ALEXANDRA ROSA DA SILVA

**Análise da cinética de replicação do parvovírus canino em cultivo de
células CRFK através da PCR em tempo real**

São Paulo

2011

ALEXANDRA ROSA DA SILVA

**Análise da cinética de replicação do parvovírus canino em cultivo de células CRFK
através da PCR em tempo real**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain

São Paulo

2011

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2497
FMVZ

Silva, Alexandra Rosa da
Evaluation of the replication kinetic of canine parvovirus in CRFK cell culture
using real-time PCR / Alexandra Rosa da Silva. -- 2011.
106 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde
Animal, São Paulo, 2011.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às
Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain.

1. Parvovírus canino. 2. PCR. 3. Sequenciamento. 4. PCR- tempo real.
5. Replicação em cultivo celular. I. Título.

*Comissão de Ética no uso de animais***CERTIFICADO**

Certificamos que o Projeto intitulado "Análise da cinética de replicação do Parvovírus Canino em células de linhagem CRFK através da PCR em tempo real utilizando sondas MGB (Minor Groove Binder), e comparação com o método de titulação convencional", será utilizada a cepa do CPV de Cornell C-780916 presente nas vacinas do Laboratório Biovet, protocolado sob o nº 1929/2010, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 26/05/2010.

We certify that the Research "Analysis of replication kinetics of the Canine Parvovirus in CRFK line cells by Minor Groove Binder probe real-time PCR assay and comparison with the titration conventional method", protocol number 1929/2010, under the responsibility Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 05/26/2010.

São Paulo, 27 de maio de 2010

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

ERRATA

SILVA, A. R. **Análise da cinética de replicação do parvovírus canino em cultivo de células CRFK através da PCR em tempo real.** 2011. 106 f. Dissertação(Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Página	Parágrafo	Onde se lê	Leia-se
Ficha catalográfica	2º	Evaluation of the replication kinetic of canine parvovirus in CRFK cell culture using real-time PCR	Análise da cinética de replicação do parvovírus canino em cultivo de células CRFK através da PCR em tempo real

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SILVA, Alexandra Rosa da

Título: Análise da cinética de replicação do parvovírus canino em cultivo de células CRFK através da PCR em tempo real.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Dedicatória

Dedico esse trabalho aos queridos pais João, Sebastiana e Cristino, ao meu príncipe José Flaviano e aos cães, os grandes amores da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me iluminar e me dar forças para seguir em frente nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais e meu padrinho querido, que sempre me apoiaram em tudo o que eu quis fazer. Amo vocês.

Ao meu príncipe José Flaviano, que esteve presente ao meu lado durante todo esse trabalho. Amo você.

Ao meu orientador Dr. Leonardo Richtzenhain pela paciência, seriedade e por ter me dado um voto de confiança. Eu o admiro muito!

Ao Enio, quem eu aprendi a entender e muito me ajudou em todas as etapas desse trabalho. Obrigada por toda a dedicação e paciência em todos os momentos.

Aos queridos Dr. Roberto Corrêa e Dr. Paulo Corrêa por permitirem que eu realizasse esse trabalho em parceria com a empresa. Não tenho palavras para expressar meu agradecimento pela oportunidade que me deram. Deus os abençoe sempre!

À minha grande incentivadora e “chefa” Sandra Fernandez, sem seu apoio incondicional nada disso teria sido possível. Muitíssimo obrigada por tudo!

Aos “meus” queridos funcionários – Antônio, Benedito, Denis, Edvaldo, Edinelson, Geiza, Geraldo, Ivani, Moisés, Silvano e Willian. Vocês se empenharam em trabalhar corretamente nos momentos em que precisei me ausentar da empresa para as atividades na Universidade. Muito obrigada, sem a dedicação de vocês não teria sido possível chegar aqui!

Ao grande amigo Joaquim Cruz e à Cristiane Ribeiro pelas explicações e a grande ajuda nas titulações de Parvovírus, e ao querido Domingues pela paciência, a amizade e por abrir as portas do Controle de Qualidade sempre que precisei.

À Silvia Nunes e toda sua equipe pela presteza, pelo preparo das amostras e por sempre me atender prontamente quando precisei.

Ao Dirceu por todas as explicações e a boa-vontade em me atender e ajudar.

Ao Diego Santana que sempre correu atrás dos pedidos de compras dos reagentes para a execução do meu trabalho.

À Adriana Bravos que algumas vezes “entrou em pânico” quando os Beagles adoeceram, mas que se dedicou a cuidar deles quando eu estava ausente da empresa, e por todas as outras coisas que fez para me ajudar. Muito obrigada!

À Jane por todas as explicações e pelo apoio principalmente nas últimas semanas antes do depósito, muito obrigada de coração.

Àqueles que não trabalham mais no Laboratório Biovet, mas que muito contribuíram – Sheyla Grellet, Luiz Visintin, Antenor e Ana Paula Gonçalves. Vocês foram fundamentais para a realização desse trabalho. Muito obrigada!

À toda equipe do LABMAS, em especial à Sheila, Elizabeth Marconi, Gisele, Sueli, Iracema, Karen e Haila.

Ao professor Paulo Brandão e ao professor Fábio Gregori sempre muito atenciosos e me atenderam diversas vezes que precisei.

À Cíntia Fávero e Alessandra Marnie Castro que se dedicaram até altas horas e nos finais de semana para prepararem o plasmídeo. Também não tenho palavras para agradecer todo o empenho, boa vontade e dedicação que me dispensaram, e por todas as explicações.

À Camila Oliveira, que desde o início da pós-graduação sempre me ajudou, e sobretudo nos momentos antes do depósito foi uma grande amiga e parceira.

À professora Dra. Solange Genari pela pós-graduação no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da FMVZ-USP

Aos professores, funcionários e colegas do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

À secretaria do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da FMVZ-USP pelo apoio durante esse período.

À biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/USP, pelo carinho e a atenção dispensados durante a correção da dissertação.

À secretaria de pós-graduação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo pelo apoio durante esse período.

RESUMO

SILVA, A. R. Análise da cinética de replicação do parvovírus canino em cultivo de células CRFK através da PCR em tempo real. [Evaluation of the replication kinetic of canine parvovirus in CRFK cell culture using real-time PCR] 2011. 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

No presente estudo, foi inicialmente padronizada uma PCR para detecção do DNA viral da semente de Parvovírus Canino utilizado na vacina brasileira Imunovet® (VR-953™), tendo como alvo o gene VP2. O produto de PCR foi submetido ao sequenciamento a fim de caracterizar geneticamente a semente vacinal. A seguir, foi padronizada uma reação de PCR em tempo real (RT-PCR) para detecção de um fragmento de 119 pb do gene VP2, a qual foi empregada para avaliar a cinética de replicação da amostra vacinal do CPV em diferentes métodos e tempos de cultivo celular. A correlação entre os resultados do título infeccioso das amostras virais e o número de cópias obtido na RT-PCR foi avaliado pelo Coeficiente de Correlação de Pearson. A PCR padronizada apresentou uma sensibilidade analítica de 457 DICC₅₀/mL. O sequenciamento do produto de PCR revelou que a amostra vacinal é do tipo CPV-2. A RT-PCR padronizada apresentou uma sensibilidade analítica de 1030 cópias de DNA/mL e uma boa especificidade analítica, pois não detectou o DNA de Adenovírus canino tipos 1 e 2 e Herpesvírus Equino tipo 1. A RT-PCR exibiu Coeficientes de Variação de triplicatas intra-ensaio de 0,43% e inter-ensaio de 0,29%. O Coeficiente de Correlação de Pearson entre o título infeccioso das amostras virais e o número de cópias obtido na RT-PCR foi de 0,55, considerado moderadamente positivo. Considerando que a região alvo da RT-PCR padronizada apresentou 100% de identidade com 93,52% (159/170) das amostras pesquisadas no GenBank pelo BLAST, a RT-PCR padronizada sugere ter um potencial uso no diagnóstico.

Palavras-chave: Parvovírus canino. PCR. Sequenciamento. PCR- tempo real. Replicação em cultivo celular.

ABSTRACT

SILVA, A. R. Evaluation of the replication kinetic of canine parvovirus in CRFK cell culture using real-time PCR. [Análise da cinética de replicação do parvovírus canino em cultivo de células CRFK através da PCR em tempo real]. 2011. 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

In this study, was originally a standard PCR for detection of viral DNA from the canine parvovirus vaccine seed used in Brazilian Imunovet® (VR-953™), targeting the VP2 gene. The PCR product was subjected to sequencing to genetically characterized the vaccine seed. Then, a reaction was standardized real-time PCR (RT-PCR) to detect a fragment of 119 bp VP2 gene, which was used to evaluate the growth kinetics of the CPV vaccine sample in different methods and cell culture times. The correlation between results of the infectious titre and the number of copies obtained in RT-PCR was evaluated by Pearson's correlation coefficient. The standardized PCR showed an analytical sensitivity of 457 TCID₅₀/mL. The sequencing of the PCR product showed that the vaccine sample is CPV type 2. The standardized RT-PCR showed an analytical sensitivity of 1030 DNA copies/mL and a good analytical specificity, it does not detect the DNA of canine adenovirus type 1 and 2 and equine herpesvirus type 1. The RT-PCR showed coefficients of variation intra-assay triplicates of 0,43% and inter-assay of 0,29%. The Pearson's correlation coefficient between the titre of infectious viral samples and the number of copies obtained in RT-PCR was 0,55, considered moderately positive. Whereas the target region of the standardized RT-PCR showed 100% identity with 93,52% (159/170) of samples surveyed in Genbank by BLAST, the standard RT-PCR suggests a potential diagnostic use.

