evidenciada a diferença antigênica entre as amostras (Iwatsuki et al., 2000). Por isso, é necessário possuir um amplo painel de anticorpos monoclonais para se evitar um resultado falso-negativo. A maioria dos testes sorológicos é trabalhosa, são testes demorados e têm grandes limitações quando são utilizados em amostras clínicas (Frisk et al., 1999).

A imunofluorescência depende do isolamento viral ou de amostras de tecido infectado de boa qualidade. Além disso, é necessário que o técnico possua boa experiência na interpretação dos resultados e de bons controles positivos e negativos para minimizar o risco de resultados falso positivos ou falso negativos. Nos casos subclínicos ou crônicos, os testes sorológicos geralmente são negativos (Appel, M. J. G., 1987).

A imunoperoxidase (IPX) bem como a soroneutralização representam um ótimo teste de triagem quando se analisam várias amostras. Animais imunodeprimidos e nas fases iniciais da infecção limitam a sensibilidade destes testes em comparação com a RT-PCR (Frölich et al., 2000).

A imunohistoquímica é uma metodologia sensível e específica para a detecção do antígeno viral na fase aguda da infecção, sendo apropriada no diagnóstico postmortem e limitada no diagnóstico de animais vivos (Appel & Summers, 1999).

O emprego da RT-PCR pode fornecer uma avaliação segura, confiável e rápida no diagnóstico do CDV devido à sua alta sensibilidade e especificidade, não necessitando vírions viáveis para a sua detecção (Frisk et al., 1999; Rzezutka, 2002; Ohashi et al., 1998). Essa ferramenta pode ser utilizada para futuros trabalhos epidemiológicos no intuito de se incrementar informações relevantes sobre as diferentes cepas regionais bem como estudos que visem avaliar o grau de similaridade e relacionamento filogenético tanto das cepas locais quanto das cepas vacinais.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e padronizar a técnica de RT-PCR para a detecção do vírus da Cinomose canina.

2.2 OBJETIVOS EPECÍFICOS

1. Desenvolver a técnica de RT-PCR e testá-la em relação à sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade para a detecção do vírus da cinomose canina, utilizando-se cepas vacinais e selvagens.
2. A partir de fragmentos amplificados pela RT-PCR comparar os padrões de clivagem por RFLP da amostra vacinal e das amostras selvagens.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Local

Os experimentos foram executados no Laboratório de Virologia do Centro de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor - Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (CPVDF-FEPAGRO) que está situado na cidade de Eldorado do Sul/RS.

3.2 Células

Para multiplicação e titulação viral foram utilizadas células de linhagem de Rim Canino (Madin Darby Canine Kidney – MDCK ATCC CCL-34), cultivadas em meio essencial mínimo (MEM; GIBCO-BRL), suplementadas com 7% de Soro Fetal Bovino (SFB; Nutricell). Também foram adicionados ao meio, enrofloxacina 10U/mL e Neomicina 100U/mL (Baytril, Bayer).

3.3 Cepas Virais

Foram utilizados nos experimentos um total de dezessete amostras de procedências distintas. Três cepas vacinais do Vírus da Cinomose Canina (CDV) foram empregadas para a padronização da RT-PCR. A amostra Lederle foi cedida pelo laboratório BIOVET S/A, a amostra Snider Hill foi adquirida junto à American Type Culture Collection (ATCC VR-526) e a amostra Rockborn foi gentilmente cedida pelo Dr. Franz Rijsewijk (ID-Lelystad, Lelystad, Holanda).

Além das amostras vacinais, foram utilizadas para o teste de especificidade seis cepas virais, a cepa SF-4 (Vírus Parainfluenza tipo 3) foi gentilmente cedida pela Dra. Sílvia Sardi da Universidade Federal da Bahia, a amostra de Herpesvírus bovino tipo-1 (BHV-1) foi cedida pelo Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuária, Balcarce, Argentina; a cepa do vírus Influenza A equino (A/Equine/miami/1/73-H7N7) foi gentilmente cedida pela Dra. Marilda M. Siqueira, do Laboratório de Vírus Respiratório e Sarampo da Fundação Osvaldo Cruz (FIOCRUZ-Rio de Janeiro/RJ); as amostras do vírus do Sarampo, Caxumba e Rubéola foram oriundas da vacina tríplice de vírus vivo atenuado (Glaxo Smith Kline Biologicals S/A) e a amostra de Parvovírus (ATCC VR-2209 Cornell) do estoque viral do CPVDF.

As três amostras selvagens de CDV (SNC 1, 2 e 3) foram gentilmente cedidas pelo Dr. Amauri Alfieri, do Laboratório de Virologia Animal, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina (UEL). As amostras de tecidos (cérebros) de cães naturalmente infectados foram acessadas a partir de casos clínicos na área urbana de Londrina e confirmadas por PCR pela equipe do Prof. Alfieri.

As quatro amostras suspeitas isoladas do cérebro de cães no CPVDF (L1, L2, L3 e L4), com sinais clínicos compatíveis com o CDV foram tituladas e analisadas neste experimento.

Todas as amostras de vírus foram estocadas em freezer a -70°C e, no momento apropriado, descongeladas a 37°C durante 2 minutos. A tabela 2 mostra um resumo das amostras virais utilizadas neste trabalho.

Tabela 2. Resumo das 17 amostras virais utilizadas na RT-PCR.

Cepa	Procedência	Sigla
Lederle	BIOVET S/A	LED
Snider Hill	CPVDF	SH
Rockborn	Dr. Franz Rijsewijk (ID-Lelystad)	ROCK
CPVDF-1	CPVDF	L1
CPVDF-2	CPVDF	L2
CPVDF-3	CPVDF	L3
CPVDF-4	CPVDF	L4
SNC 01	UEL	SNC 1
SNC 06	UEL	SNC 2
SNC 09	UEL	SNC 3
SF-4	Dra. Sílvia Sardi (UFBA)	SF-4
Influenza	Dra. Marilda M. Siqueira (FIOCRUZ)	Flu
BHV-1	Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuária	BHV-1
Sarampo/Caxumba/Rubéola	Glaxo Smith Kline Biologicals S/A	SCR
Parvovírus	CPVDF	PAR

3.4 Estoques virais

Para preservar as características originais das amostras virais, foi realizado um número mínimo de passagens em cultivo celular. Utilizando-se garrafas de 150 cm, células MDCK foram incubadas em meio de cultivo MEM suplementado com 7% de SFB e antibióticos, por 24 horas, em estufa a 37°C com 5% de CO₂. A seguir, foram inoculadas com 500 µL de suspensão viral (5,5 DICC) sob agitação constante, durante 1 hora a 37°C. Logo após a garrafa foi lavada 1 vez com meio de cultivo sem SFB e depois foram adicionados 50 mL de meio de cultivo, SFB e antibióticos. Esta garrafa permaneceu na estufa a 37°C de 2 a 5 dias até a visualização do efeito citopático (CPE). Quando o CPE tornou-se evidente em 90% da monocamada celular, a garrafa foi congelada em freezer a -70°C. A seguir, este material foi descongelado e centrifugado a 1500 g (ALC PK 121R) durante 20 minutos a 10°C. O sobrenadante foi, então, titulado e estocado em alíquotas de 1,5 mL a -70°C.

3.5 Titulação viral

Para a realização da titulação viral foram utilizadas placas de 96 poços, sendo a amostra viral a ser titulada diluída em tubos na razão 10 (10⁻¹ até 10⁻⁷), em meio de cultivo sem SFB.

Depois de diluídas, as amostras virais foram aplicadas em quadruplicata na placa, sendo a última fileira da placa utilizada como controle de células. Uma vez aplicada a amostra viral foram adicionados a todos os poços 50 µL de uma

suspensão de células MDCK ($1 - 2 \times 10^4$ células/poço), diluída em MEM com SFB e antibióticos.

A placa foi fechada e permaneceu em estufa a 37°C com 5% CO₂ de 3 a 5 dias, sendo observada diariamente em microscópio invertido de contraste de fase (NIKON TMS). Após visualizado o CPE, era calculada a dose infectante de cultivo celular (TCID₅₀), segundo o método de Reed & Muench (Burlison & Chambers, 1992; Mahy & Kangro, 1996).

3.6 Hemácias de Cobaio

Para se realizar o teste de hemaglutinação, foram coletadas, por punção intracardíaca, sangue de cobaio dissolvidos na proporção de 1:1 em solução de Alsever. O sangue foi lavado três vezes com PBS pH 7,2 na centrífuga (ALC PK 121R) a 2000 g por 10 minutos a 10°C. As hemácias concentradas no fundo do tubo foram diluídas em PBS-BSA (pH 7,4) a 0,5%.

3.7 Hemaglutinação

A técnica de hemaglutinação foi realizada em microplacas com fundo em “V”. Na microplaca foi adicionado 50µL de PBS-BSA pH 7,4 (0,1%). Logo após adicionou-se 50µL da amostra suspeita sendo diluída à razão dois (a partir da diluição 1:2) de forma seriada. Na última fileira é realizado o controle negativo com PBS-BSA pH 7,4 (0,1%). Hemácias previamente lavadas e diluídas a 0,5% são adicionadas em toda a placa que é incubada a 37°C por 60 minutos. Os títulos das amostras virais em unidades hemaglutinantes (UHA), foram expressos como a

recíproca da maior diluição que causou hemaglutinação completa nas hemácias de cobaio (Burleson et al., 1992).

