

aos sete dias. **Discussão:** A PCR convencional foi muito utilizada para a detecção do CAstV e a maioria de registros do vírus tem sido efetuados com o emprego desta técnica, porém só demonstraram a presença do vírus e a concentração de partículas virais presentes nas amostras. No presente trabalho foi determinada a presença e a concentração do CAstV, com maior rapidez e em concentrações ínfimas. **Conclusão:** O presente trabalho mostra que o RT-qPCR Sybr Green é sensível e específico para a detecção de CAstV e que se apresentou como um instrumento rápido e eficaz para a detecção e quantificação do vírus, com custo inferior ao dos ensaios de RT-qPCR TaqMan. **Apoio Financeiro:** CAPES - CNPq. **Palavras-chave:** Astrovírus de galinha. PCR em tempo real. RT-qPCR Sybr Green.

PADRONIZAÇÃO DE UMA REAÇÃO DE PCR TAQMAN EM TEMPO REAL PARA A DETECÇÃO DO VÍRUS DA LARINGOTRAQUITE INFECCIOSA DAS GALINHAS

SANTANDER PARRA, SILVANA HIPATIA; NÚÑEZ, LUIS FABIAN NARANJO; BUIM, MARCOS; ASTOLFI-FERREIRA, CLAUDETE, FERREIRA, ANTONIO JOSE PIANTINO

Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo

Introdução e objetivos: A laringotraqueíte infecciosa (LTI) é uma doença respiratória altamente contagiosa que causa severas perdas econômicas devido à mortalidade, diminuição da produção de ovos, perda de peso e predisposição a infecções causadas por outros patógenos aviários. Diversas técnicas moleculares são utilizadas para a sua detecção e caracterização entre elas PCR, RFLP, PCR em tempo real (qPCR); sendo esta última mais sensível que os métodos tradicionais. O presente trabalho padronizou uma reação de qPCR TaqMan dirigida para a amplificação do gene da glicoproteína C (gC) visando a detecção do vírus da LTI. **Materiais e Métodos:** Vacinas TCO (Schering Plough) e CEO (Fort Dodge) foram usadas para a padronização da qPCR. A reação de qPCR usando primers e sonda TaqMan específicos para a amplificação do gene que amplifica a gC foi utilizada. Um fragmento do gene que amplifica a gC, foi amplificado e clonado, para a obtenção do DNA padrão e realizar uma diluição com um número de cópias conhecidas, a partir destas foram realizadas 10 diluições seriadas com fator 10, para determinar os limites de detecção do ensaio. Diluições seriadas com fator 10 também foram realizadas com o DNA extraído das vacinas. **Resultados:** A qPCR amplificou um fragmento de 189 pb, e detectou e quantificou partículas virais em diluições contendo 10¹⁰ até 10¹ cópias do plasmídeo, mostrando uma curva com uma eficiência de 98 % com um slope de -3,025 e R²=0,981. No DNA extraído das vacinas foram detectados e quantificados até cinco partículas virais. As curvas de amplificação se apresentaram limpas e sem dímeros. **Discussão:** A rápida detecção do vírus da LTI pode ser de grande ajuda no controle da disseminação do vírus entre lotes vizinhos já que é uma doença altamente contagiosa e que causa grandes perdas econômicas na indústria avícola. A qPCR tem mostrado alta especificidade quando utilizada para a detecção e quantificação de diversos herpesvírus e patógenos aviários, mostrando-se de grande utilidade para o screening de amostras clínicas em estudos epidemiológicos. **Conclusão:** O presente trabalho indica a utilidade da qPCR para a detecção e quantificação do vírus da LTI podendo ser utilizada como método de diagnóstico rápido, mostrando alta sensibilidade e especificidade, detectando poucas partículas virais e com baixo número de casos falsos negativos. **Apoio Financeiro:** CNPq. **Palavras-chave:** PCR em tempo real. qPCR TaqMan. Vírus da laringotraqueíte infecciosa.