Keywords: Canine Parvovirus. PCR. DNA sequencing. Real-time PCR. Replication in cell culture.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Desenho esquemático mostrando a posição dos <i>primers</i> CPV-Pa e CPV-Pb no gene VP2 da proteína do capsídeo viral do CPV-2.....	48
Figura 2-	Mapa do vetor pTZ57R/T (InsTAclone, Fermentas) de 2886pb utilizado no processo de clonagem, com seus sítios de clivagem das enzimas de restrição	57
Figura 3-	Descrição da sequência de 757pb de nucleotídeos do gene VP2 da proteína do capsídeo do CPV-2 acrescida dos seus respectivos sítios de clivagem de enzimas. Observa-se que as enzimas <i>Bam</i> HI e <i>Eco</i> RI não clivam nenhum segmento.	58
Figura 4-	Desenho esquemático representando as diferentes condições de cultivo analisadas neste estudo. A figura representa desde a inoculação das células CRFK na garrafa <i>Roux</i> , a tripsinização das células e os repiques nas garrafas <i>Roller</i> , e os dois métodos utilizados, sendo o método A – inoculação das células e da semente vacinal simultânea e método B – formação da monocamada de células durante 72h e posterior inoculação da semente vacinal nas garrafas <i>Roller</i> . Nos dois métodos havia quantidades distintas de células. As coletas foram realizadas às 48h, 72h, 96h e 120h após a inoculação da semente VR-953™.	63
Figura 5-	Foto das placas durante o cálculo do título infeccioso. À esquerda mostrando as células antes da adição das hemácias. À direita a placa após a adição das hemácias de suíno a 0,3%.	65
Figura 6-	PCR das suspensões vacinais (SV) coletadas em diferentes momentos de produção da vacina. Amostras 1, 2, 3 e 4 – $1,5 \times 10^9$ células, inoculação simultânea de células e SV, 48, 72, 96 e 120h depois, respectivamente. Amostras 5, 6, 7 e 8 – 3×10^9 células, formação da monocamada e posterior infecção, 48, 72, 96 e 120h depois. Amostras 9, 10, 11 e 12 – $4,5 \times 10^9$ células, formação da monocamada e infecção viral, 48, 72, 96 e 120h depois. Amostras 13, 14 e 15 – 3×10^9 células, inoculação simultânea de células e vírus, 72, 96 e 120h depois. Amostra 15 – vacina Recombitek®. Amostra 16 – controle negativo (água estéril).....	68
Figura 7-	Sensibilidade analítica da PCR realizada de uma suspensão vacinal com título de $10^{6,66}$ DICT ₅₀ /mL. A figura mostra o perfil das bandas no gel de agarose, visíveis até a diluição 10-4. L: marcador de peso molecular de 100 a 1000pb; CP: controle positivo; P: amostra pura; CN: controle negativo.....	69

Figura -	Eletroferograma gerado em uma das reações de seqüenciamento do <i>primer</i> anti-senso CPV-Pb. A qualidade foi avaliada usando o programa Phred-Phrap. Verificou-se a presença de picos homogêneos e ausência de picos sobrepostos, os quais ocorreram apenas no início e final da reação, os quais foram desconsiderados, gerando assim o fragmento de 757pb.....	70
Figura 09-	PCR realizada antes da digestão e linearização do plasmídeo com as enzimas de restrição <i>Bam</i> HI e <i>Eco</i> RI. L: marcador de peso molecular de 100pb. C1 e C2: inserto mais plasmídeo.	72
Figura 10-	Curva de monitoramento da fluorescência (ΔRn) em função do número de ciclos que ilustram a detecção do gene VP2 do capsídeo do CPV-2 e das cinco amostras de suspensão vacinal dispostas em triplicatas. Limiar (<i>Threshold</i>) arbitrariamente estabelecido de 0,08574 na fase exponencial da curva. Precisão intra-ensaio com coeficiente de variação (CV) = 0,43%.....	74
Figura 11-	Avaliação da sensibilidade analítica para a detecção do gene VP2 da proteína do capsídeo do CPV-2. Curvas de monitoramento da fluorescência (ΔRn) em função do número de ciclos que ilustram a amplificação em tempo real de moléculas de DNA do CPV-2 presentes nas amostras testadas. Nove alíquotas de concentrações conhecidas em diluições na escala 1:10 a partir do produto amplificado de referência. Em destaque (setas), amplificações de suspensões vacinais. <i>Threshold</i> arbitrariamente estabelecido de 0,343268 na fase exponencial da curva.	76
Figura 12-	Avaliação da sensibilidade analítica da técnica de PCR em tempo real. Curva padrão de regressão linear referente à detecção do gene VP2 da proteína do capsídeo do CPV-2. Nove alíquotas em diluições seriadas na escala 1:10 de concentrações conhecidas em ng do produto amplificado (abscissa) e o Ciclo de <i>Threshold</i> de cada amostra (ordenada). Amostras de suspensão vacinal apresentaram 87,93ng (seta verde) e 19,43ng (seta preta).	77
Figura 13-	Curvas de monitoramento da fluorescência (ΔRn) em função do número de ciclos que ilustram a amplificação em tempo real de moléculas de DNA do CPV-2 presentes nas amostras testadas. Em destaque (setas) amplificação referente às diluições 10^{-9} e 10^{-10} . <i>Threshold</i> arbitrariamente estabelecido de 0,343268 na fase exponencial da curva.	78
Figura 14-	Curva padrão de regressão linear referente à detecção do gene VP2. Diluições 10^{-9} e 10^{-10} de concentrações conhecidas em ng da solução de estoque (produto amplificado de referência) (abscissa) e o ciclo de <i>Threshold</i> de cada amostra (ordenada).....	78
Figura 15-	Curvas de monitoramento da fluorescência (ΔRn) em função do número de ciclos ilustrando a amplificação em tempo real de moléculas de DNA do CPV-2 da vacina Imunovet® (seta amarela,	

	$C_T=13,83 \pm 0,09$), da vacina Duramune® (seta preta, $C_T= 9,32 \pm 0,047$), da vacina Nobivac® Puppy (seta vermelha, $C_T=12,04 \pm 0,024$) e da vacina Recombitek® (seta azul, $C_T=12,19 \pm 0,041$). Não houve curva de amplificação do DNA do Adenovírus canino tipo 1 e 2 (seta verde, $C_t=34,845 \pm 0,125$), os quais não foram detectados. <i>Threshold</i> arbitrariamente estabelecido de 0,115562 na fase exponencial da curva.....	79
Figura 16-	Curvas de amplificação do DNA do CPV-2 mostrando o padrão de cada sequência e o aumento do sinal fluorescente versus o número de ciclos durante um ensaio de PCR em tempo real. Os valores de C_T foram calculados automaticamente, determinando-se o ponto no qual a fluorescência excedeu o valor fixado de <i>Threshold</i>.....	80
Figura 17-	Curva padrão para o DNA de CPV-2, mostrando o valor de C_T versus o número de cópias/μL de DNA. Para a curva padrão foi utilizado um produto amplificado de referência com 100ng/μL. Os valores de carga viral das suspensões vacinais com valor desconhecido foram determinados pelo <i>software</i> detector de sequências StepOne, interpolando-os na curva padrão.	81
Figura 18-	Representação gráfica da cinética de replicação da semente vacinal nos diferentes momentos de coleta, comparando o método A de inoculação simultânea das células CRFK e da semente vacinal, com o método B onde a monocamada previamente formada foi infectada com a semente vacinal (não simultânea). Gráfico 1: $1,5 \times 10^9$ células/Roller. Gráfico 2: $3,0 \times 10^9$ células/Roller. Gráfico 3: $4,5 \times 10^9$ células/Roller..	84
Figura 19-	Foto mostrando a leitura da titulação após a adição de hemácias à 0,3% em cada orifício. As setas mostram orifícios onde não há formação clara nem da hemaglutinação, nem do “botão” de hemácias, claramente formado nos orifícios utilizados como controle de células (colunas 1 e 2 da esquerda).....	92
Figura 20 –	Foto ilustrando o efeito biológico “ideal” esperado quando se analisa a presença de um vírus capaz de aglutinar hemácias em cultivo celular. Os orifícios superiores mostram a ausência do vírus e a formação do “botão” de hemácias no fundo da placa. Os orifícios inferiores mostram a ligação das hemaglutininas virais à superfície das hemácias.	92

LISTA DE QUADROS

Quadro 1-	Principais Parvovírus de importância veterinária e a manifestação clínica (Fonte: Murphy, 1999).....	25
Quadro 2-	Amostras de CPV-2 provenientes de São Paulo/Brasil usadas no alinhamento e desenho dos <i>primers</i> para PCR da semente vacinal VR-953™	47
Quadro 3-	Sequências, tamanho e posição dos <i>primers</i> e sonda encomendados neste estudo e tamanho do fragmento gerado na PCR em tempo real.....	48
Quadro 4-	Reagentes, concentração final de cada um e volume em µL para uma reação de PCR estabelecida neste estudo.	50
Quadro 5-	Sequências, tamanho e posição dos <i>primers</i> e sonda encomendados neste estudo e tamanho do fragmento gerado na PCR em tempo real.....	54
Quadro 6-	Reagentes, concentração final de cada um e volume em µL para uma reação de PCR em tempo real.....	55
Quadro 7-	Agentes utilizados para a validação da especificidade analítica do ensaio de PCR em tempo real para o CPV-2.....	61
Quadro 8-	Números de acesso das amostras de CPV-2 que apresentaram ou não um SNP quando alinhadas com o fragmento de 119 pb da PCR em tempo real.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Valores do “ciclo de limiar” (<i>Threshold cycle</i> - C_T) de cinco suspensões vacinais (SV) VR-953 ^{TM} dispostas em triplicatas. <i>Threshold</i> arbitrariamente estabelecido de 0,08574 na fase exponencial da curva. Precisão intra-ensaio com coeficiente de variação (CV%) = 0,43% 74
Tabela 2-	Valores de C_T de cinco diferentes ensaios da suspensão vacinal (SV) VR-953 ^{TM} disposta em triplicatas, referente à detecção do gene do capsídeo da proteína VP2 do CPV-2. <i>Threshold</i> arbitrariamente estabelecido de 0,187728 na fase exponencial da curva. Precisão inter-ensaio com coeficiente de variação (CV%) = 0,29%..... 75
Tabela 3-	Avaliação da sensibilidade analítica da técnica de PCR em tempo real para a detecção do gene VP2. Número de cópias de CPV-2 presente na amostra testada calculado a partir da concentração (em ng) do produto amplificado de referência..... 76
Tabela 4-	Número de células CRFK em cada garrafa <i>Roller</i> , tempos de coleta em horas, cálculo do título infeccioso (DICT ₅₀ /mL) expresso em Log ₁₀ das suspensões vacinais coletadas após a inoculação simultânea da VR-953 ^{TM} e das células CRFK nas garrafas <i>Roller</i> , número de cópias de DNA/mL expresso em Log ₁₀ e o coeficiente de variação (CV%) das triplicatas 82
Tabela 5-	Número de células CRFK em cada garrafa <i>Roller</i> , tempos de coleta em horas, cálculo do título infeccioso (DICT ₅₀ /mL) expresso em Log ₁₀ das suspensões vacinais coletadas após a infecção da monocamada de células pré-estabelecida com a VR-953 ^{TM} , número de cópias de DNA/mL expresso em log ₁₀ e o coeficiente de variação (CV%) das triplicatas..... 83
Tabela 6-	Média e desvio-padrão ao se comparar o número de cópias e ao comparar o título infeccioso entre os métodos de cultivo A e B analisados no teste comparativo de Mann-Whitney..... 85

LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

A72	células de fibroma canino
Asn	asparagina
Asp	aspartato
ATCC	American Type Culture Collection
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BR	Brasil
°C	graus Celsius
CAV	Adenovírus canino
Cm	centímetros
CO ₂	gás carbônico
CPV	Parvovírus canino
CRFK	células de rim felino de Crandell
C _T	ciclo de <i>Threshold</i>
CV	coeficiente de variação
Da	daltons
DICT ₅₀	dose infectante em 50% da cultura de tecidos
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTPs	deoxinucleotídeos
DPEC	dietil pirocarbonato
ECP	efeito citopático
EDTA	ácido etileno-diamino-tetracético
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
et al	e colaboradores
FAM	6-carboxi-fluoresceína

Fg	fentograma
FPV	vírus da Panleucopenia Felina
FRET	<i>Försten Resonance Energy Transfer</i>
g/cm ³	gramas por centímetro cúbico
<i>g</i>	giros
Glu-426	glutamato 426
HÁ	hemaglutinação
HI	inibição da hemaglutinação
IC	imunocromatografia
ICTV	International committee on taxonomy of viruses
Ig	imunoglobulina
IPTG	isopropil 1 β-galactoside
IV	isolamento viral
KDa	quilodaltons
Kg	quilogramas
LB	triptona-extrato de levedura-cloreto de sódio
ME	microscopia eletrônica
MEV	vírus da enterite dos visons
MgCl ₂	cloreto de magnésio
MGB	<i>Minor Groove Binder</i>
MVC	vírus diminuto dos canídeos
μg	micrograma
μL	microlitro
Mg	miligramas
mL	mililitros
mM	milimolar
NCBI	<i>National Centre for Biotechnology Information</i>

NFQ	<i>Quencher</i> não fluorescente
ng	nanograma
nm	nanômetros
NS	proteína não-estrutural
nt	nucleotídeos
ORFs	<i>open reading frames</i>
pb	pares de base
PCR	reação em cadeia pela polimerase
PBS	<i>phosphate buffer saline</i>
%	por cento
qPCR	PCR em tempo real quantitativa
q.s.p	quantidade suficiente para
R ²	coeficiente de correlação
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
Rn	referência passiva
RNA	ácido ribonucléico
rpm	rotações por minutos
SNP	<i>single-nucleotide polymorphism</i>
TAMRA	6-carboxi-tetrametil-rodamina
TBE	Tris-borato EDTA
USP	Universidade de São Paulo
VP	proteína estrutural do capsídeo viral
x-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolyl-β-D-galactoside

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	23
1.1 HISTÓRICO	23
1.2 CLASSIFICAÇÃO E CARACTERÍSTICAS DO PARVOVÍRUS CANINO	24
1.3 EPIDEMIOLOGIA.....	27
1.4 REPLICAÇÃO E ORGANIZAÇÃO GENÔMICA.....	28
1.5 IMUNIDADE	31
1.6 VARIANTES ANTIGÊNICAS DO CPV-2.....	32
1.7 PROFILAXIA E CONTROLE.....	33
1.8 DIAGNÓSTICO	36
2 OBJETIVOS	43
3 MATERIAIS E MÉTODOS	45
3.1 AMOSTRA VACINAL DE PARVOVÍRUS CANINO	45
3.2 PADRONIZAÇÃO E APLICAÇÃO DA PCR PARA A DETECÇÃO DO GENE VP2.....	45
3.2.1 Desenho dos Primers para a PCR e Sequenciamento Parcial do Gene VP2	45
3.2.2 Extração de DNA das Suspensões Vacinais.....	48
3.2.3 Preparo do Mix de PCR.....	49
3.2.4 Eletroforese do Produto Amplificado.....	50
3.2.5 Sensibilidade Analítica da PCR.....	51
3.3 SEQUENCIAMENTO DA SEMENTE VACINAL	51
3.3.1 Purificação e Quantificação do Produto Amplificado	52
3.3.2 Reação de Sequenciamento	52
3.3.3 Precipitação do Produto Amplificado.....	52
3.3.4 Sequenciamento.....	53
3.3.5 Alinhamento, Tradução e Edição Final	53
3.4 PADRONIZAÇÃO DA PCR EM TEMPO REAL	53
3.4.1 Desenho de <i>Primers</i> e Sondas para a PCR em Tempo Real	54
3.4.2 Aplicação da PCR em Tempo Real	55
3.5 QUANTIFICAÇÃO ABSOLUTA DA CARGA VIRAL.....	56
3.5.1 Clonagem.....	56
3.6 CONSTRUÇÃO DA CURVA PADRÃO PARA QUANTIFICAÇÃO	59
3.7 VALIDAÇÃO DA PCR EM TEMPO REAL	59

3.7.1	Precisão Intra e Inter-ensaio	59
3.7.2	Sensibilidade Analítica da PCR em Tempo Real	60
3.7.3	Especificidade Analítica da PCR em Tempo Real	60
3.8	REPLICAÇÃO DO CPV-2 EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO	61
3.9	ANÁLISE DA CINÉTICA DE REPLICAÇÃO DO CPV-2	64
3.9.1	Através da PCR em Tempo Real	64
3.9.2	Através do Cálculo do Título Infeccioso	64
3.10	Correlação entre o Cálculo do Título Infeccioso e a PCR em Tempo Real	66
4	RESULTADOS	68
4.1	PADRONIZAÇÃO, APLICAÇÃO E SENSIBILIDADE ANALÍTICA DA PCR	68
4.2	REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO	69
4.3	PADRONIZAÇÃO E APLICAÇÃO DA PCR EM TEMPO REAL	70
4.4	CONSTRUÇÃO DA CURVA PADRÃO PARA QUANTIFICAÇÃO DO DNA	72
4.5	VALIDAÇÃO DA PCR EM TEMPO REAL	73
4.5.1	Precisão Intra e Inter-ensaio	73
4.5.2	Sensibilidade Analítica da PCR em Tempo Real	75
4.5.3	Especificidade Analítica da PCR em Tempo Real	79
4.6	ANÁLISE DA CINÉTICA DE REPLICAÇÃO DO CPV-2 EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO ATRAVÉS DA PCR EM TEMPO REAL	80
4.7	CORRELAÇÃO ENTRE O CÁLCULO DO TÍTULO INFECCIOSO E O NÚMERO DE CÓPIAS DE DNA POR PCR EM TEMPO REAL	82
5	DISCUSSÃO	87
5.1	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA VACINAL	87
5.2	PCR EM TEMPO REAL	88
5.3	CÁLCULO DO TÍTULO INFECCIOSO DAS SUSPENSÕES VACINAIS	90
5.4	ANÁLISE DA CINÉTICA DE REPLICAÇÃO DE SEMENTE VACINAL PELA PCR EM TEMPO REAL E PELO CÁLCULO DO TÍTULO INFECCIOSO	93
6	CONCLUSÕES	96
	REFERÊNCIAS	98

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

O conhecimento da prevalência e distribuição de infecções virais em animais de companhia possui grande utilidade para indicar a necessidade de vacinação e direcionar medidas de controle (MURPHY et al., 1999). Entretanto, alguns fatores como a persistência dos vírus no ambiente e em animais portadores, o aparecimento de novas cepas e o desenvolvimento de infecção e doença mesmo em animais vacinados tem contribuído para manutenção do caráter enzoótico de algumas viroses (BOHM et al., 2004).

O CPV pertence à família *Parvoviridae*, gênero *parvovirus*, e foi descrito pela primeira vez em 1978. O CPV é semelhante ao vírus da panleucopenia felina, sendo considerado o mais importante agente etiológico de gastroenterite em cães (APPEL; PARRISH, 1987). A parvovirose canina é uma das principais enfermidades virais de cães, principalmente pela sua ampla distribuição e grande morbidade e mortalidade (TRUYEN, 2000).

A distribuição mundial da parvovirose canina deve-se em parte ao grande período de excreção viral nas fezes e à grande resistência do vírus no ambiente (BOHM et al., 2004). Desde os primeiros relatos da ocorrência da doença no Brasil (ANGELO et al., 1980; HAGIWARA et al., 1980), o CPV vem se mantendo endêmico na população canina.

1.1 Histórico

Os primeiros relatos de enfermidades causadas por parvovírus em animais datam de mais de 100 anos e se referiam à panleucopenia felina (MORAES; COSTA, 2007). A primeira referência sobre possíveis infecções por parvovírus em cães foi relatada na Alemanha em 1970, quando foram isoladas amostras de um vírus de pequenas dimensões nas fezes de cães assintomáticos, denominado vírus diminuto dos canídeos (MVC) (BINN et al., 1970), também chamado de CPV-1 e antigenicamente distinto dos parvovírus conhecidos, incluindo o vírus da panleucopenia felina (FPV) e o parvovírus canino tipo 2 (APPEL; PARRISH, 1987).

A relação entre o CPV-2 e o FPV foi logo reconhecida e segundo alguns autores (TRUYEN, 2000). Existem evidências biológicas (como a replicação em células de origem felina), sorológicas e filogenéticas de que o CPV-2 realmente deriva do FPV. A diferença entre o vírus felino e canino parece estar restrita à substituição de dois aminoácidos em uma proteína do capsídeo, responsável pela interação dos vírions com os receptores das células hospedeiras (MORAES; COSTA, 2007).