3.8 Criando um ambiente livre de RNAses

Para o desenvolvimento da RT-PCR foi necessário tratar todo o material utilizado para a extração de RNA para evitar contaminação com RNAses. O material não sensível ao calor (vidraria) foi esterilizado em forno de Pasteur (FANEM 320 SE) durante 5 horas a 250°C. O material sensível ao calor (ponteiras, tampas, tubos e água) foi tratado com Dietil Pirocarbonato (DEPC) a 0,1% durante 12 horas, sendo logo após autoclavado a 121°C durante 15 minutos para inativar o DEPC (Sambrook, 1989). Além disso, foi utilizada uma sala exclusiva para a extração do RNA.

3.9 Extração de RNA

Para a extração de RNA viral foram avaliadas duas metodologias: uma baseada na utilização de sílica associada ao isocianato de guanidina (Anexo 1) (Boom et al., 1990). A segunda metodologia utiliza um reagente comercial TRIZOL[®] LS (Gibco BRL), que inclui o fenol também associado ao isocianato de guanidina. Com base na pureza e na concentração de RNA, bem como no tempo e no custo da extração foi selecionada apenas uma metodologia.

A extração de RNA utilizando TRIZOL[®] LS foi realizada conforme as instruções do fabricante, com pequenas modificações. O vírus foi multiplicado em

células MDCK e quando observado ECP em 90% do cultivo celular, o material foi congelado em freezer a -70°C . Após algumas horas, esse material foi rapidamente descongelado e ressuspendido. Um volume de $300\ \mu\text{L}$ desse material e $700\ \mu\text{L}$ de TRIZOL[®] LS foram adicionados a um tubo com capacidade de $1,5\ \text{mL}$ e, após homogeneização, o tubo permaneceu por 5 minutos à temperatura ambiente. A seguir, foram adicionados $200\ \mu\text{L}$ de clorofórmio e o conteúdo foi misturado em “vortex” durante cerca de 20 segundos, permanecendo ainda por 6 minutos à temperatura ambiente. Após esse período, o tubo foi centrifugado a $12000\ \text{g}$ (ALC PK121R) durante 15 minutos a 10°C . O RNA presente na fase aquosa foi retirado com cuidado e transferido para um novo tubo contendo $500\ \mu\text{L}$ de isopropanol. Este tubo foi centrifugado a $14000\ \text{g}$ durante 15 minutos a 10°C . Nesta etapa o “pellet” de RNA era visível e todo o sobrenadante era descartado, sendo adicionados $500\ \mu\text{L}$ de etanol 75%. Novamente o tubo foi centrifugado a $13000\ \text{g}$ durante 5 minutos a 10°C . Nesta etapa todo o sobrenadante era retirado com cuidado para não se aspirar o “pellet” de RNA. O tubo aberto era, então, aquecido em estufa a 56°C durante 5 minutos para evaporar o etanol restante. Após esta etapa o RNA, que estava pronto para a síntese do cDNA, era ressuspendido em $20\ \mu\text{L}$ de água DEPC.

3.10 Espectrofotometria

Para estimar a pureza e a concentração de RNA foi utilizado espectrofotômetro (LKB-BIOCHROM). Em uma cubeta de quartzo foram colocados 1µL do RNA em suspensão e 749µL de água para a leitura nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. Com os valores obtidos foram calculadas a pureza e a concentração de RNA, segundo métodos tradicionais (Sambrook, 1989).

A concentração do produto de PCR para digestão com enzimas de restrição e para a determinação da sensibilidade da técnica também foi estimada através de espectrofotometria.

3.11 Oligonucleotídeos Iniciadores

Com o auxílio do software VECTOR NTI 4.0 (InforMax, inc.) foram desenhados 4 pares de oligonucleotídeos: dois para o gene da fosfoproteína (P1 e P2), um para a nucleoproteína (N1) e um para a hemaglutinina (H1). Também foram selecionados 2 pares de oligonucleotídeos (NESTED) que amplificam uma região homóloga entre os *Morbillivirus* (Tabela 3). Foi realizado um alinhamento de 12 genomas de CDV (Tabela 4) com o auxílio do programa CLUSTALW 3.0 (<http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa>) para se identificar regiões homólogas entre as cepas virais.

Tabela 3. Oligonucleotídeos utilizados na RT-PCR. O fragmento amplificado está representado na sequência anti-senso de cada par. Genes alvo: P-Fosfoproteína, N-Nucleoproteína, H-Hemaglutinina.

Seqüência (5'-3')	Nome	Orientação	Extensão	Gene alvo	Fragmento amplificado	Referência
TGCCTCAAAGCCCTCAG	P1*	Senso	17	P		S/ Referência
CCTCAATCGTGAAATAGC	P1*	Antisenso	19	P	1052	S/ Referência
GAGATTCAAGAGGTCAG	P2*	Senso	17	P		S/ Referência
TTCTGGGCATCTTTGC	P2*	Antisenso	17	P	771	S/ Referência
TCGGAGATGAGAAGGTGG	N1*	Senso	18	N		S/ Referência
TTTGGGTTCATAGCGTG	N1*	Antisenso	18	N	859	S/ Referência
GGATGTGGAGAACGCAATAC	EXT*	Senso	20	P		Rzezutka, 2002
GGAGGTCTCTCAATAGTTGA	EXT*	Antisenso	20	P	1069	Rzezutka, 2002
ATGTTTATGATCACAGCGGT	INT**	Senso	20	P		Barret, 1993
ATTGGGTTGCACCACTTGTC	INT**	Antisenso	20	P	429	Barret, 1993
AATTTAGCAGATTGCTGAAAG	H1*	Senso	21	H		S/ Referência
TGTGAACCACTGCTGTCAT	H1*	Antisenso	19	H	730	S/ Referência

Síntese de oligonucleotídeos:

* IDT, Integrated DNA Technologies, INC.

** Invitrogen™ Life Technologies.

Tabela 4. Sequências de CDV obtidas do banco de dados.

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>).

N. ACESSO	ORIGEM
AF164967	ND
AF014953	Onderstepoort
AF305419	Onderstepoort
AF378705	Onderstepoort
AY386315	Mustelídeo
AY386316	Canídeo
AY443350	Mustelídeo
AY445077	Mustelídeo
AY466011	Mustelídeo
AY542312	Mustelídeo
AY649446	Mustelídeo
NC001921	Onderstepoort

ND – não determinado.

3.12 Síntese de cDNA (Transcrição Reversa)

Para a síntese do cDNA, foi utilizada a enzima transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen) e inibidor de RNAses (RNase OUT, Invitrogen,) segundo as instruções dos fabricantes.

Em um tubo foram adicionados 10 μ L de RNA, 1 μ L de dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)(10mM) e 1 μ L de oligonucleotídeo direto e reverso (1 μ M de concentração final). O tubo foi aquecido a 70°C durante 5 minutos e rapidamente colocado em gelo. Após 3 minutos o tubo foi retirado do gelo, permanecendo em temperatura ambiente. Um segundo “mix” foi adicionado: 4 μ L de First Strand Buffer 5X, 2 μ L DTT, 0.5 μ L RNase OUT e 0.5 μ L de enzima M-MLV. O tubo foi incubado a 37°C por 50 minutos e, em seguida, a enzima foi inativada a 70 °C por 15 minutos.

3.13 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A PCR foi realizada em reações de 25 μ L. Cada reação continha 2,5 μ L de cDNA, 14,7 μ L de água autoclavada (MILLI-Q), 1 μ L BSA (0.8 μ g/ μ L), 1 μ L dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)(10mM), 1 μ L Cloreto de Magnésio (2mM de concentração final), 2,5 μ L tampão Taq (200mM Tris-HCl(pH 8.4), 500 mM KCl), 2 μ L de oligonucleotídeo senso e reverso (40nM de concentração final) 0,3 μ L (1U) da enzima Taq DNA Polimerase (Invitrogen). Todas as reações foram realizadas no termociclador (Mastercycler personal, EPPENDORF SCIENTIFIC INC.). As condições da PCR de cada par de oligonucleotídeos estão representadas na Tabela 5; em todas as PCR foram realizados 35 ciclos, com uma etapa adicional

de desnaturação inicial e de extensão final de 3 minutos a 94°C e 72°C, respectivamente.

Tabela 5. Condições utilizadas para a PCR. Os valores representam 1 ciclo da reação, num total de 35 ciclos.

Oligos	Desnaturação	Anelamento	Extensão
P1	94°C/ 3 min.	52°C / 30 seg.	72°C / 1 min.
P2	94°C/ 3 min.	50°C/ 30 seg.	72°C / 1 min.
N1	94°C/ 3 min.	52°C / 30 seg.	72°C / 30 seg.
H1	94°C/ 3 min.	55°C/ 30 seg.	72°C / 30 seg.
EXT	94°C/ 3 min.	50°C/ 30 seg.	72°C / 30 seg.
INT	94°C/ 3 min.	55°C/ 30 seg.	72°C / 30 seg.

