

Sobral, CE, Brasil.

E-mail: rizado@cnpq.embrapa.br

²Universidade Estadual Vale do Acaraú, Sobral, CE, Brasil.

³Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil.

⁴Fundação Cearense de Apoio à Pesquisa, Fortaleza, CE, Brasil.

Diagnóstico do vírus da diarreia viral bovina (BVDV) em amostras de sêmen por RT-PCR convencional e cinética

Diagnosis of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in semen samples by conventional and RT-PCR and real time

Gasparini, M.R.^{1,2}; Carvalho, I.L.Q.¹; Oliveira, A.P.²; Barbosa, A.A.S.¹; Leite, R.C.²; Barbosa-Stancioli, E.F.¹

O vírus da diarreia viral bovina (BVDV) é um importante patógeno que infecta rebanhos bovinos do mundo inteiro, pertencente à família *Flaviviridae* e ao gênero *Pestivirus*. A infecção por BVDV pode causar problemas gastrointestinais, respiratórios e reprodutivos, com conseqüente prejuízo para a pecuária nacional. Nesse contexto, destaca-se a infecção uterina gerando animais persistentemente infectados (PI), responsáveis pela manutenção do vírus nos rebanhos. Circulam nos rebanhos dois genótipos do BVDV (BVDV-1 e BVDV-2), pertencentes a dois biótipos (amostras citopatogênicas – CP – ou não citopatogênicas – NCP), dependendo do efeito em cultura celular, com diferentes graus de virulência. O sêmen de animais infectados se destaca como forma de transmissão viral na inseminação artificial (IA), monta natural ou pela transferência de embrião, sendo preconizada pela OIE a testagem do sêmen. O objetivo deste trabalho foi a padronização de um teste de PCR sensível e específico para o diagnóstico do BVDV em sêmen bovino. O BVDV-1 (ATCC NADL), expandido em células MDBK (CCL-22, ATCC) e cultivadas com 10% de soro fetal equino, foi utilizado para a extração do RNA total com Tri-reagente segundo as instruções do fabricante. Inicialmente, produziu-se cDNA utilizando o kit Improm II (Promega®), seguido de reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando-se iniciadores específicos que ancoram na região 5'UTR (290 pb), região conservada dos *Pestivirus*. O *amplicon* foi clonado em vetor plasmidial pGEM-T-easy seguido de sequenciamento para a confirmação da especificidade do teste. A sensibilidade do teste foi aferida com o plasmídeo diluído na base 10, tendo sido a detecção observada até 44 fentogramas. Em seguida, o teste foi repadronizado em passo único (RT-PCR) para aumentar a sua rapidez e eficiência, utilizando-se um kit. Foram testadas 12 amostras clínicas de sêmen bovino provenientes de um único rebanho, tendo apresentado 83,3% de positividade (10/12). O passo seguinte foi a padronização da PCR para o sistema cinético (PCR em tempo real). O plasmídeo produzido foi então linearizado com o uso do corante *Syber Green*, e os resultados mostraram um *slope* -3,341 e eficiência de 99,194%. Tanto o teste de PCR convencional quanto o de PCR cinético desenvolvidos mostraram-se eficientes para o diagnóstico do BVDV em sêmen, destacando-se o seu uso em programas de controle.

*Instituição financiadora: CNPq / Mapa, Capes, Fapemig.

¹Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Microbiologia, Av. Antônio Carlos, 6627, CEP 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brasil. E-mail: marcelagasparini@gmail.com

²Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Belo Horizonte, MG, Brasil.

Diagnóstico de herpesvírus bovino (BoHV-1 e BoHV-5) em sêmen

Diagnosis of bovine herpesvirus (BoHV-1 and BoHV-5) in semen

Gasparini, M.R.^{1,2}; Carvalho, I.L.Q.¹; Oliveira, A.P.²; Barbosa, A.A.S.¹; Leite, R.C.²; Barbosa-Stancioli, E.F.¹