No Brasil, casos esporádicos de infecções pelo CPV-2 foram observados inicialmente em 1979 na região sudeste do país. A partir de 1980, houve a disseminação da doença entre a população canina. Os estudos clínicos e anatomopatológicos bem como a observação nas fezes de pequenas partículas virais semelhantes aos parvovírus permitiram concluir que se tratava de uma epizootia de enterite infecciosa, provavelmente causada pelo parvovírus canino (HAGIWARA et al., 1980).

Foram realizadas diversas tentativas de diagnóstico etiológico, utilizando-se as provas de hemaglutinação, isolamento viral em culturas celulares e microscopia eletrônica da suspensão fecal e de células infectadas, cujos resultados preliminares foram apresentados ainda em 1980 por Ângelo et al. (1980).

1.2 Classificação e características do vírus

Segundo o Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV), a família Parvoviridae é composta por duas sub-famílias: *Parvovirinae* (vírus de vertebrados) e *Densovirinae* (vírus de insetos). A sub-família *Parvovirinae* compreende cinco gêneros: *Parvovirus* (associados com doenças em animais como o FPV, o CPV e o parvovírus suíno), *Erythrovirus* (representado pelo parvovírus humano B19 causador de abortos e doença exantematosa em crianças), *Dependovirus* (dependentes de adenovírus para replicar-se, são apatogênicos e têm sido usados como vetores de expressão), *Amdovirus* e *Bocavirus* (de ocorrência esporádica e compreende o MVC ou CPV-1) (Quadro 1) (MORAES; COSTA, 2007).

Vírus	Doença
Panleucopenia Felina	Doença neonatal generalizada, hipoplasia cerebelar, enterite e panleucopenia
Parvovírus Canino tipo 1	Diarréia leve
Parvovírus Canino tipo 2 (2a e 2b)	Doença neonatal generalizada, enterite, miocardite e leucopenia
Parvovírus Suíno	Aborto, natimortos, mumificação e infertilidade
Enterite dos Vison	Panleucopenia e enterite
Doença Aleutiana dos Vison	Doença crônica do complexo imune e encefalopatia
Minute vírus de Camundongos	Má formação fetal
Vírus de Ratos	Má formação fetal
Vírus H1 de Ratos	Má formação fetal
Parvovírus de Patos	Hepatite e miocardite
Parvovírus de Gansos	Hepatite e miocardite

Fonte: Murphy et al. (1999)

Quadro 1- Principais Parvovírus de importância veterinária e a manifestação clínica.

As partículas do CPV-2 quando visualizadas pela microscopia eletrônica (ME) são esféricas, não-envelopadas, com diâmetro variando de 18 a 26 nm e capsídeo de simetria icosaédrica, contendo duas proteínas virais designadas VP1 e VP2 formadas por junções alternativas do mesmo RNA (REED et al., 1988). O peso molecular da partícula viral completa é de 5.5 a 6.2×10^6 daltons e a densidade do vírion em gradiente de cloreto de cério é de 1.39 a 1.42 g/cm^3 (MORAES; COSTA, 2007).

O genoma viral consiste de um único filamento de DNA linear de aproximadamente 5.150 nucleotídeos (nt), contendo na extremidade 3'e 5' sequências palindrômicas de aproximadamente 150 nt (REED et al., 1988).

O capsídeo é constituído de 5 a 6 cópias da proteína VP1 (84kDa) e 54 a 55 cópias da proteína VP2 (67kDa). A VP1 difere da VP2 pela adição de 154 a 227 aminoácidos na região amino-terminal. Nas partículas infecciosas, a clivagem de 15 a 20 aminoácidos na região amino-terminal da VP2 gera a proteína VP3 de 63 kDa (TSAO et al., 1991). Esta clivagem parece ser essencial para a infectividade do vírus porque expõe sequências ricas em glicina, importantes na interação com a membrana celular (WU; ROSSMAN, 1993). A proteína VP2, além de ser o sítio de ligação ao receptor, confere ao vírus a propriedade hemaglutinante e

contém os epítomos responsáveis pela indução de anticorpos neutralizantes (LOPEZ de TURIZO et al., 1991).

Na superfície dos vírions podem ser observadas estruturas características, como protuberâncias (*spikes*), depressões (*dimples*) e estruturas na forma de cilindros circundados por depressões (*canyons*). Essas estruturas possuem importantes funções biológicas como o reconhecimento e ligação a receptores celulares (depressões) e determinação das características imunogênicas (projeções) (MORAES; COSTA, 2007).

Os *canyons* são possivelmente, sítios de ligação para receptores celulares e uma vez que estas depressões podem impedir a ligação de anticorpos, o vírus pode manter os domínios desta região mais conservados, ao contrário dos demais que se apresentam expostos na superfície viral e que podem mudar para evitar a resposta imune do hospedeiro. Por outro lado, as espículas e *dimples* estão associadas às propriedades antigênicas, seleção de hospedeiros e de aglutinação (TSAO et al., 1991).

O genoma do parvovírus possui apenas duas ORFs que codificam quatro proteínas, duas estruturais (VP1 e VP2/VP3) e duas não estruturais (NS1 e NS2). As proteínas não-estruturais (NS1 e NS2) são produzidas pela tradução de mRNAs que sofrem junções (*splicing*) alternativas. A NS1 é essencial para a replicação do genoma viral e a NS2 está associada com a formação dos capsídeos, controle da expressão gênica e também participa da replicação do genoma (MORAES; COSTA, 2007).

As proteínas VP1, VP2 e VP3 fazem parte da estrutura do capsídeo. A diferença entre a VP1 e a VP2 resulta da utilização de diferentes códons de iniciação pelos ribossomos. A VP3 é composta por uma sequência de aminoácidos da região amino-terminal da VP2. O genoma viral apresenta 6 a 10 sequências palindrômicas que possibilitam a formação de estruturas em forma de grampo (*hairpin*) nas regiões terminais, as quais são essenciais para a replicação do genoma viral e para a encapsidação do genoma na progênie viral (MORAES; COSTA, 2007).

Como consequência de sua estrutura simples, o CPV-2 é extremamente resistente à inativação, sendo estável a variações de pH (3.0 a 9.0), resistente a solventes lipídicos, tripsina e muitos desinfetantes, pode sobreviver à temperatura de 56°C por 60 minutos, 15 minutos à 80°C, uma hora à 60°C, duas semanas à 37°C, três meses à 20°C, até seis meses à 4°C e podem sobreviver anos em fezes no ambiente. O CPV-2 é sensível à formalina (0.2%), hipoclorito de sódio (1:30) e radiação ultravioleta (SIEGL, 1984).

1.3 Epidemiologia

O parvovírus canino apresenta distribuição mundial e é considerado o agente etiológico mais importante das afecções digestivas em filhotes de cães com até seis meses de idade, sendo responsável por altas taxas de morbidade em populações caninas em todo o mundo (POLLOCK; PARRISH, 1985). No Brasil, Mehnert et al. (1996) ao pesquisarem vírus associados a casos de diarreia em cães observaram que o parvovírus foi o mais freqüente.

O vírus é transmitido pela eliminação fecal e a porta de entrada é a via oral. Porém, a infecção experimental pode ser produzida por várias vias, incluindo oral, nasal ou oro-nasal. O alto título de vírus liberado nas fezes de cães infectados é provavelmente a principal fonte de infecção. Entre 4 e 7 dias após a infecção oral, os títulos virais chegam a 10^9 partículas infecciosas por grama de fezes (POLLOCK, 1982). Cães sobreviventes normalmente criam uma forte resposta imune que impede a liberação viral por mais de 14 dias pós-infecção (CARMICHAEL; JOUBERT; POLLOCK, 1981; POLLOCK, 1982).

Os filhotes entre seis semanas e seis meses de vida são os mais suscetíveis e a forma clínica predominante da parvovirose canina é a gastroenterite (hemorrágica ou não). Os primeiros sinais clínicos geralmente observados entre o 4º e o 5º dias pós-infecção são inespecíficos e incluem anorexia, depressão, letargia e hipertermia. O vômito e a diarreia ocorrem de 24 a 48 horas após os sinais clínicos e levam à desidratação grave. A leucopenia transitória é o achado hematológico mais comumente associado à infecção pelo parvovírus canino (MACARTNEY et al., 1984).

A infecção natural produz uma rápida resposta imune. A neutralização e inibição da hemaglutinação parecem induzir diferentes determinantes antigênicos. Os anticorpos neutralizantes podem ser detectados 3 a 5 dias após o início da infecção e podem alcançar altos títulos antes da recuperação clínica. A presença de um título alto de anticorpos está relacionada com a proteção e parece que a imunidade resultante da infecção natural dura toda a vida do animal. Em gatos e cães, a transferência de anticorpos maternos acontece via placenta, porém a maior parte ocorre via colostro. Através da infecção ou vacinação, gera-se uma resposta mediada por células T citotóxicas (FENNER et al., 1992).

A infecção subclínica atua de forma significativa na epidemiologia da doença, visto que animais assintomáticos eliminam o vírus principalmente em canis, exposições zootécnicas, clínicas veterinárias e outros locais de grandes concentrações de animais, possibilitando a infecção de cães suscetíveis (POLLOCK; CAMICHAEL, 1990).

1.4 Replicação e organização genômica

Os membros do gênero Parvovirus replicam-se no núcleo das células em divisão e necessitam de algumas funções celulares que ocorrem apenas no final da fase S e início da fase G2 da mitose (Murphy et al., 1999). Assim sendo, o vírus apresenta tropismo por tecidos de animais jovens ou recém-nascidos, ou tecidos de animais adultos com intensa proliferação, como é o caso das células do tecido linfóide causando diminuição de linfócitos circulantes e do epitélio do intestino delgado e a gastroenterite (TSAO et al., 1991).

Segundo Fox & Bloom (1999), no início da infecção, a ligação do vírus é normalmente dependente de receptores específicos na superfície celular, e a presença desses receptores pode ser um fator importante na determinação do tropismo tecidual e dos hospedeiros alvos. Uma grande variedade de moléculas tem sido identificada como receptores virais tais como carboidratos e proteínas de membrana. Definir as alterações químicas que ocorrem entre o vírus e o seu receptor permite realizar tratamentos químicos que possam alterar essa interação e prevenir a infecção.