3.14 Eletroforese em gel de agarose

Dos produtos da PCR ou digestão enzimática, 5µL foram aplicados em canaletas de gel de agarose a 1% e a eletroforese foi realizada em cuba horizontal contendo tampão TAE (Anexo1), durante 30 minutos a 76 volts. Foi utilizado o marcador molecular de 1Kb (DNA LADDER, Invitrogen). O gel foi, então, corado com Brometo de Etídio (0,5 µg/mL) e visualizado em transiluminador (FBTI-88-Fisher Scientific) sob luz ultra violeta (UV)

3.15 Otimização da RT-PCR

Para avaliar a eficiência da RT-PCR foram testadas a sensibilidade, em relação à concentração de cDNA, a especificidade em relação a outros agentes virais e a reprodutibilidade. As condições padronizadas estão expostas nos ítems 3.12 e 3.13.

3.15.1 Sensibilidade

O teste de sensibilidade foi realizado com a amostra vacinal LED através da quantificação de cDNA em espectrofotômetro. Determinada a concentração de cDNA procedeu-se uma diluição, à razão 10, em água MILLI-Q estéril que foi posteriormente testada na PCR.

3.15.2 Especificidade

Foram utilizadas amostras de sete vírus diferentes: Os vírus FLU, BHV-1, SF-4, SCR, PAR, juntamente com a amostra LED (tabela 2, pág. 27) (controle positivo), foram submetidos a RT-PCR nas condições previamente padronizadas. O vírus SF-4 está representado na mesma família de CDV (Paramixovírus), na vacina tríplice SCR o vírus do Sarampo compartilha características antigênicas com CDV (*Morbillivirus*); o vírus PAR representa uma das infecções virais mais importantes em cães. Além disso, os oligonucleotídeos desenhados foram previamente avaliados pelo software BLAST (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/search/blast-e.html>) para verificar a existência de homologia com outros microrganismos. Em todas as PCR foram realizadas

reações de controle negativo na qual estava ausente apenas a enzima Taq DNA Polimerase.

3.15.3 Reprodutibilidade

Foram utilizadas diferentes condições para se testar a reprodutibilidade da PCR. Com uma amostra de cDNA de LED foram realizadas três PCR, como descrito no item 3.13, com intervalo de dois dias entre cada PCR.

Foram avaliados reagentes de diferentes fabricantes como o tampão da enzima, dNTPs, cloreto de magnésio e a enzima Taq DNA Polimerase (Taq Polymerase Recombinat, INVITROGEN e Taq DNA Polymerase, CEBIOT).

3.16 Digestão do DNA com enzimas de restrição

Após otimização da PCR, os amplicons dos oligonucleotídeos P1, N1 e H1 foram quantificados por espectrofotometria e submetidos à restrição por enzimas de restrição de acordo com as instruções dos fabricantes. O produto das PCR do oligonucleotídeo P1 foi submetido à restrição pelas enzimas *Pvu* II (Promega) e *Ava* I (Invitrogen). No amplicon N1 foram utilizadas as enzimas *Nco* I (Biolabs) e *Ava* I (Invitrogen) e no amplicon H1 as enzimas *EcoR* I (Promega) e *EcoR* V (Pharmacia). O material foi incubado no período de uma hora a 37°C, sendo posteriormente submetido à eletroforese.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Extração de RNA viral

As amostras vacinais de CDV foram submetidas à extração de RNA viral através de duas metodologias. Os produtos da extração quantificados por espectrofotometria revelaram que a extração pelo TRIZOL[®] LS foi mais eficiente por propiciar maior concentração de RNA viral (630 ng/μL) e pela pureza de seu produto (1,78). A extração com sílica revelou uma concentração de RNA viral de 120 ng/μL e pureza de 1,5 segundo os parâmetros revelados em 3.10. Isto pode ser explicado pelo fato de que a extração à base de sílica possui afinidade por qualquer ácido nucléico (Boom et al, 1990). Por isso a extração pelo TRIZOL[®] LS demonstrou ser mais rápida, simples e menos honerosa.

4.2 Otimização da PCR

Para atingir as condições ideais da PCR, inicialmente foi utilizada a amostra vacinal LED para a amplificação. Inicialmente, todos os oligonuclotídeos H1, P1, P2 e N1 foram avaliados em temperaturas de anelamento que oscilaram de 58 a 46°C com a concentração inicial de cloreto de magnésio a 1mM.

A PCR realizada com o oligonucleotídeo H1 apresentou banda visível na temperatura de anelamento de 55°C, porém em temperaturas inferiores a 53°C ocorreu o surgimento de bandas inespecíficas e a redução da banda específica de 730 pb.

A PCR realizada com o oligonucleotídeo P1 também revelou banda visível na temperatura de anelamento de 55°C, entretanto com a redução da tm para 52°C ocorreu melhor visualização do produto de 1052 pb.

A PCR realizada com o oligonucleotídeo P2 apresentou em diferentes temperaturas de anelamento bandas inespecíficas de mesma intensidade que, por esta razão inviabilizaram sua utilização com objetivo diagnóstico. Isto pode ser explicado pela baixa temperatura de anelamento deste oligonucleotídeo (47°C), que possibilita a formação de bandas inespecíficas competindo com o produto esperado.

O conjunto de oligonucleotídeos N1 revelou a melhor visualização do produto de 859 pb na tm de 52°C, embora também tenha amplificado a 55°C.

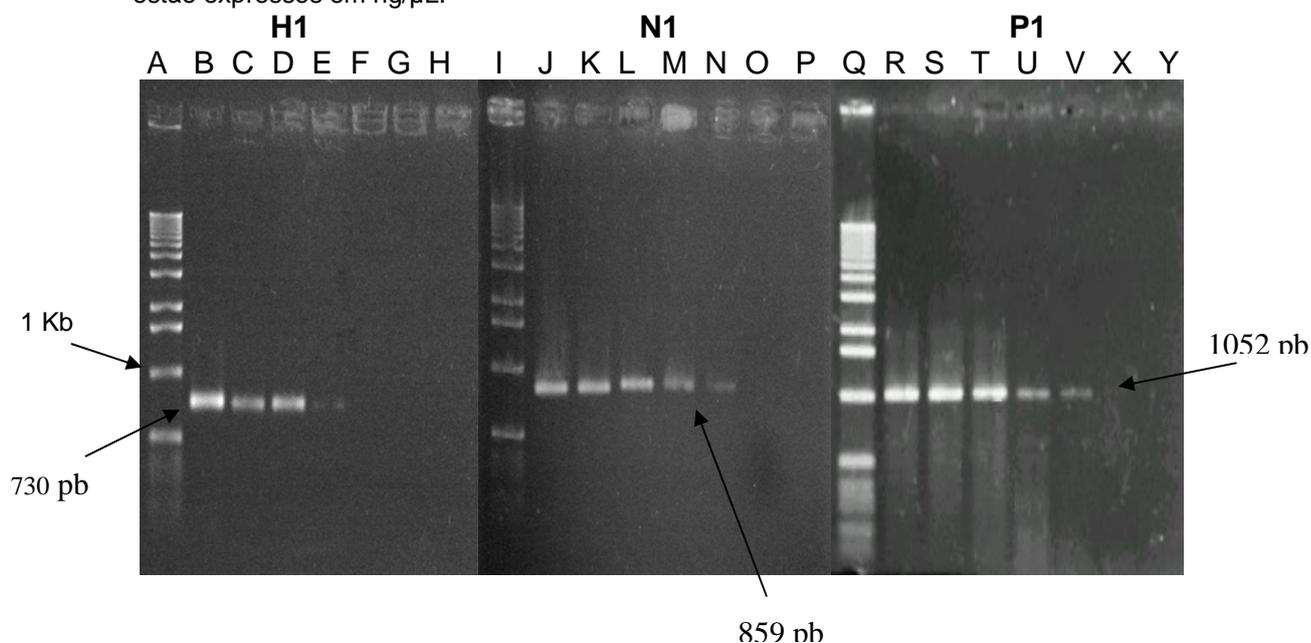
A utilização de BSA como adjuvante na concentração de 0.8 µg/µL evidenciou a presença dos produtos esperados nos oligonucleotídeos testados H1, P1 e N1. O uso de BSA visa favorecer a estabilidade da reação pois pode atuar na prevenção de estruturas secundárias nas regiões molde de DNA durante o processo de extensão, além de poder atuar como co-solvente minimizando a ação de agentes desestabilizadores da reação e aumentar a resistência da polimerase a degradação (Elnifro et al., 2000). A redução no tempo de anelamento e extensão de 1 minuto para 30 segundos reduziu a presença de bandas inespecíficas nos oligos H1, P1 e N1.

Após estes testes iniciais obteve-se um produto que foi posteriormente otimizado a partir da aplicação de diferentes concentrações de cloreto de magnésio, concentração da enzima Taq DNA polimerase e de oligonucleotídeos.

Quando as condições ideais foram obtidas (ítems 3.12 e 3.13) realizou-se a amplificação das demais cepas vacinais ROCK e SH.