PERFIL DE DISSOLUÇÃO DA FORMA ACABADA DO GRÂNULO COMERCIAL DO ALDICARBE (TEMIK®)

FUKUSHIMA A.R1,2, ANAZAWA, T.A2, LEONI, L.A.B2, GONZALEZ-DOMINGUES, M.V5, NICOLETTI, M.A5 GONÇALVES V.J1, BERTAFGLIA, E. B1, SIQUEIRA A1, FLORIO J.C3, MAIORKA P.C4, SPINOSA H.S4.

1. Aluno do Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada - Departamento de Patologia - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) - Universidade de São Paulo (USP)
2. Professor da Universidade São Judas Tadeu (USJT)
3. Especialista de Laboratório - Departamento de Patologia - FMVZ-USP
4. Professor - Departamento de Patologia - FMVZ-USP
5. Professor da Universidade de Guarulhos (UNG)

Introdução: O aldicarbe, Temik150® (Bayer Cropsciences), vulgarmente conhecido como chumbinho, foi comercializado no Brasil até o ano de 2012, quando teve seu registro cancelado em função do seu uso ilícito como raticida, o que favorecia a ocorrência de intoxicações graves e fatais em animais não alvo, e até mesmo em seres humanos. Durante as análises do conteúdo estomacal de animais intoxicados e necropsiados pelo Serviço de Patologia Animal do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP) é comum o encontro de grânulos semelhantes ao praguicida, que após a análise toxicológica sistemática apresentam, positividade para aldicarbe. As análises utilizando conteúdo estomacal de animais, curiosamente detectaram também os seus metabólitos aldicarbe sulfóxido que apresenta dose letal 50% (DL₅₀) oral para ratos de 0,49mg/kg e aldicarbe sulfona que apresenta DL₅₀ oral para ratos de 27,0mg/kg, sendo que o primeiro metabólito é 10 vezes mais tóxico que o próprio aldicarbe (DL₅₀ oral para ratos de 5,0mg/kg). **Objetivo:** o presente trabalho avaliou a cinética de liberação do princípio ativo tóxico da forma acabada dos grânulos de Temik150®, utilizando o perfil de dissolução, a fim de avaliar a formação in vitro de seus metabólitos em meio ácido. **Material e métodos:** Foram avaliados os grânulos de Temik150® adquiridos no comércio. Para o perfil de dissolução foi utilizado um aparelho de dissolução Varian modelo VK7010 Dissolution System, equipado com seis cubas; cada cuba recebeu 900mL de ácido clorídrico 0,1N, a pH 3,0. O cromatógrafo foi um Agilent modelo 1200 Series High G1316A, e detector de arranjo de diodos. Foi utilizada uma coluna Zorbax Extend C18, 150X4,6mm. O volume de injeção foi de 50µL, a fim de evitar sobrecarga da coluna. O comprimento de onda selecionado para a quantificação foi de 213nm. A fase móvel utilizada foi composta por acetonitrila e água utilizando o modo de eluição gradiente. **Resultados e discussão:** O método para separação cromatográfica produziu uma separação adequada dos analitos com resolução suficiente, tanto para identificação quanto quantificação de compostos. O perfil de dissolução dos grânulos do Temik150® em meio ácido mostrou a presença in vitro dos metabólitos aldicarbe sulfóxido e o aldicarbe sulfona, enquanto o aldicarbe para análise não mostrou a produção de metabólitos. Considerando que o aldicarbe sulfóxido apresenta maior toxicidade que a molécula de origem, este achado deve ser considerado quando se avalia a toxicidade deste praguicida. **Conclusões:** O método empregado apresentou potencial para elucidação da questão e que o metabólito do aldicarbe deve ser considerado como agravante nos quadros de intoxicação por Temik 150®. **Palavras-chave:** Aldicarbe. Chumbinho. Grânulos de Temik150®.