Estudos de infecção pelo parvovirus canino em cultura de células de origem canina mostraram que o vírus se liga a um receptor específico na superfície basolateral de células epiteliais cultivadas em monocamada. Após a ligação ao receptor, o vírus pode ser observado no interior de vesículas endocíticas (BASAK & COMPANS, 1989).

O primeiro estágio de infecção viral e sua subsequente replicação envolvem a entrada na célula hospedeira. Em geral, os passos envolvem a adsorção e penetração, desnudamento do genoma viral e síntese de proteínas precoces, seguido da síntese de proteínas tardias ou componentes requeridos na montagem e liberação do vírion infeccioso (ACTOR, 2007).

Para os vírus não envelopados, as células hospedeiras são destruídas com conseqüente liberação de vírions infecciosos. As inclusões visíveis ao microscópio óptico e que servem como diagnóstico, resultam do acúmulo de vírions nos sítios de montagem (ACTOR, 2007).

A replicação do genoma do CPV-2 ocorre no núcleo da célula infectada, onde as sequências palindrômicas terminais dobram sobre si mesmas, formando estruturas semelhantes a grampos (*hairpins*) que atuam como iniciadores para a DNA polimerase celular. Nessas regiões de DNA de fita dupla, tem início a replicação com a formação de uma fita complementar. A replicação continua com a formação de intermediários de dupla fita que, posteriormente, são enzimaticamente clivados gerando DNA de fita simples. A fita infecciosa, negativa por convenção, dá origem a duas fitas positivas e duas fitas negativas (YOUNG, 1988).

A síntese das proteínas estruturais ocorre no citoplasma da célula, porém a montagem de novas partículas virais acontece no núcleo e a liberação por lise celular. A replicação viral em cultura de células pode ser observada pela presença de corpúsculos de inclusão intranucleares (MURPHY et al., 1999).

Existem cerca de 3200 linhagens celulares caracterizadas atualmente, derivadas de mais de 75 espécies, entre elas hibridomas e plantas. Vários bancos de células nacionais e internacionais estão disponíveis, incluindo a American Type Culture Collection (ATCC) nos Estados Unidos e European Collection of Animal Cell Cultures no Reino Unido (FRESHNEY, 1983).

O crescimento das células em cultura pode ser dividido em 3 estágios. O primeiro estágio também chamado de fase *lag*, ocorre imediatamente após a inoculação. A segunda fase é chamada exponencial ou de crescimento, durante a qual o número de células aumenta rapidamente. A terceira fase é chamada *plateau* ou fase estacionária, durante a qual o número de células permanece constante (ASHIHARA; BASERGA, 1979).

A contagem celular é realizada com o objetivo de semear culturas com um número conhecido de células viáveis, para se determinar o nível de propagação e a viabilidade da cultura. As células são geralmente contadas na presença de um corante vital que é apenas incorporado dentro da célula sem prolongar sua viabilidade. Alguns corantes como o azul de tripan, o qual cora apenas células mortas, pode ser usado para determinar a viabilidade celular (GEORGE et al., 1996).

Alguns tipos de células e de vírus se adaptam melhor quando cultivados em garrafas em movimento giratório constante chamadas “*roller*”, para remover toxinas da superfície das células e para reposição de nutrientes críticos. Provavelmente, a mais importante atribuição do vírus esteja na habilidade de infectar e replicar dentro da célula. O ciclo de replicação viral é acompanhado por inúmeras mudanças bioquímicas e morfológicas dentro da célula, as quais geralmente culminam na morte celular. Essas mudanças morfológicas referem-se ao efeito citopático (ECP) e podem se apresentar de diversas formas como arredondamento, fusão de células (formação de sincícios) ou lise total das células. Alguns vírus não matam as células ou causam ECP, ao invés disso, eles transformam internamente as células que apresentam rápido crescimento e tornam-se capazes em muitos casos de causar tumores em animais (GEORGE, 1996).

Na maioria dos experimentos em virologia, é essencial saber a concentração de partículas totais ou infecciosas presentes em uma dada suspensão viral. O título viral é determinado através de diluições seriadas da suspensão viral, sendo o diluente normalmente a

mesma cultura de tecidos ou meio de crescimento. As diluições seriadas são realizadas usando os fatores 2, 5 ou 10 (mais usado). Testes de infectividade permitem o cálculo do título viral (o número de unidades infecciosas por unidade de volume). Unidades infectantes são geralmente consideradas como a menor quantidade de vírus capaz de produzir um efeito biológico detectável (HIERHOLZER; KILLINGTON, 1996).

Na incubação, os vírus replicados são liberados no sobrenadante e infectam células saudáveis da monocamada. O ECP desenvolve-se em alguns dias dependendo do tipo de vírus e de célula, ao mesmo tempo em que o aspecto da monocamada é avaliado através do microscópio óptico. Os dados são usados para calcular a $DICT_{50}$, ou seja, a diluição do vírus necessária para infectar 50% das células em cultivo. O teste baseia-se na presença e detecção de partículas virais citocidas, isto é, capazes de causar ECP por um dos dois caminhos: método de Reed-Muench e Spearman-Kärber. O cálculo não diz como muitas unidades infectantes estão presentes na suspensão viral original, mas qual a diluição do vírus causou ECP em 50% das células inoculadas (HIERHOLZER; KILLINGTON, 1996).

O CPV-2 replica-se em um amplo número de culturas celulares primárias e células de linhagem de origem canina, felina, bovina, de visons e guaxinins. Células primárias de rim canino, células de rim felino de Crandell (CRFK) e células A72 derivadas de fibroma canino (BINN, MARCHWICKI; STEPHERSON, 1980) são as mais usadas para a propagação do CPV-2.

Em um estudo realizado por Ângelo et al. (1980), foi nas culturas celulares de fibroblasto humano que se evidenciou de maneira nítida, o efeito citopático do parvovírus canino. Durante o período de observação de 21 dias foi possível verificar, mesmo sem coloração, algumas alterações que ocorreram na camada celular, caracterizadas por um arredondamento celular, agrupamento de poucas células e destacamento das mesmas da camada monocelular. Nesse mesmo trabalho, os melhores resultados foram obtidos quando se passou a utilizar culturas celulares recém-repicadas.

O insucesso no isolamento viral a partir de amostras com baixo título viral ocorre principalmente em razão de o CPV replicar somente em células mitoticamente ativas, ou seja, logo após o repique celular. Conseqüentemente, após a formação do tapete celular, é possível que não se obtenha mais um número suficientemente grande de células em replicação para suportar a replicação viral, possibilitando a perda do inóculo por diluição (STROTTMANN et al.; 2008).

1.5 Imunidade

Os primeiros anticorpos a serem produzidos em uma resposta imune humoral são sempre do tipo IgM, encontrados principalmente no sangue e possuem estrutura pentamérica. IgM é especializado em ativar o complemento eficientemente após a ligação ao antígeno. Os anticorpos de outras classes – IgG, IgA e IgE – são menores e se difundem facilmente do sangue para os tecidos. A IgG é a principal classe no sangue e líquido extracelular, onde pode neutralizar toxinas, vírus e bactérias, opsonizá-los para fagocitose e ativar o sistema complemento. A IgA é a principal classe nas secreções, sendo uma das mais importantes que reveste os tratos intestinal e respiratório. A IgE está presente em baixos níveis no sangue e líquidos extracelulares, e está ligada aos mastócitos encontrados abaixo da pele e mucosas e ao longo dos vasos sanguíneos, desencadeando as defesas locais (MURPHY et al., 1999).

A resposta imune humoral de cães infectados com CPV-2 é rápida, em muitos casos anticorpos circulantes podem ser detectados antes de 5 dias pós-infecção. Cães sem sinais clínicos parecem responder melhor que cães sintomáticos (MEUNIER et al., 1985). Títulos de anticorpos séricos atingem o nível máximo em 7 a 10 dias pós-infecção.

Há uma boa correlação entre os títulos de anticorpos no soro e a resistência à infecção. Logo após a presença de anticorpos no soro, o vírus é primeiro eliminado dos tecidos linfáticos e depois do intestino (Macartney et al., 1984). A liberação de vírus nas fezes cessa aos 10 dias pós-infecção (POLLOCK, 1982).

Um trabalho de Decaro et al. (2005) demonstrou que a replicação do CPV-2b no epitélio intestinal pode ocorrer mesmo na presença de altos títulos de anticorpos maternos (HI acima de 160), demonstrando que as variantes podem ser liberadas nas fezes em títulos muito mais altos que o CPV-2 original, provavelmente como uma consequência da adaptação no hospedeiro canino. Entretanto, o CPV-2a e 2b podem ter adquirido maior habilidade de replicar em filhotes com altos títulos de anticorpos maternos do que aqueles requeridos para prevenir a replicação do CPV-2 original. Dessa forma, os programas de vacinação em filhotes devem ser revisados, considerando que cães com títulos de anticorpos maternos maiores ou iguais a 80 convencionalmente considerados protegidos são suscetíveis a infecção pelo CPV-2a ou 2b.

1.6 Variantes antigênicas do CPV-2

Durante a análise das amostras positivas para parvovírus canino em diferentes épocas, tornou-se claro que havia variação genética e antigênica entre as viroses. Até 1978, isolados contendo o parvovírus foram semelhantes em todo o mundo e chamados de CPV-2. Porém, entre 1979 e 1980, uma variante antigênica foi identificada em diversos países através de anticorpos monoclonais e foi chamada de CPV-2a (PARRISH; EVERMANN; CARMICHAEL, 1985). Em 1984, mais uma variante antigênica foi detectada, a qual se diferenciou do CPV-2a em um único epítipo e foi designada CPV-2b. Em cada caso, as variantes apresentaram-se mundialmente distribuídas e isso indicou que o vírus deve ter passado por uma forte pressão de seleção (DESARIO et al., 2005).