Após a transcrição reversa os cDNAs foram diluídos à razão 10 e quantificados por espectrofotometria. Foi utilizado como branco nesta etapa, um RNA de CDV submetido às mesmas condições de transcrição reversa com exceção da enzima MMLV . Dessa maneira foi realizada a sensibilidade com H1, N1 e P1 da cepa LED. Os resultados revelaram que P1 e N1 amplificaram amplicons na concentração de 16,5 e 15,3 pg/μL de cDNA respectivamente. H1 obteve amplificação a partir de 1800 pg/μL aproximadamente (FIGURA 6). Conforme o gradiente molecular de RNA que ocorre durante a infecção pelos *Morbillivirus*, existe uma cascata de RNAm que é caracterizada pela maior concentração de NP e P em relação a H. Provavelmente essa característica possa influenciar na disponibilidade de RNAm para a produção de cDNA e conseqüentemente na PCR, talvez por isso os oligonucleotídeos P1 e N1 foram mais sensíveis em relação a H1 (Harder & Osterhaus, 1997).

Fig. 6. Testes de sensibilidade da PCR dos oligonucleotídeos H1, N1 e P1 frente à cepa LED. Da esquerda para a direita. **H1**: B- 1875; C- 187,5; D-18,75; E-1,875;F-0,1875. **N1**: J- 153,7; K-15,37; L-1,537; M-0,1537; N-0,01537. **P1**: R-1650; S-165,0; T-16,50; U-1,65; V-0,165; X-0,0165. Linhas A, I, Q representam o marcador molecular de 1Kb. Os valores estão expressos em ng/μL.

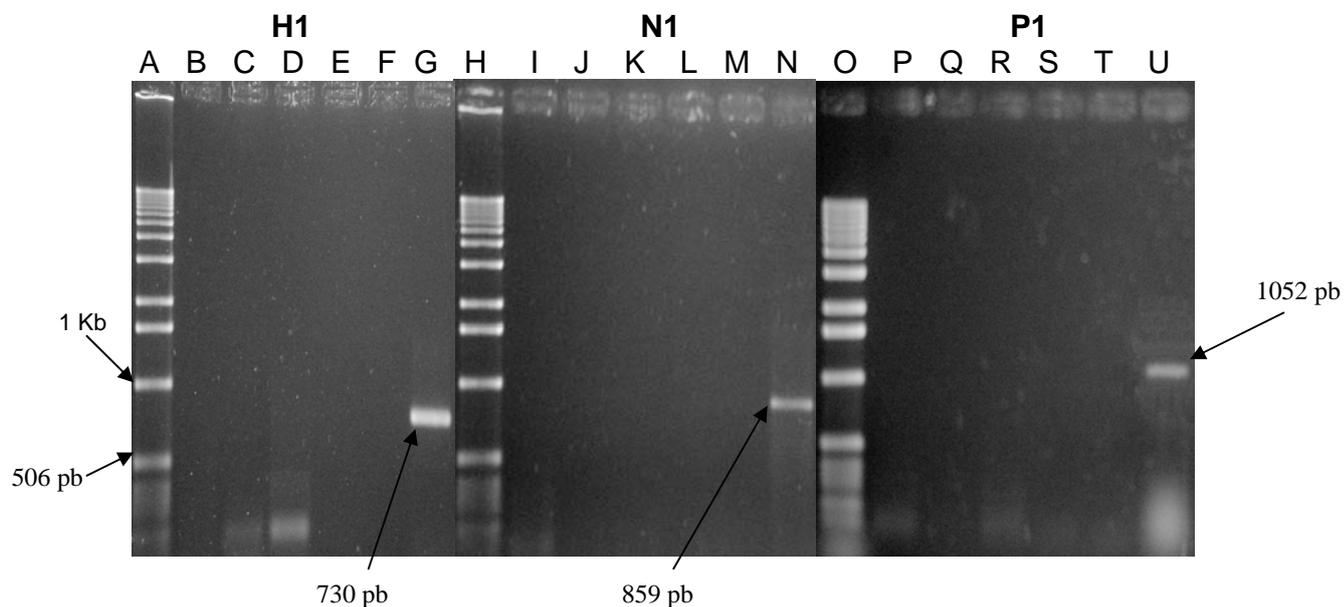


A especificidade da PCR foi realizada com a cepa LED frente a sete diferentes cepas virais (figura 7). Com a amostra viral de FLU não houve amplificação visível. Entretanto com o amplicom H1 ocorreu a amplificação inespecífica de um fragmento de 150 pb aproximadamente com a cepa de BHV-1 (linha D). O vírus PI-3 (linhas C, J, Q) e a amostra tríplice viral SCR (linhas E, L, S) cujos vírus apresentam homologia com CDV não produziram fragmentos visíveis. Na amostra PAR (linhas F, M, T) também não ocorreu amplificação. Estes resultados evidenciam a especificidade dos oligonucleotídeos desenhados neste experimento, dentro das condições utilizadas no presente trabalho. No trabalho de Gebara et al., 2004 foi realizada a especificidade com base nos polimorfismos de fragmentos clivados com enzimas de restrição. Outros autores

avaliam a especificidade através de Southern blot (Frisk et al., 1999; Rzezutka). Porém os oligonucleotídeos foram desenhados em regiões conservadas dentre os *Morbillivirus* propiciando, dessa forma, a probabilidade de amplificar a mesma região conservada nos demais membros desse gênero (RPV, PPRV e Sarampo).

Por isso a utilização de vírus como o Sarampo, SF-4, FLU e PAR em testes de especificidade podem fornecer subsídios para diferenciar estes vírus que possuem diferentes graus de homologia.

Figura 7. Testes de especificidade da PCR dos oligonucleotídeos H1, N1 e P1 frente a diferentes cepas virais. Linhas B, I, P- Influenza; Linhas C, J, Q- SF-4; Linhas D, K, R- BHV-1; Linhas E, L, S- Sarampo, Caxumba e Rubéola; Linhas F, M, T- Parvovírus; Linhas G, N, U- Controle Positivo. Linhas A, H, O- marcador molecular de 1Kb.



4.3 Amostras selvagens e suspeitas

Para avaliar o comportamento do RT-PCR desenvolvido em nosso estudo frente a amostras selvagens, foram utilizadas as cepas SNC 1, 2 e 3 de CDV. Os três oligonucleotídeos confeccionados H1, N1 e P1 amplificaram essas amostras virais extraídas diretamente das amostras clínicas. Este material propiciou a análise por RFLP das amostras selvagens frente a vacinal LED.

As amostras suspeitas L1, L2, L3 e L4, foram inicialmente isoladas de cães com sintomas neurológicos similares ao vírus da Raiva, sendo posteriormente descartado este agente. Por possuírem sintomas relacionados (vírus da Raiva e CDV) foi avaliada a possibilidade destas amostras serem de Cinomose. Estas amostras revelaram títulos superiores a 6,0 TCID₅₀ e não produziram amplicons em nenhum dos oligonucleotídeos H1, P1 e N1. Além disso, foi realizado uma NESTED-PCR com os oligonucleotídeos universais para *Morbillivirus* descritos na literatura Rzezutka et al., 2002 que também não obteve amplificação. Foi realizada a técnica de hemaglutinação para se verificar a presença de vírus que aglutinassem hemácias, porém o resultado foi negativo.

4.4 Análise das clivagens com enzimas de restrição

Com os dados obtidos da seqüência de CDV isolada de canídeo presente no genbank (Nº de acesso AY386316) foi montado um mapa de restrição para cada um dos três pares de oligonucleotídeos e selecionadas as seguintes enzimas: para H1 foram utilizadas as enzimas *EcoRI* e *EcoRV*; para P1 as enzimas *AvaI* e *PvuII* e para o oligonucleotídeo N1 a enzima *AvaI* e *NcoI*. Na

tabela 6 são mostrados os padrões de clivagem esperados, em pares de base (pb).

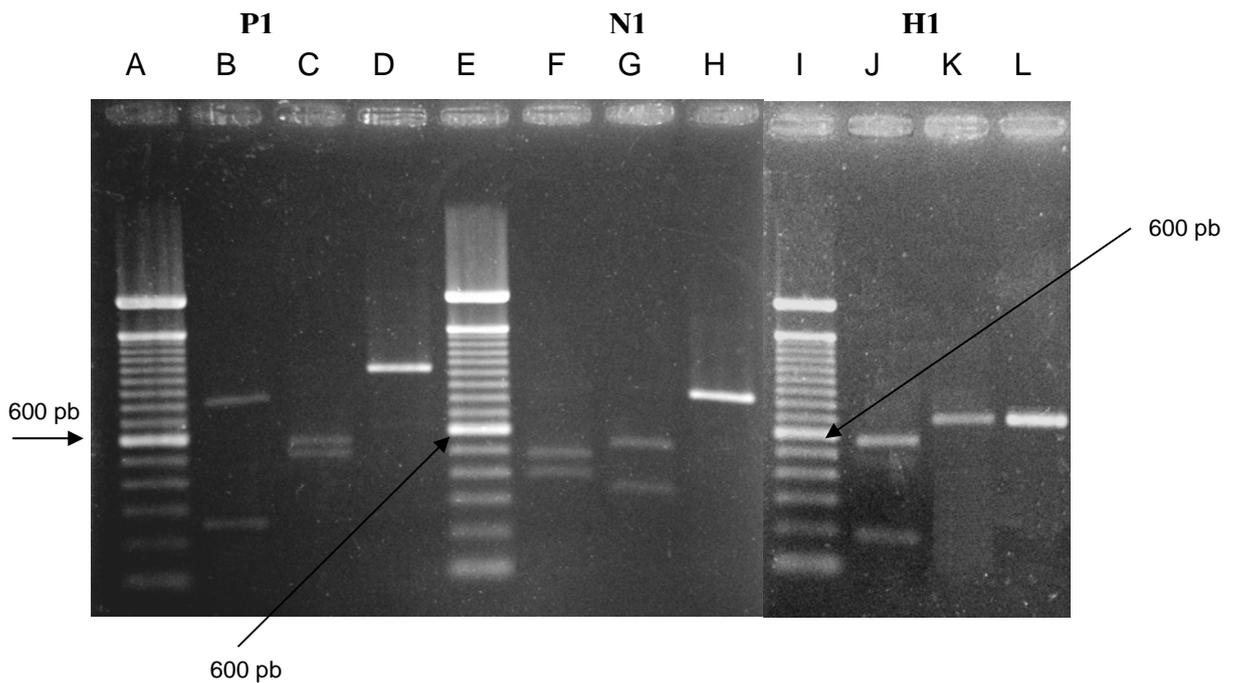
Para se avaliar o grau de similaridade e conservação entre a cepa vacinal LED e as selvagens de CDV (SNC 1, 2 e 3) foram realizadas clivagens com enzimas de restrição específicas para cada par dos oligonucleotídeos testados H1, P1 e N1.