Os herpesvírus bovinos pertencem à família *Herpesviridae*, tendo como característica principal o estabelecimento de latência com posterior reativação viral causada por fatores como estresse e uso de corticoide. Devido a essa capacidade, os animais infectados eliminam vírus de maneira intermitente em excreções e secreções corpóreas, necessitando-se de ferramentas diagnósticas sensíveis e específicas para os programas de controle. Os herpesvírus bovinos apresentam distribuição mundial, tendo grande importância econômica para a pecuária brasileira, destacando-se o Herpesvírus Bovino 1 (BoHV-1), causador da rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) e balanopostite e vulvovaginite pustular infecciosa (IPB/IPV), e o Herpesvírus bovino 5 (BoHV-5), que cocircula nos rebanhos juntamente com o BoHV-1, induzindo quadros de encefalite, além de quadros respiratórios e reprodutivos. Devido à importância crescente da inseminação artificial no Brasil, e sendo o sêmen uma via de transmissão importante, este trabalho tem como objetivo a elaboração de um teste diagnóstico molecular rápido e específico para a detecção do BoHV-1 e BoHV-5 em sêmen bovino. Amostras virais padrão foram cultivadas em células CRIB e o DNA total foi extraído com Tri-reagente segundo instruções do fabricante. Padronizou-se uma PCR utilizando iniciadores para a amplificação do gene viral codificador da glicoproteína G (495pb para BoHV-1.1, 1.2 e 531pb para BoHV-5) e do gene normalizador GAPDH (97pb). Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose e observaram-se *amplicons* nos tamanhos moleculares esperados para cada gene. Foi produzido um plasmídeo contendo os genes viral e normalizador e os insertos foram conferidos por sequenciamento gênico. A PCR foi então repadronizada como duplex (gG + GAPDH) com sucesso, variando-se condições de extrinsecência e de concentração dos iniciadores para os dois distintos genes. O teste mostrou alta sensibilidade (detecção de 400 fentogramas de inserto) e a especificidade foi avaliada com outros herpesvírus animais e humanos pertencentes à mesma família, tendo amplificado somente BoHV-1 e BoHV-5. A PCR duplex desenvolvida foi utilizada com sucesso em amostras clínicas de sêmen bovino provenientes de um rebanho de animais soropositivos para BoHV-1 e BoHV-5, evidenciando o seu uso para triagem de sêmen.

*Instituição financiadora: CNPq / Mapa, Capes, Fapemig.

¹Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Microbiologia, Av. Antônio Carlos, 6627, CEP 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brasil.

E-mail: marcelagasparini@gmail.com

²Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Belo Horizonte, MG, Brasil.

Vaccinia virus: presença de DNA viral no leite de vacas experimentalmente infectadas

Vaccinia virus: presence of viral DNA in Milk of experimental infected cows

Oliveira, T.M.L. DE¹; Rehfeld, I.S.¹; Matos, A.C.D.¹; Rivetti Junior, A.V.¹; Guedes, M.I.M.C.¹; Abrahão, J.S.²; Kroon, E.G.²; Lobato, Z.I.P.¹

A *Vaccinia bovina* (VB), zoonose emergente, causada pelo *Vaccinia virus* (VACV) é caracterizada pelo surgimento de lesões ulceradas no teto das vacas em lactação e nas mãos e braços de ordenhadores. A partir da década de 1990, o número de casos de VB vem crescendo, sendo hoje identificados surtos em quase todos os estados brasileiros. A doença é subnotificada e as medidas de contenção necessárias para o seu controle são frequentemente desconhecidas, favorecendo a disseminação da doença. Os prejuízos econômicos relacionados à VB estão associados principalmente à queda brusca na produção do leite, presença de infecções secundárias e aumento dos gastos com medicamentos. Estudos prévios revelaram a presença tanto de DNA, quanto de partículas virais infecciosas do VACV, no leite de vacas doentes em surtos de VB em Minas Gerais, chamando a atenção para o potencial risco à saúde pública. Porém, permanecem desconhecidos o perfil de eliminação do vírus no leite de vacas acometidas e a origem das partículas virais presentes no leite. Este trabalho objetivou pesquisar a presença do DNA viral através da técnica de PCR, em leite de animais experimentalmente infectados, e de estabelecer o período e o perfil de eliminação do vírus no leite. Oito vacas mestiças em lactação, soronegativas para o VACV, foram inoculadas com VACV, amostra GP-2 (isolada de surto de VB ocorrido no município de Guarani, MG), na concentração de 106 PFU/50 µL. Os tetos foram escarificados com lixa, sendo que o teto posterior esquerdo (TPE) de cada vaca não foi inoculado, servindo de controle negativo. Amostras de leite foram coletadas durante 32 dias ininterruptos e alternados até o 60º dia, sendo os dias pares coletados com uma sonda estéril e os dias ímpares através de ordenha manual. Todas as amostras foram submetidas à PCR para o gene *vgf*. Entre o segundo e o quarto dia pós-infecção (DPI), todos os tetos, com exceção do TPE, apresentaram lesões típicas de VB que cicatrizaram em média após 21 dias. Foi possível detectar a presença de DNA viral no leite a partir do terceiro DPI e, de forma intermitente, até o sexagésimo dia. O leite derivado dos tetos inoculados do controle (TPE), de todas as oito vacas, apresentaram, em algum momento, DNA viral. Além disso, indiferentemente da forma de coleta (manual ou com sonda), foi possível detectar o DNA viral no leite. Esses resultados mostram que o vírus pode ser eliminado de forma intermitente no leite durante e após a fase aguda da doença, mesmo após a cicatrização total das lesões, sugerindo uma possível infecção sistêmica e persistente.