Segundo Carmichael (1994), atualmente o CPV-2 original não circula mais na população canina, enquanto os tipos 2a e 2b estão mundialmente distribuídos. Essas variantes são liberadas nas fezes em títulos mais altos que aqueles observados pelo CPV-2 original. De acordo com Buonavoglia et al. (2001), a existência de uma nova variante antigênica deve ser definida pela amplitude de distribuição pelo mundo e pelas mudanças significativas nas propriedades biológicas e antigênicas do vírus.

Segundo Pereira, Durigon (2000), comparações entre sequências de DNA dos tipos antigênicos do CPV-2 mostraram substituições de nucleotídeos no gene das proteínas do capsídeo VP1/VP2. A estrutura molecular do CPV mostrou que muitas dessas diferenças de aminoácidos estão expostas na superfície do capsídeo, revelando a correlação entre esses resíduos com o escape da imunidade, tipo de hospedeiro e propriedades hemaglutinantes desses vírus. Algumas das mudanças de superfície podem também representar uma adaptação adicional do CPV para uma replicação ótima nas fezes dos cães.

Estudos recentes das variantes na Itália revelaram a presença de um CPV-2 mutante com uma substituição de um aminoácido na posição 426 (de Asn para Glu). Esse tipo previamente chamado de Glu-426 mutante foi então chamado de CPV-2c, co-circulando com o CPV-2^a e CPV-2b (Buonavoglia et al., 2001; Decaro et al., 2007). Sinais clínicos produzidos pelo CPV-2c são algumas vezes diferentes daqueles causados pelas variantes CPV-2a e 2b, isto é, diarreia mucóide ao invés de hemorrágica (DECARO et al., 2005^a)

Um estudo de Costa et al. (2005) caracterizou os subtipos circulantes no Rio de Janeiro usando a PCR e nested-PCR, e mostrou que o subtipo prevalente entre 1995 e 2001 foi o CPV-2b, semelhante aos resultados de Pereira et al. (2000) que também detectaram o

CPV-2b no estado de São Paulo. As razões para a diferença na distribuição mundial das variantes do CPV-2 são pouco claras e a coexistência das variantes CPV-2a e 2b nos diversos países mostram que não há uma vantagem evolutiva entre um tipo e outro.

Na América do Sul, o primeiro relato do CPV-2c ocorreu no Uruguai (PERÉZ et al., 2007). No entanto, segundo Calderon et al (2009), embora o CPV-2c tenha sido detectado na Argentina a partir de 2003 e tenha se tornado predominante em 2008, CPV-2a e 2b ainda estão circulando na população canina, enquanto o CPV-2 não foi detectado em amostras de campo. No Brasil, o primeiro relato do CPV-2c foi apresentado por Streck et al. (2009) em cães na cidade de Porto Alegre.

Nos Estados Unidos o CPV-2c está amplamente distribuído. Embora haja evidências mostrando que vacinas baseadas no CPV-2 original protegem contra o CPV-2c, de acordo com Hong et al. (2007), é importante para as companhias farmacêuticas considerarem o uso de novas cepas nas formulações de vacina.

Embora o significado da variabilidade genética entre os subtipos do CPV-2 ainda seja investigado, acredita-se que tenha importância principalmente quando os filhotes com imunidade passiva materna são desafiados com vírus antigenicamente diferente, ou seja, um determinado título de anticorpos é suficientemente alto para proteger contra o desafio com o vírus homólogo, mas não o suficiente para evitar uma infecção por uma cepa heteróloga, podendo causar doença nesses cães (TRUYEN, 2006).

1.7 Profilaxia de controle

O controle bem sucedido de muitas infecções virais tem sido alcançado através da imunização ativa com vacinas vivas. Em um trabalho realizado por Carmichael; Joubert; Pollock, (1981), títulos de anticorpos > 320 persistiram em cadelas vacinadas por mais de um ano, sugerindo uma longa duração da imunidade. Ao contrário dos cães vacinados com a vacina inativada, filhotes vacinados com a vacina viva foram imunes ao desafio 4 dias após a vacinação e não liberaram vírus virulento nas fezes até um ano e meio após a vacinação.

A imunização demonstra ser a melhor profilaxia da infecção pelo CPV-2. Segundo a Farmacopéia Européia (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2010), vacinas para uso veterinário são preparações contendo substâncias antigênicas e são administradas com o propósito de induzir uma resposta imune específica e ativa contra doenças provocadas por

bactérias, fungos, toxinas, vírus e parasitas. As vacinas vivas ou inativadas conferem imunidade ativa que pode ser transferida passivamente via anticorpos maternos. Vacinas podem conter bactérias, toxinas, vírus ou fungos, vivos ou inativados, parasitas ou frações antigênicas ou substâncias produzidas por esses organismos considerados inofensivos conservando toda ou parte de suas propriedades antigênicas, e também podem conter combinações desses constituintes. A adição de adjuvantes pode ser incluída para aumentar as propriedades imunizantes das vacinas.

A atenuação viral envolve a propagação do vírus em novas condições que o tornam menos patogênico que o vírus original (FLINT et al., 2000). Apesar do método ser antigo, pouco se sabe sobre o processo de atenuação. Além disso, há algumas desvantagens nesse método tais como em alguns casos ser impraticável em larga escala e pela possível ocorrência de reversão da virulência, dependendo da natureza da atenuação. Embora novos processos sejam promissores, muitas vacinas contemporâneas ainda são desenvolvidas por esses métodos clássicos (BADGETT et al., 2002).

A vacina considerada mais eficaz é aquela contendo vírus vivo atenuado. Para garantir uma atenuação completa, as cepas vacinais devem crescer em culturas celulares e passar por um grande número de passagens (acima de 100 passagens). No entanto, a infectividade do CPV-2 tende a diminuir com o aumento da atenuação. Como resultado da infectividade reduzida, cepas de CPV-2 de alta passagem são relativamente mais suscetíveis à interferência de anticorpos maternos (HOARE et al., 1997).

Vacinas vivas atenuadas induzem proteção contra a infecção e a doença. Dependendo do nível de atenuação, a replicação do vírus no hospedeiro e a liberação nas fezes podem variar. Viremia e infecção de tecidos linfáticos podem ser detectadas dois dias após a vacinação. Três dias após a infecção, anticorpos no soro já estão presentes e os títulos aumentam rapidamente em níveis protetores. Altos títulos de anticorpos persistem por pelo menos dois anos (CARMICHAEL et al., 1981).

A interferência de anticorpos maternos na imunização ativa contra CPV tem sido parcialmente superada pelo uso de vacinas com altos títulos (BURTONBOY et al., 1991). Outros autores afirmam que a vacinação intranasal é capaz de aumentar a resposta imune em animais que tiveram títulos de anticorpos de 160, sugerindo uma replicação ativa da cepa vacinal na orofaringe e/ou epitélio desses filhotes, independente da presença de anticorpos maternos (MARTELLA et al., 2005).

Devido à substituição do CPV-2 original pelas variantes 2^a, 2b e mais recentemente o 2c, a eficácia da vacina contendo parvovírus canino baseada no CPV-2 original tem sido constantemente analisada (CAVALLI et al, 2008).

Decaro et al. (2006) relataram a ocorrência de parvovirose canina em filhotes de 40 dias provenientes de mães vacinadas com vacinas contendo o CPV-2 original, o que pode indicar uma falha dos anticorpos maternos em proteger contra a Parvovirose. O envolvimento de toda a ninhada em termos de morbidade e mortalidade pode estar relacionado a uma baixa proteção contra as variantes do CPV pelos anticorpos maternos produzidos pelo CPV-2 original, ou ainda uma falha na transferência desses anticorpos da cadela via colostro. De acordo com esses achados, segundo os autores há necessidade de atualizar as vacinas, substituindo o CPV-2 original pelas variantes circulantes.

Em outro estudo realizado no Uruguai, a doença ocorreu em cães com esquema completo de vacinação, e esses resultados questionam diversos conceitos sobre a eficiência dos protocolos tradicionais de vacinas contendo CPV-2 contra o CPV-2c, e reforçam a necessidade de uma vacina específica contendo o CPV-2c (PÉREZ et al., 2007).

Spibey et al. (2008) investigaram a habilidade de uma vacina viva contendo o CPV-2 original em proteger cães contra o desafio com a variante CPV-2c. Foi demonstrado que cães vacinados com uma única dose da vacina em questão tornaram-se protegidos no desafio com o CPV-2c e que esse isolado foi capaz de causar enterite severa em cães não vacinados. A análise dos suabes retais revelou que a vacina também preveniu a liberação do vírus desafio.

Segundo Vieira et al. (2008), embora as vacinas vivas contendo o CPV-2 original protejam filhotes contra o CPV-2c e vacinas vivas contendo CPV-2b protejam filhotes contra infecções pelo CPV-2a e 2b, a rápida evolução desse vírus justificam uma vigilância epidemiológica e uma potencial necessidade de novas vacinas e testes diagnósticos.

Um trabalho realizado na Argentina por Calderon et al. (2009) relatou que o CPV-2 mostrou um alto grau de substituição dos nucleotídeos durante a replicação, semelhante ao que ocorre com os RNA vírus. Esse alto grau de mutação, juntamente com uma eventual pressão de seleção que pode ser gerada por níveis sub-ótimos de anticorpos devido à vacinação incompleta ou inadequada dos cães, podem contribuir com o surgimento de novas variantes antigênicas.

Por outro lado, num trabalho realizado por Decaro et al. (2007), fez-se de cães com parvovirose ocorrendo entre 1 e 7 dias após a vacinação contra CPV foram analisadas por sondas MGB para determinar em qual dos cães a doença esteve associada com o vírus virulento ou vacinal. A maioria dos cães tornou-se infectada antes ou depois da vacinação,

entretanto, a diarreia pode ser conseqüente a outras viroses ou infecções bacterianas, parasitárias ou ainda falhas de manejo. Dessa forma, muitos veterinários e proprietários de cães erroneamente acreditam que a doença entérica subseqüente à administração da vacina contra CPV é resultado da reversão da virulência do vírus vacinal.

1.8 Diagnóstico

Por causa da severidade do CPV-2, muitos testes têm sido desenvolvidos para detectar o vírus nas fezes de cães infectados. O diagnóstico clínico da infecção pelo CPV-2 é difícil, uma vez que muitos outros patógenos podem causar diarreia em cães. Dessa forma, o diagnóstico clínico deve ser confirmado por exames laboratoriais (MOCHIZUKI et al., 1993).