Tabela 6. Padrões de clivagem esperados. Os valores estão em pares de base (pb)

	Eco RI	Eco RV	Ava I	Pvu II	Nco I	Não clivado
H1	550 180	420 310	-	-	-	730
P1	-	-	800 252	572 480	-	1052
N1	-	-	510 349	-	450 409	859

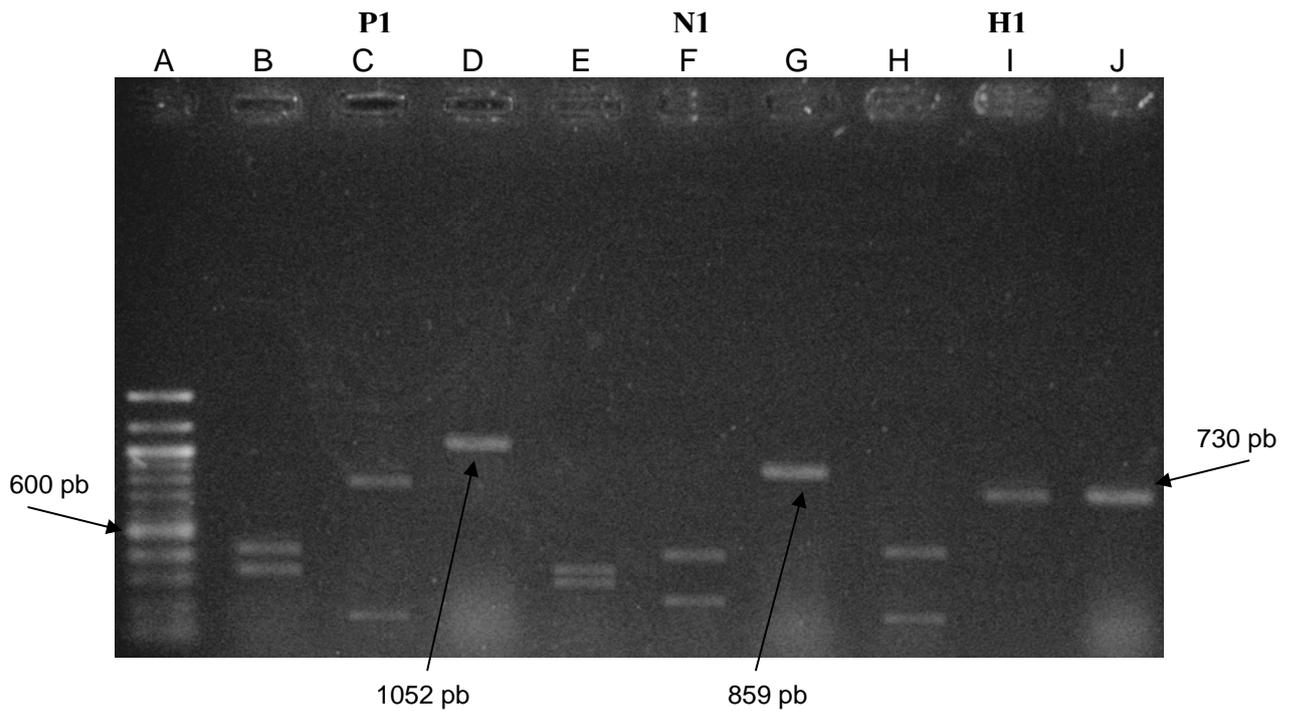
Na cepa vacinal LED ocorreu a clivagem nos amplicons P1 e N1. Com a enzima *PvuII* o segundo fragmento revelou-se maior do que os 480 pb esperados. No amplicon H1 a enzima *EcoRI* clivou os fragmentos esperados de 550 e 180 pb respectivamente, já em relação à enzima *EcoRV* não ocorreu clivagem (FIGURA 8).

Figura 8. Resultados das clivagens com enzimas de restrição da cepa **Lederle**. **P1**: B- *Ava*I, C- *Pvu*II. D- não clivado; **N1**: F- *Nco*I, G- *Ava*I, H- não clivado; **H1**: J- *Eco*RI, K- *Eco*RV, L- não clivado. As bandas A, E e I representam o marcador molecular de 100 pb.



Com o padrão de restrição da cepa vacinal estabelecido, foram realizados experimentos similares com as cepas selvagens SNC 1, 2 e 3. A cepa SNC 1 revelou um padrão similar ao da amostra vacinal, com alguns fragmentos menores em relação a P1 clivado com *Pvu* II e N1 clivado com *Ava* I. Na clivagem realizada pelo enzima *Eco*RI o fragmento maior também revelou-se abaixo do esperado com aproximadamente 500 pb.

Figura 9. Clivagem com enzimas da restrição da cepa **SNC 1**. **P1**: B- PvuII, C- Aval. D- não clivado; **N1**: E-NcoI, F- Aval, G- não clivado; **H1**: H-EcoRI, I- EcoRV, J- não clivado. A banda A representa o marcador Molecular de 100 pb.



A cepa SNC 2 demonstrou um padrão similar a amostra SNC 1 (figura 10). A amostra SNC 3 revelou um padrão similar as amostras selvagens SNC 1 e 2 em relação as clivagens dos amplicons P1 e N1. O amplicon H1 clivado com a enzima Eco RI demonstrou um produto de tamanho menor em relação ao esperado e também em relação as demais amostras selvagens; não foi observada a banda inferior (180 pb) pela ausência do sítio para a enzima ou devido a degradação deste fragmento(figura 11).

Comparando as 3 amostras selvagens e a vacinal algumas divergências foram observadas (tabela 7). O amplicom P1 das amostras selvagens clivado com a enzima *Pvu* II revelou um perfil de restrição abaixo do esperado. A amostra vacinal demonstrou um perfil de restrição acima do esperado. As clivagens com a enzima *Ava* I das amostras selvagens e vacinal corresponderam de forma similar ao padrão esperado.

O amplicom N1 clivado com as enzimas *Nco* I e *Ava* I tanto das amostras selvagens como da amostra vacinal tiveram resultados similares ao esperado (tabela 6).

O amplicom H1 demonstrou resultados diferentes entre cada amostra, inclusive as selvagens. Essa diferença apresentada nos amplificados do gene H são esperadas, uma vez que este gene é responsável pelas características antigênicas do vírus e sua utilização na diferenciação de cepas vacinais ou selvagens é amplamente pesquisada por muitos autores (Carpenter et al., 1998; Iwatsuki et al., 2000; Mochizuki et al., 1999).

O gene da hemaglutinina por representar as características antigênicas do CDV e, por isso sofrer pressão do sistema imune do hospedeiro é, o gene menos conservado dentre todos os genes do CDV (Hashimoto et al., 2001).

Em relação à enzima *EcoRV*, sua utilização em análises do gene da hemaglutinina é baseada no trabalho de Ohashi et al., 1998 que propõe o uso desta enzima para diferenciar as cepas vacinais (antigas) das cepas selvagens atuais. Nas cepas vacinais não ocorre a clivagem, entretanto, cepas recentes isoladas do ambiente possuem sítios de clivagem para essa enzima.

Comparando-se com cepas selvagens isoladas e seqüenciadas recentemente de várias partes do mundo, há sítios de clivagem para Eco RV. O autor, propõe seu uso para uma rápida identificação molecular de amostras isoladas do ambiente.

Figura 10. Clivagem com enzimas de restrição da cepa **SNC 2**. **P1**: B- PvuII, C- Aval. D- não clivado; **N1**: E-NcoI, F- Aval, G- não clivado; **H1**: H-EcoRI, I- EcoRV, J- não clivado. A banda A representa o marcador molecular de 100 pb.