Financiamento: CNPq/Mapa, Fapemig, Capes.

¹Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Laboratório de Pesquisa em Virologia Animal, Av. Antônio Carlos, 6.627, CEP 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brasil. E-mail: ziplobato@gmail.com

²Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Microbiologia, Laboratório de Vírus, Belo Horizonte, MG, Brasil.

Bovine vaccinia, a systemic infection: evidence of fecal shedding, viremia and detection in lymphoid organs

Vaccinia bovina, uma infecção sistêmica: evidência de eliminação nas fezes, viremia e detecção do vírus em órgãos linfóides

Rivetti Junior, A.V.¹; Guedes, M.I.M.C.¹; Oliveira, T.M.L. De¹; Rehfeld, I.S.¹; Matos, A.C.D.¹; Rodrigues, N.F.S.¹; Abrahão, J.S.²; Kroon, E.G.²; Lobato, Z.I.P.¹

Bovine vaccinia (BV) is an occupational zoonosis caused by *Vaccinia virus*

(VACV), which affects dairy cattle and milkers. In bovine natural infections, it seems that BV is a localized disease, with cutaneous lesions restricted to the teats. However, there are no studies about experimental infection with VACV in bovines to establish its pathogenesis and elimination pathways. The aim of this study was to study the occurrence of viremia and elimination of VACV in bovine feces. Eight crossbred lactating cows, serologically negative for VACV, were used. Teats were previously scarified with sand paper and then inoculated with 106 pfu/100 µL of Guarani P2 (GP2) strain of VACV. Blood samples and feces were collected daily throughout the experiment. After 66 days post inoculation (d.p.i) the animals were divided into two groups that receive two new different treatments. One group was re-inoculated with the same inoculum and the other was subjected to chemical immunosuppression, to evaluate whether re-infected animals and/or experimentally infected animals that recover from previous lesions in conditions of immunosuppression could eliminate VACV on feces once more. Animals from both groups were monitored for up the 89th day post initial inoculation. Viral DNA was continuously detected and quantified in blood and feces of these animals in an intermittent way, even after the resolution of the lesions. At slaughter, tissues were collected and the viral DNA was detected and quantified from mesenteric and retro mammary lymph nodes, ileum, spleen and liver. The detection of VACV DNA in blood and feces for long period and its detection in lymphatic organs provide new evidence about VACV elimination and suggest, for the first time, that BV could be a persistent systemic infection.

Financial support: CNPq/Mapa, Fapemig, Capes.

¹Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Laboratório de Pesquisa em Virologia Animal, Av. Antônio Carlos, 6.627, CEP 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brasil. E-mail: ziplobato@gmail.com

²Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Microbiologia, Laboratório de Vírus, Belo Horizonte, MG, Brasil.

Simplifying science and technology to clarify and ask the rancher from Rio de Janeiro state everything about rural rabies*

Descomplicando a ciência e a tecnologia para esclarecer e perguntar ao pecuarista fluminense tudo sobre a raiva rural

Meireles, M.A.D.; Pereira, S.R.F.G.; Bernardo-Pedro, T.; Florido, V.A.; Oliveira, A.C.; Linhares, J.M.; Vieira, L.F.P.; Chicarino, C.N.

Rabies is a contagious disease of great interest to the livestock and public health. The etiologic agent is a neurotropic virus (family *Rhabdoviridae* and genus *Lyssavirus*), which affects the central nervous system. The disease has an anthroponotic character, and all mammals may be infected and develop it. Rabies affects domestic herbivores (livestock), and its main transmitter, in rural areas, is the “common vampire bat”, *Desmodus rotundus*. This research aimed at education in health and surveillance of rabies, in a simple and playful, to the cattle ranchers of the Northern and Northwestern regions of Rio de Janeiro State, clarifying aspects about rural rabies. The following municipalities/locations were visited: Batatal, Boa Vista, Cardoso Moreira, Caxeta, Dolores de Macabu, Espírito Santinho, Hatobá, Italiana, Italva, Pedra Santa, Santa Maria,