Hematologia, embora inespecífica, é freqüentemente usada para o diagnóstico de enterite por CPV-2. A severidade da leucopenia normalmente está relacionada à severidade da doença (JACOBS et al., 1980).

Na rotina, fezes de cães com diarreia são examinadas por Imunocromatografia (IC), porém essa técnica é afetada pela baixa sensibilidade relativa. Além disso, problemas podem ocorrer quando são testadas fezes de cães vacinados apresentando diarreia poucos dias após a administração de vacinas contendo o CPV-2 original (DESARIO et al., 2005).

A microscopia eletrônica (ME) é um procedimento altamente sensível para a identificação de microrganismos em fluidos corpóreos e tecidos. Um dos usos mais relevantes da ME é a detecção de partículas virais em fezes de animais com sinais gastrointestinais da doença (LAPPIN, 2010).

Isolamento viral (IV) em cultura de tecidos e neutralização do vírus isolado com antisoro específico confirmam o diagnóstico. O efeito citopático não é tão característico e pode demorar a aparecer, dependendo do título viral. No segundo dia após a inoculação, antígenos virais podem ser encontrados no núcleo de células infectadas por imunofluorescência. Porém, segundo Mochizuki et al. (1993), isolamento viral é mais sensível, porém é muito trabalhoso e demorado, pois requer um longo período de incubação (5-10 dias) e testes adicionais para detecção dos antígenos virais.

A presença de vírus pode ser demonstrada por hemaglutinação (HA), mas altos títulos de vírus são necessários. O teste é positivo quando o HA for bloqueado pelo antisoro vírus-específico. Hemácias de suínos são necessárias no teste de HA e deve-se assegurar uma boa

qualidade das mesmas, pois isso pode afetar o coeficiente de sedimentação dos eritrócitos, como ocorre nos casos de estresse ou doenças (DESARIO et al., 2005).

Testes sorológicos são usados para determinar o status imune dos cães. O soro coletado de indivíduos infectados pode ser testado pela resposta de anticorpos em um ensaio imunoabsorvente ligado à enzima (ELISA). Os ensaios imunoenzimáticos, também conhecidos como imunoenaios em fase sólida são designados para detectar anticorpos por meio da produção secundária de mudança de cor ativada por uma enzima. Os testes de Elisa são úteis na detecção e quantificação da presença de vírus em amostras clínicas. O uso de anticorpos específicos imobilizados em fase sólida também permite a captura de patógenos para o diagnóstico quantitativo em relação a padrões conhecidos (ACTOR, 2007).

A inibição da hemaglutinação (HI) é o mais usado. Testes de soro-neutralização em cultura de tecidos são mais sensíveis que os testes de HI. Entretanto, eles consomem mais tempo e os títulos devem ser determinados por imunofluorescência ou HA de culturas sobrenadantes, porque os efeitos citopáticos não são muito característicos (CARMICHAEL et al., 1980).

O cálculo do título infeccioso em culturas de células é trabalhoso, consome muito tempo e não é aplicável na rotina, pois o isolamento viral em cultura de células não pode ser realizado para todas as cepas de CPV-2. Além disso, como muitas cepas de CPV-2 não produzem efeito citopático evidente, a presença de antígenos virais em culturas celulares tem que ser visualizada por imunofluorescência, o que implica um maior gasto de tempo (DECARO et al., 2005).

O predomínio de métodos fenotípicos utilizando cultivos celulares e a detecção de antígenos, embora ainda de considerável valor, estão sendo suplantados pela detecção, caracterização e quantificação microbiana de ácidos nucleicos. A técnica de PCR utiliza um par de oligonucleotídeos sintéticos denominados *primers*, cada um projetado para hibridizar no sentido 5' – 3' em um DNA de dupla fita alvo. Cada *primer* hibridizado constitui um ponto de partida para a produção de uma fita de DNA complementar através da adição sequencial de deoxinucleotídeos usando DNA polimerases recombinantes derivadas de bactérias termófilas (MACKAY et al., 2007).

Segundo Heid et al. (1996), diversos parâmetros podem influenciar a eficiência da reação de PCR, tais como a concentração de sais e magnésio, as condições da reação, isto é, tempo e temperatura, o tamanho e a composição do alvo, a sequência dos *primers* e a pureza da amostra.

Desario et al. (2005), compararam os testes laboratoriais mais usados para o diagnóstico do CPV-2, tais como IC, HA, IV, PCR convencional e PCR em tempo real e verificaram que a melhor correlação foi observada quando comparado com o PCR convencional, onde houve uma concordância de 94,38%. A PCR em tempo real foi mais sensível, específica e reprodutível, permitindo a detecção e quantificação de ácidos nucleicos do CPV-2 em poucas horas. Além disso, há menor risco de contaminação cruzada que a PCR convencional. Porém, a PCR em tempo real requer equipamentos e reagentes de alto custo e mão de obra especializada.

A PCR em tempo real para CPV-2 apresenta uma série de vantagens em relação a PCR convencional, como um menor risco de contaminação cruzada devido à ausência de manipulação de produto amplificado; redução do risco carcinogênico pela eliminação da manipulação de substâncias químicas tóxicas como brometo de etídio e pela ausência de exposição à luz ultravioleta (DIALLO ET AL., 2006; HEID ET AL., 2011). Além disso, sondas fluorogênicas oferecem grande vantagem em relação a marcadores intercalantes de DNA, como a maior especificidade, ou seja, *primers* dímeros e produtos inespecíficos não são detectados (HEID et al., 2011). Além disso, a PCR convencional não permite precisão e rapidez na quantificação de um grande número de amostras, e a aplicação da PCR em tempo real quantitativa permite calcular a carga viral e elimina essas limitações (ISLAM et al., 2004).

Um experimento de quantificação ou qPCR é aquele no qual se mede em tempo real a quantidade de uma sequência de ácido nucleico alvo (DNA, cDNA ou RNA) em cada ciclo de amplificação da PCR (APPLIED BIOSYSTEMS, 2010). Através da quantificação do produto amplificado na fase exponencial da reação, é possível detectar diferenças na quantidade de moléculas virais no início da reação (carga viral). Os resultados da qPCR estão disponíveis em menos de 2 horas e podem ser analisados diretamente sem a necessidade de passos adicionais após a PCR (LIVAK et al., 1995).

O monitoramento do acúmulo de amplificados em tempo real tem sido possível pelo uso de *primers*, sondas ou *amplicons* marcados com moléculas fluorogênicas. A maior velocidade do PCR em tempo real se deve à redução no tempo de ciclagem, remoção de procedimentos de detecção pós-PCR e no uso de marcadores fluorogênicos e métodos sensíveis de detecção dessas emissões. A redução no tamanho do amplificado geralmente recomendada pelos criadores do PCR em tempo real pode estar envolvida nessa velocidade, entretanto, nem sempre a diminuição no tamanho dos produtos necessariamente promove uma melhora na eficiência da PCR (NITSCHKE et al., 2000).

Sondas de hidrólise foram as primeiras sequências específicas para a PCR em tempo real (HOLLAND et al, 1991). Um ensaio com sondas de hidrólise consiste em dois *primers* e um sonda de detecção que se liga ao alvo amplificado e está duplamente marcada com diferentes moléculas. Quando excitada por um *laser* ou outra fonte de luz, o fluoróforo na extremidade 5' ou *reporter*, emite o sinal acumulado após a degradação da sonda pela DNA polimerase, enquanto a outra molécula próxima à extremidade 3' chamada *quencher* capta o sinal emitido pelo *reporter* enquanto as duas moléculas estão em estreita proximidade espacial. A distância entre o *reporter* e o *quencher* não deve exceder 25-30 nucleotídeos que corresponde a cerca de 100 Å de comprimento (APPLIED BIOSYSTEMS, 2010).

Fluoróforos comumente usados como *reporter* são derivados da 6-carboxi-fluoresceína (FAM) que emite fortes sinais de fluorescência num comprimento de onda de 518nm quando excitada à 494nm. Vários outros fluoróforos têm sido relatados e incluem o TET, JOE, HEX, VIC e Yakima Yellow. O primeiro fluoróforo *quencher* usado foi o TAMRA (6-carboxi-tetrametil-rodamina), mas recentemente *quencher* não fluorescentes (NFQ) têm sido utilizados (APPLIED BIOSYSTEMS, 2010).

Sondas *minor groove binder* (MGB) mostraram modificações úteis na hidrólise de sondas. São moléculas orgânicas tricíclicas acompanhando a extremidade 3' e que podem se ligar na ranhura menor (*minor groove*) do DNA, combinando-se perfeitamente no duplex sonda-alvo (AFONINA et al., 2002). Isso resulta no aumento da temperatura de anelamento em 10 a 15°C, permitindo o desenho de sondas de hidrólise de apenas 13 a 18 nucleotídeos (NITSCHKE, 2007).

Durante a amplificação, o sinal fluorescente do produto amplificado pode ser detectado pela atividade 5'nuclease da Taq polimerase. Esse processo ocorre a cada ciclo e não interfere com o acúmulo exponencial do produto. Durante a PCR, a sonda MGB anela especificamente entre os dois *primers*. Quando a sonda está intacta, a proximidade do *reporter* e *quencher* suprime a fluorescência devido à transferência de energia de ressonância fluorescente (FRET) ou energia Föster que é um processo não radiativo no qual a energia é emitida entre moléculas permissivas espacialmente separadas por 10 a 100 Å (APPLIED BIOSYSTEMS, 2006; NITSCHKE, 2007).

Quando o *reporter* e o *quencher* da sonda de hidrólise estão em estreita proximidade e iluminados pela luz alta de um instrumento, o supressor ou *quencher* "sequestra" as emissões de excitação do *reporter*. A clivagem pela enzima Taq polimerase separa o *reporter* do *quencher*, desestabilizando a energia FRET, o que resulta no aumento da fluorescência que ocorre somente se a sequência alvo é complementar à sequência da sonda. Por esse motivo,

amplificação inespecífica não é detectada. O *quencher*, em seguida, emite energia na forma de fluorescência ou na forma de calor no caso de NFQ. Quando os fluoróforos são separados, como ocorre na hidrólise da oligossonda, o *quencher* deixa de influenciar o *reporter*, que agora emite fluorescência em um comprimento de onda distinto gravado pelo instrumento. Como a extremidade 3' da sonda está bloqueada, não há extensão da mesma durante a PCR (APPLIED BIOSYSTEMS, 2006; NOLAN et al., 2007).