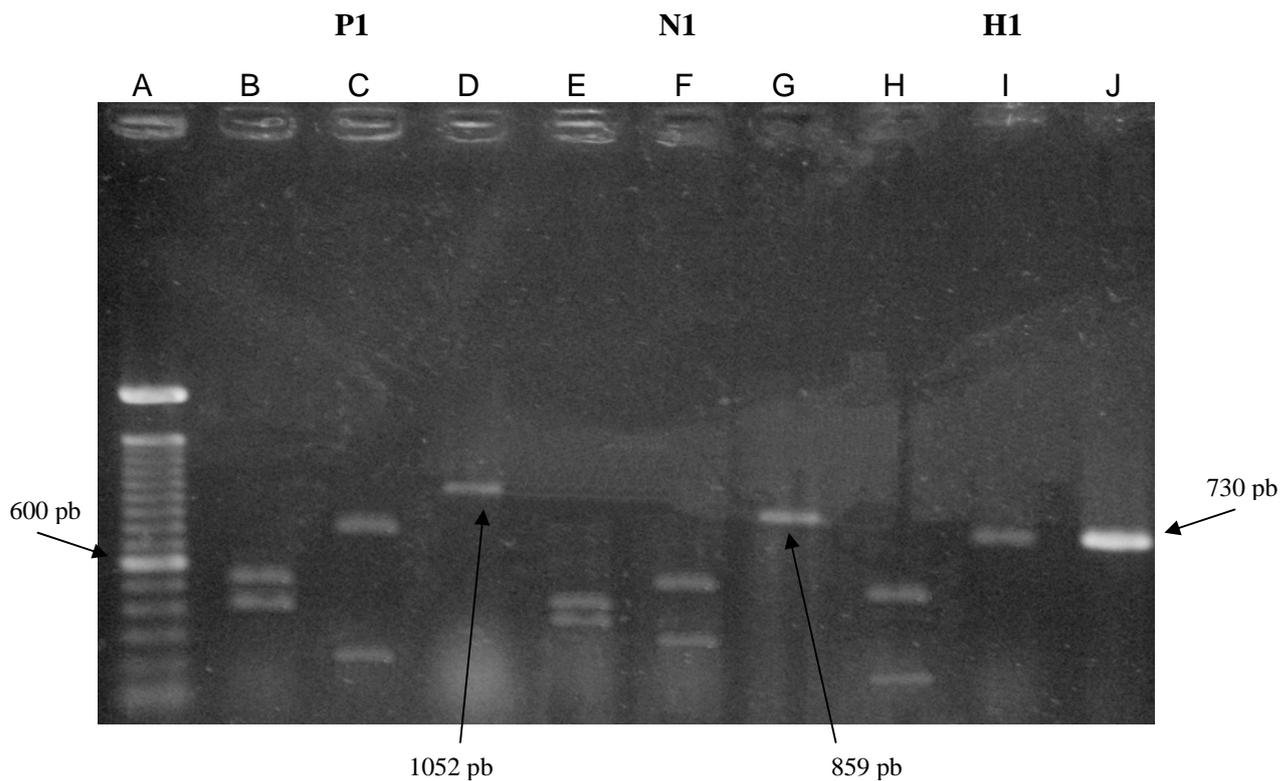
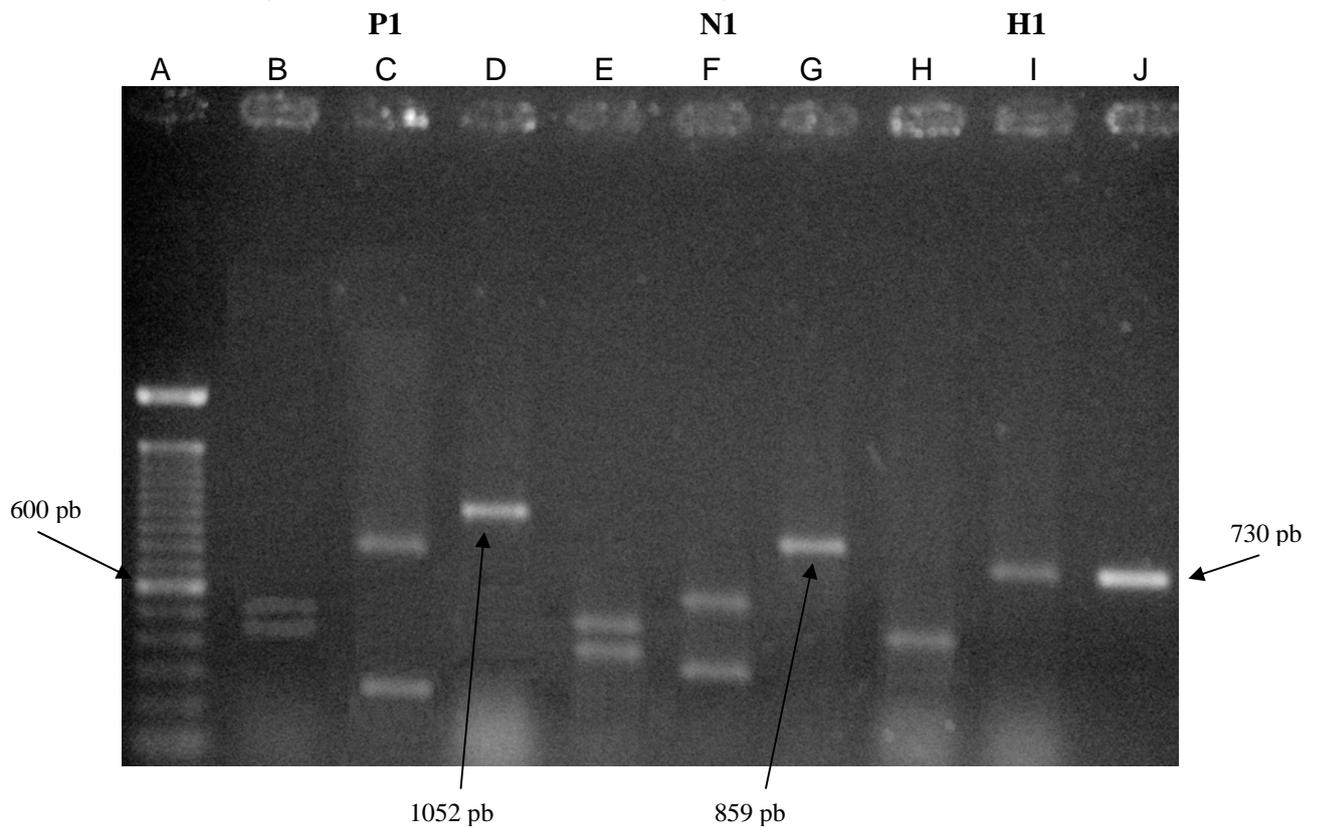


Figura 11. Clivagem com enzimas da restrição da cepa SNC 3 . **P1**: B- PvuII, C- Aval. D- não clivado; **N1**: E-NcoI, F- Aval, G- não clivado; **H1**: H-EcoRI, I- EcoRV, J- não clivado. A banda A representa o marcador Molecular de 100 pb.



Alguns trabalhos têm avaliado as diferenças entre os demais genes do CDV que podem interferir na eficiência e patogênese do CDV. No trabalho de Scagliarini et al.,(2003) é analisado o gene da nucleoproteína entre cepas vacinais e selvagens que revelaram índices iguais ou inferiores a 90% de similaridade. Os

autores sugerem que, mudanças na estrutura da proteína do nucleocapsídeo viral podem representar a base molecular da virulência do CDV.

Tabela 7. Tabela comparativa dos resultados dos padrões de clivagem dos diferentes oligonucleotídeos. Valores aproximados em pares de base (pb).

	LEDERLE	SNC1	SNC 2	SNC 3
P1 (1052)				
<i>Ava I</i>	800	800	810	800
	252	252	242	252
<i>Pvu II</i>	572	572	572	572
	480	480	480	480
N1 (859)				
<i>Ava I</i>	510	510	539	539
	349	349	320	320
<i>Nco I</i>	459	450	450	459
	400	409	409	400
H1 (730)				
<i>Eco RI</i>	550	570	550	450
	180	160	180	-*
<i>Eco RV</i>	730	730	730	730

-* não determinado

No trabalho de Wakasa et al., 1999 foram analisadas as seqüências do gene da fosfoproteína, que revelaram índices de similaridade de 93%, 90-91% e 92% entre as três proteínas codificadas por este gene. Embora tenham representado uma baixa similariedade para genes considerados conservados, regiões funcionalmente importantes estavam altamente conservadas. Estas diferenças podem ser relacionadas a mudanças na patogenicidade e aumento da prevalência do CDV.

5. CONCLUSÕES

Dentro das condições experimentais avaliadas em nosso projeto, desenvolvemos uma RT-PCR para o diagnóstico do CDV. Os oligonucleotídeos N1 e P1 revelaram-se mais sensíveis e específicos em relação a H1, embora todos os 3 oligonucleotídeos possam ser utilizados no diagnóstico de CDV. O oligonucleotídeo P2 demonstrou-se inapropriado para o diagnóstico.

As amostras suspeitas L1, L2, L3 e L4 revelaram-se não ser CDV, mas outro agente viral que necessita de mais pesquisas para ser elucidado.

Para uma caracterização molecular com enzimas de restrição propomos o uso do oligonucleotídeo H1 com as enzimas Eco RI e Eco RV pela possibilidade de caracterizar a cepa de interesse como recente ou antiga.

Neste estudo preliminar a RFLP revelou-se uma importante ferramenta para diferenciação das cepas de CDV utilizadas neste experimento.

As amostras selvagens podem representar cepas antigas de CDV, porém é necessário analisar mais amostras que sejam representativas em nossa localidade e de outras regiões para poder avaliar com maior segurança essa proposição.

6. PERSPECTIVAS

Análises por RFLP de diferentes amostras isoladas de CDV locais e de outras regiões poderão fornecer subsídios para esclarecer questões relativas à epidemiologia e a situação atual do CDV em nossa região. Além disso o sequenciamento das amostras brasileiras poderia esclarecer e elucidar questões relativas a origem e distribuição das cepas selvagens de CDV que circulam em nosso país e em nossa região, além de esclarecer questões relacionadas a RFLP como a presença ou ausência de sítios e de similaridades genéticas.

Para futuros experimentos esta RT-PCR deve ser avaliada frente a diferentes amostras clínicas, em diferentes períodos do curso da infecção para se avaliar sua praticidade e as condições pertinentes à detecção da CDV.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

APPEL, M. J. G. Canine distemper virus. In: HORZINEK, M. **Virus infections of carnivores**. Amsterdam: Elsevier Science, 1987. p. 133-159.

APPEL, M. J. G. Canine distemper virus. In: GAGENE, C. E. (Ed.). **Infections diseases of the dog and the cat**. 2nd ed. Philadelphia: W.B. Sanders, 1998. p. 9-22.

APPEL, M. J. G. et al. Morbillivirus diseases of animals and man. In: GIBBS, E. P. J. (Ed.). **Comparative diagnoses of viral diseases**. London: Academic, 1981. v. 4. p. 235-297.

APPEL, M. J. G.; SUMMERS, B. A. Canine distemper: current status. In: CARMICHAEL, L. (Ed.). **Recent advances in canine infectious diseases**. Ithaca: International Veterinary Information Service, 1999. Disponível em: <http://www.ivis.org/advances/infect_Dis_Carmichael/appel/chapter_frm.asp?LA=1>. Acesso em: 11 jul 2005.

BAKER, J. A. et al., Nomograph that predicts the age to vaccinate puppies against distemper. **The Cornell Veterinarian**, Ithaca, v. 49, n. 1, p. 158-167, 1959.

BARRET, T. The molecular biology of the *Morbillivirus* (measles) group. **Biochemical Society Symposia**, London, v. 53, p. 25-37, 1987.

BARRET, T. et al. Dolphin and porpoise morbilliviruses are genetically distinct from phocine distemper virus. **Virology**, New York, v. 193, n. 2, p. 1010-1012, 1993.

BIAZONNO, L.; HAGIWARA, M. K.; CORRÊA, A. R. Avaliação da resposta imune humoral em cães jovens imunizados contra a cinomose com vacina de vírus atenuado. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 38, n. 5, p. 245-250, 2001.

BLIXENKRONE-MOLLER, M. et al. Phocid distemper virus - a threat to terrestrial mammals? **Veterinary Record**, London, v. 127, n.10, p. 263-264, 1990.

BOOM, R. et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 28, n. 3, p. 495-503, 1990.

BURLESON, F. G.; CHAMBERS T. M.; WIEDBRAUK, D. L. **Virology, a laboratory manual**. San Diego: Academic Press, 1992.

CABASSO, V. J.; SCHROEDER, C. R.; STEBINSS, M. R. Isolation of distemper from the south American maned Wolf (*Chrysocyon jubatus*). **Veterinary Medicine**, Chicago, v. 5, p. 330-332, 1956.

CARPENTER, M. A. et al. Genetic characterization of canine distemper virus in Serengeti carnivores. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 65, p. 259-266. 1998.

CHALMERS, W. S. K.; BAXENDALE, W. **Veterinary Record**, London, v. 135, n. 15, p. 349-353, 1994.

CHAPPUIS, G. Control of canine distemper. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 44, n. 2-4, p. 351-358, 1995.

COLLINS, P. L.; CHANOCK, R. M.; McINTOSH, K. Parainfluenza viruses In: FIELDS, B. N. (Ed.). **Fields virology**. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996. v.1. p.1205-1242.

COURTENAY, O.; QUINNELL, R. J.; CHALMERS, W. S. K. Contact rates between wild and domestic canids: no evidence of parvovirus or canine distemper virus in crab-eating foxes. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 81, n. 1, p. 9-19, 2001.

CURRAN, M. D. et al. Molecular characterization of phocine distemper virus: gene order and sequence of the gene encoding the attachment (H) protein. **Journal of General Virology**, London, v. 73, pt. 5, p. 1189-1194, 1992.

DEEM, S. L. et al. Canine distemper in terrestrial carnivores: a review. **Journal Of Zoo And Wildlife Medicine**, Lawrence, v. 31, n. 4, p. 441-451, 2000.

DIALLO, A. Morbillivirus group: genome organization and proteins. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 23, n. 1-4, p. 155-163, 1990.

ELNIFRO, E. M. et al. Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. **Clinical Microbiology Reviews**, London, v.13, p. 559-570, 2000.

FRISK, A. L. et al. Detection of Canine Distemper Virus Nucleoprotein RNA by Reverse Transcription-PCR Using Serum, Whole blood and Cerebrospinal Fluid from Dogs with Distemper. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 7, n. 11, p. 3634-3643, 1999.

FRÖLICH, K. et al. Epizootiological investigations of canine distemper virus in free-ranging carnivores from Germany. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 74, n. 4, p. 283-292, 2000.

GEBARA, C. M. S. et al. Lesões histológicas no sistema nervoso central de cães com encefalite e diagnóstico molecular da infecção pelo vírus da cinomose canina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 56, n. 2, p. 168-174, 2004.

GEMMA T. et al. Serological analysis of canine distemper virus using an immunecapture ELISA. **The Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v. 58, n. 8, p. 791-794, 1996.

HAAS, L. et al. Analysis of the H gene, the central untranslated region and the proximal coding part of the F gene of wild-type and vaccine canine distemper virus. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 69, n. (1-2), p. 15-18, 1999.

HARDER, T. C., OSTERHAUS, A. D. M. E. Canine distemper virus – a morbillivirus in search of new hosts? **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 5, n. 3, p. 120-124, 1997.

HASHIMOTO, M.; UNE, Y.; MOCHIZUKI. Hemagglutinin genotype profiles of canine distemper virus from domestic dogs in Japan. **Archives of Virology**, Viena, v. 146, n. 1, p. 149-155, 2001.

HEADLEY, S. A.; GRAÇA, D. L. Canine distemper: epidemiological findings of 250 cases. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 37, n. 2, p. 1413-1423, 2000.

IMAGAWA, D. T. Relationships among measles, canine distemper and rinderpest viruses. **Progress in Medical Virology**, New York, v.10, p. 160-193, 1968.

IWATSUKI, K. et al. Antigenic differences in the H proteins of canine distemper virus. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 71, n. 3-4, p. 281-286, 2000.

JENSEN, T. et al. Another Phocine Distemper Outbreak in Europe. **Science**, Washington, v. 297, n. 5579, p. 209, 2002.

JOZWIK, A.; FRYMUS T. Natural Distemper in Vaccinated and Unvaccinated Dogs in Warsaw. **Journal of Veterinary Medicine B**, Berlim, v. 49, n. 9, p. 413-414, 2002.

LAMB, R. A.; KOLAKOFSKY, D. Paramyxoviridae: the viruses and their replication In.: FIELDS, B. N. (Ed.) **Fields virology**. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996. v.1. p. 1177-1204.

LEISEWITZ, A. L. et al. Canine distemper infections, with special reference to South Africa, with a review of the literature. **Journal South African Veterinary Association**, Pretoria, v. 72, n. 3, p. 127-136, 2001.

KENNEDY, S. et al. Mass die-off of Caspian Seals caused by Canine distemper virus. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 6, n. 6, p. 637-639, 2000.

LEDNICK, J. A. et al. Effective primary isolation of wild-type Canine distemper virus in MDCK, MV1 Lu and Vero cells without nucleotide sequence changes within the entire haemagglutinin protein gene and in subgenomic sections of the fusion and phosphor protein genes. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v.118, n. 2, p. 147-157, 2004.

MAHY, B. J. W.; KANGRO H. O. **Virology methods manual**. London: Academic Press, 1996.

MAIA, O. B. et al. Avaliação pós-vacinal de Lobos guarás *Chrysocyon brachyurus* (Illiger, 1911) contra os vírus da Cinomose e Parvovirose caninas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 51, n. 2, p. 150-158, 1999.

MAMAIEV, L. V. et al. Characterisation of morbilliviruses isolated from Lake Baikal seals (*Phoca sibirica*). **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 44, n. 2-4, p. 251-259, 1995.

McCAW, D. L. et al. Serum distemper virus and parvovirus antibody titers among dogs brought to a veterinary hospital for revaccination. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Ithaca, v. 213, n. 1, p. 72-75, 1998.

MOCHIZUKI, M. et al. Genotypes of Canine Distemper Virus determined by analysis of the hemagglutinin genes of recent isolates from dogs in Japan. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, n. 2, p. 2936-2942, 1999.

MÜLLER, G. et al. Immunohistological and serological investigations of morbillivirus infection in Black Sea harbour porpoises (*Phocoena phocoena*). **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 87, n. 2, p. 183-190, 2002.

MURPHY F. A. et al. **Veterinary virology**. 3rd ed. New York: Academic Press, 1999.

OHASHI, K. et al. Molecular identification of a recent type of canine distemper virus in Japan by restriction fragment length polymorphism. **The Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v. 60, n. 11, p. 1209-1212, 1998.

OSTERHAUS, A. D. M. E. et al. Morbillivirus infections of aquatic mammals: newly identified members of the genus. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 44, n. (2-4), p. 219-227, 1995.

OSTERHAUS, A. D. M. E.; VEDDER, E. J. Identification of virus causing recent seals deaths. **Nature**, London, v. 335, n. 6185, p. 20, 1988.

RZEUZUTKA, A.; MIZAK, B. Application of N-PCR for diagnosis of distemper in dogs and fur animals. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 88, n. 1, p. 95-103, 2002.

SANTOS, N. S. de O. et al. **Introdução à virologia humana**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2nd ed. London: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SCAGLIARINI, A. et al. Molecular analysis of the NP gene of Italian CDV isolates. **Veterinary Research Communication**, Amsterdam, v. 27, suppl. 1, p. 355-357, 2003.

SIDHU, M. S. et al. Canine Distemper terminal and intergenic non-protein coding nucleotide sequences: Completion of the entire CDV genome sequence. **Virology**, New York, v. 193, n. 1, p. 66-72, 1993.

TOBER, C. et al. Expression of Measles virus V protein is associated with pathogenicity and control of viral RNA synthesis. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 72, n. 10, p. 8124-8132, 1998.

VAN de BILDT, M. W. G.; KUIKEN, T.; OSTERHAUS, A. D. M. E. Cetacean morbillivirus are phylogenetically divergent. **Archives of Virology**, Viena, v. 150, n.2, p. 577-583, 2005.

VAN BRESSEN, M. F. et al. An insight into the epidemiology of dolphin morbillivirus worldwide. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 81, n. 4, p. 287-304, 2001.

VAN MOLL, P. et al. Distemper in wild carnivores: an epidemiological, histological and immunocytochemical study. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 44, n. 2-4, p. 193-199, 1995.

VISSER, I. K. et al. Fusion protein gene nucleotide sequence similarities, shared antigenic sites and phylogenetic analysis suggest that phocid distemper virus type

2 and canine distemper virus belong to the same virus entity. **Journal of General Virology**, London, v. 74, n. 9, p. 1989-1994,1993.

WAKASA, C. et al. Sequence analysis of the genes encoding the phosphoprotein of recent isolates of canine distemper virus in Japan. **Virology**, New York, v. 62, n. 1, p. 97-101, 1999.

7. ANEXOS

7.1 Protocolos de extração de RNA viral

Protocolo para extração de RNA viral

Método TRIZOL LS (INVITROGEN)

1. Em um tubo de 1,5 mL adicionar 700 uL de Trizol LS (Invitrogen) e 300 uL da amostra. Ressuspender algumas vezes com o tip para lisar as células. Incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
2. Adicionar 200 uL de Clorofórmio e misturar em vortex durante 15 segundos; após deixar 5 minutos a temperatura ambiente.
3. Este material deve ser centrifugado durante 15 minutos a 12.000 g a 10° C.
4. Após a centrifugação, visualiza-se 3 fases: a fase aquosa (superior e incolor) onde está o RNA, a interfase (precipitado branco) constituída de proteínas e debris e a fase orgânica (inferior avermelhada) onde esta o DNA.
5. Deve ser retirada com cuidado a **fase aquosa** para um novo tubo de 1,5 mL. Neste tubo adiciona-se 500 uL de álcool isopropílico permanecendo a temperatura ambiente durante 10 minutos.
6. Novamente deve ser centrifugado agora a 15.000 g durante 15 minutos a 10° C.
7. Nesta etapa, às vezes, o pellet de RNA fica visível e deve ser retirado o álcool isopropílico do sobrenadante com **cuidado** para não carrear o pellet de RNA.
8. 500 uL de etanol devem ser adicionados e este material é centrifugado a 13.000 g durante 5 minutos. Após deve-se desprezar todo o sobrenadante com **o mesmo cuidado** para não perder o pellet de RNA.
9. O tubo com o RNA fica em estufa durante 5 a 10 minutos apenas para evaporar o etanol excedente.
10. O RNA é ressuspendido em água DEPC e está pronto para servir de molde para a produção do cDNA.

- *OBS: Todo o material a ser utilizado na extração de RNA deve ser **exclusivo e previamente tratado contra as RNAses**. A vidraria deve ser fornada (250 ° C - 5 à 8h) e o material sensível ao calor tratado com **DEPC** durante 24 h. sendo posteriormente autoclavado.
- Durante as extrações deve ser utilizado luvas e ter muito cuidado para não contaminar o material.

Protocolo para extração de RNA viral

Método de Boom et al. 1990. JCM

1. Num tubo 1,5mL adicionar 10 μ L de sílica, 860 μ L de tampão L6, 150 μ L da amostra clínica ou isolada.
2. Incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos sob agitação constante, após centrifugar 15 segundos (12.000g) e descartar o sobrenadante.
3. Adicionar 1 mL de tampão L2 e agitar (vortex) para ressuspender a sílica.
4. Centrifugar 15 segundos a 12.000g e descartar o sobrenadante.
5. Repetir o passo 3 totalizando duas lavagens com L2.
6. Adicionar 1 mL de etanol 70% e agitar (vortex) para ressuspender a sílica.
7. Centrifugar 15 segundos a 12.000g e descartar o sobrenadante.
8. Repetir o passo 6 totalizando 2 lavagens com etanol.
9. Adicionar 1 mL de acetona e agitar (vortex) para ressuspender a sílica.

10. Centrifugar 20 segundos a 12.000g e descartar o sobrenadante.

Cuidado para não carrear o pellet de RNA.

11. Secar o pellet a 56°C com os tubos abertos por 10 minutos.

Importante observar nenhum resquício de acetona.

12. Preparam uma mistura de 30µL de água DEPC + 1µL RNase OUT e adicionar no tubo.

13. Ressuspender ligeiramente o sedimento e incubar os tubos a 56°C/15minutos com a tampa fechada.

14. Ressuspender ligeiramente novamente e centrifugar a 12.000g/5minutos.

15. Coletar aproximadamente 24µL do sobrenadante. **Esta etapa é crítica, não pode ser carreada à sílica, pois ela inibe as reações de polimerização posteriores.**

16. Estocar em freezer - 70°C ou fazer a síntese de cDNA.

- *OBS: Todo o material a ser utilizado na extração de RNA deve ser **exclusivo e previamente tratado contra as RNAses**. A vidraria deve ser fornada (250 ° C - 5 à 8h) e o material sensível ao calor tratado com **DEPC** durante 24 h. sendo posteriormente autoclavado.
- Durante as extrações deve ser utilizado luvas e ter muito cuidado para não contaminar o material.

7.2 Soluções para cultivo celular e biologia molecular

TAE (50X)

Ácido Acético Glacial	57,1g
TRIS- BASE	242 g
EDTA 0,5M (pH 8,0)	20 mL
Água MILLI-Q q.s.p.	1000 mL

TAE (1X)

TAE 50X	20 mL
Água MILLI-Q q.s.p.	1000 mL

TAMPÃO ENZIMA M-MLV ESTOQUE

TRIS-HCL 1 M	10 mL
KCL 1M	10 mL
NaOH 10M	5 mL

TAMPÃO ENZIMA M-MLV 1X

TRIS-HCL 250 mM (pH8,3)	375 μ L
KCL 375 mM	562 μ L
MgCl ₂ 15 mM	450 μ L
Água DEPC	113 μ L

PBS 10 X (pH 7.2)

NaCl	85,0 g
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	15,5 g
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	2,3 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL

PBS 1 X (pH 7,2)

PBS 10 X	100 mL
Água destilada q.s.p.	1000 mL
PBS-BSA (0,1%)	
PBS 1X	200mL
BSA	0,2g

TRIPSINA VERSENE (pH 7,8)

Tripsina	0,5 g
KCl	0,4 g
NaCl	8,0 g
EDTA	0,2 g
NaHCO ₃	10,0 g
Vermelho de Fenol	1,2 mL
Água destilada q.s.p.	1000 mL

TAMPÃO L6

GuSCN	120 g
TRIS 0,1M (pH 6,4)	100 mL
EDTA 0,2M (pH 8,0)	22 mL
TRITON X-100	2,6 mL

TAMPÃO L2

GuSCN	120 g
TRIS 0,1M (pH 6,4)	100 mL

TRIS-HCl

TRIS HCL 0,1 M (pH 6,4)	15,75 g
Água DEPC q.s.p.	1000 mL

NaOH

NaOH 10M	400 g
Água destilada q.s.p.	100 mL

ETANOL 70%

Etanol	70 mL
Água DEPC q.s.p.	100 mL

Brometo de Etídio

Brometo de etídio	C.F.(0,5 µg/ µL)	2 µL
Tampão TAE 1X		200 mL

MEM Com SFB

MEM	10 g
SFB	100 mL
Água q.s.p.	1000 mL

Alsever

Citrato de sódio	8 g
Cloreto de sódio	4,2 g
Ácido cítrico	0,55 g
Dextrose	20,50 g
Água destilada q. s. p.	1000 mL

EDTA 0,5M pH 8,0

EDTA	18,61 g
Água destilada q. s. p.	100 mL

GEL DE AGAROSE

Agarose 1%	2,0 g
TAE 1X	200 mL