Na fase geométrica ou exponencial, o sinal aumenta de maneira diretamente proporcional ao aumento do produto de PCR. Nessa fase, a amplificação é caracterizada por uma eficiência alta e constante. Isso ocorre entre o primeiro aumento da fluorescência detectável e antes do início da fase linear. Como o produto de PCR continua a aumentar, a quantidade de enzima Taq polimerase diminui. Durante a fase linear, a inclinação da curva de amplificação diminui constantemente, um ou mais componentes da PCR diminui abaixo da concentração crítica e a eficiência de amplificação começa a diminuir. Como a eficiência de amplificação diminui continuamente, essa fase apresenta baixa precisão (APPLIED BIOSYSTEMS, 2006).

Durante a PCR em tempo real, o sinal fluorescente (R_n) aumenta à medida que a quantidade de produto amplificado aumenta. O R_n é também chamado de referência passiva, é integrante do Master Mix e sua função é normalizar o sinal do *reporter*. O limite ou *Threshold* corresponde a uma linha arbitrária traçada na fase exponencial da reação e utilizado para definir o nível de fluorescência detectável, isto é, uma amostra com maior número inicial de cópias cruzará o *Threshold* mais cedo do que uma amostra com menor número de cópias. O ponto em que a fluorescência ultrapassa o ruído de fundo, também chamado linha de base ou *baseline* é chamado ciclo de *Threshold* (C_T), o qual depende da quantidade inicial do alvo e da eficiência da amplificação. Para determinar o C_T , o software gera uma curva de amplificação subtraindo os ciclos que correspondem ao *baseline* (APPLIED BIOSYSTEMS, 2006).

O *slope* corresponde à inclinação da reta na curva padrão e indica a eficiência de amplificação do ensaio. Um *slope* de $-3,3$ indica 100% de eficiência da amplificação. O coeficiente de correlação (R^2) mede o quão próximo é o ajuste entre a regressão linear da curva padrão e os valores individuais de C_T das amostras. O valor 1 indica um ajuste perfeito entre a regressão linear e os dados individuais. O Y indica o valor esperado de C_T para uma amostra com quantidade 1, por exemplo, 1ng/uL (APPLIED BIOSYSTEMS, 2006).

Os experimentos de curva padrão determinam a quantidade absoluta de um alvo na amostra e são usados para quantificar a carga viral. A curva padrão é obtida através da

diluição seriada de uma quantidade conhecida (APPLIED BIOSYSTEMS, 2010). Usando uma curva padrão para a amostra de interesse, os valores relativos dos números de cópias podem ser determinados para as amostras desconhecidas. Valores de C_T correlacionam linearmente com o número relativo de cópias de DNA (HEID et al., 1996).

A PCR em tempo real pode auxiliar na obtenção de novos esclarecimentos sobre a patogênese do CPV-2. A possibilidade de determinar precisamente a duração e quantidade de vírus presente na suspensão viral é de fundamental importância para avaliar a eficácia das vacinas.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

- 1) Padronizar uma PCR convencional para identificação da semente vacinal VR953™ utilizada na vacina Imunovet®.
- 2) Sequenciar parcialmente a região altamente conservada do gene VP2 da amostra vacinal empregada no Laboratório Biovet, amplificada pela técnica de PCR padronizada.
- 3) A partir do seqüenciamento descrito no item anterior, desenhar *primers* e sondas para a PCR em tempo real.
- 4) Avaliar através da técnica de PCR em tempo real padronizada, a cinética de replicação do CPV-2 em diferentes condições de cultivo de células CRFK em garrafas tipo *Roller*.

MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 AMOSTRA VACINAL DE PARVOVÍRUS CANINO

A amostra vacinal de parvovírus canino do Laboratório Biovet foi recebida em 13/08/1990 e adquirida do banco de células American Type Culture Collection (ATCC) (<http://www.atcc.org>) nos Estados Unidos. É chamada VR-953™, cepa de Cornell 780916 atenuada, originada de fezes de cães com enterite hemorrágica e depositada por Carmichael (1981), adaptada em células primárias e secundárias de rim canino. Produz efeito citopático *in vitro* em cultura de tecidos (CRFK) e grandes placas em células A72. Segundo o registro, ela é antigenicamente indistinguível do FPV e do vírus da enterite dos visons. Não é patogênica para filhotes recém-nascidos.

3.2 PADRONIZAÇÃO E APLICAÇÃO DA PCR PARA A DETECÇÃO DO GENE VP2 DA PROTEÍNA DO CAPSÍDEO

Foi desenvolvida uma reação de PCR para a detecção do segmento de 897pb do gene VP2 localizado no capsídeo viral do parvovírus canino, altamente conservado, a partir dos *primers* CPV-Pa e CPV-Pb. As amostras que resultassem positivas para tal reação, seriam então submetidas ao sequenciamento parcial.

3.2.1 Desenho dos *Primers* para PCR e Sequenciamento Parcial do Gene VP2 da Vacina

Para detecção da amostra vacinal VR-953™, o primeiro passo consistiu no desenho dos *primers*. Inicialmente, foram examinadas 107 amostras brasileiras do gene das proteínas VP1/VP2 do capsídeo viral do CPV-2 depositadas no Genbank, através do alinhamento

múltiplo ClustalW no *software* BioEdit ([http:// www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html](http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html)). Em seguida, 31 dessas amostras isoladas no estado de São Paulo/Brasil foram selecionadas e novamente alinhadas através do ClustalW. As cepas e os números de acesso usados para o alinhamento seguem no quadro 2.

A região alvo foi primeiramente identificada por inspeção visual da sequência alinhada. Sequências consenso dos segmentos conservados identificados dentro do alinhamento foram utilizadas para desenhar os *primers* usando um programa de desenho de oligonucleotídeos (Integrated DNA Technologies, <http://www.idtdna.com>), obtendo-se os *primers* senso CPV-Pa e anti-senso CPV-Pb, com um produto esperado de 897pb. As sequências dos *primers* utilizados encontram-se no quadro 3. O desenho representando a posição dos *primers* encontra-se na figura 1.

Cada *primer* foi submetido ao BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) localizado no GenBank do NCBI (*National Centre for Biotechnology Information*) disponível em <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>, para pesquisa das sequências similares ao parvovírus canino.

Nº Genbank	Identificação da Amostra	Ano de depósito
DQ340424	BR 137	1993
DQ340425	BR 227	1993
DQ340426	BR 84	1994
DQ340427	BR 133	1994
DQ340428	BR 209	1994
DQ340429	BR 237	1994
DQ340430	BR 46	1995
DQ340431	BR 56	1995
DQ340432	BR 62	1995
DQ340433	BR 7168	2000
DQ340434	BR 8155	2000
DQ340404	BR 6	1980
DQ340405	BR 135	1980
DQ340406	BR 137	1980
DQ340407	BR 145	1980
DQ340408	BR 154	1980
DQ340409	BR 183	1985
DQ340410	BR 315	1986
DQ340411	BR 8	1990
DQ340412	BR 17	1990
DQ340413	BR 18	1990
DQ340414	BR 31	1990
DQ340415	BR 43	1991
DQ340416	BR 47	1991
DQ340417	BR 52	1991
DQ340418	BR 491	1992
DQ340419	BR 570	1992
DQ340420	BR 593	1992
DQ340421	BR 597	1992
DQ340422	BR 22	1993
DQ340423	BR 136	1993

Quadro 2 Amostras de CPV-2 provenientes de São Paulo/Brasil usadas no alinhamento e desenho dos *primers* para PCR da semente vacinal VR-953™.

Primer	Sequência	Tamanho Primer (pb)	Posição	Tamanho do Fragmento (pb)
CPV senso	AAACGGATGGGTGGAAATCACAGC	24	667–690	897
CPV anti-senso	TTAAATGGCCCTTGTGTAGACGCC	24	1540–1563	

Quadro 3 – Sequências, tamanho e posição dos *primers* e sonda encomendados neste estudo e tamanho do fragmento gerado na PCR em tempo real.

Figura 1 – Desenho esquemático mostrando a posição dos *primers* CPV-Pa e CPV-Pb no gene VP2 da proteína do capsídeo viral do CPV-2.

3.2.2 – Extração de DNA das Suspensões Vacinais

A extração de DNA do CPV-2 das suspensões vacinais foi realizada utilizando-se o Isotiocianato de Guanidina (Invitrogen Life Technologies) associado com clorofórmio (Merck), segundo Chomczynski (1993). Após a extração, as amostras foram ressuspensas em água DPEC (Invitrogen Life Technologies) e armazenadas em freezer à -20°C até o uso.

Para a extração, amostras de suspensão vacinal foram descongeladas e em microtubos de 1,5mL, adicionou-se 200µL de cada amostra e 600µL de Isotiocianato de Guanidina (Invitrogen Life Technologies), homogeneizando por 15 segundos em agitador magnético. Essas amostras foram então incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente.

Em seguida, adicionou-se 100µL de clorofórmio (Merck) em cada tubo, homogeneizando por 15 segundos em agitador magnético. Novamente foram incubadas durante 10 minutos à temperatura ambiente.

Após esse período, as amostras foram centrifugadas (centrífuga Eppendorf® modelo 5417R) a 12.000g por 10 minutos à 4°C. Feito isso, as amostras foram separadas em 2 fases distintas, uma parte azul inferior contendo a fase orgânica e uma parte superior incolor contendo proteínas e DNA. Retirou-se o sobrenadante (fase superior incolor), o qual foi colocado em novos microtubos de 1,5mL, desprezando os microtubos com a fase inferior (azul) em recipiente adequado.

Adicionou-se 500µL de propanol 75%, homogeneizando por 15 segundos em agitador magnético e posteriormente as amostras foram incubadas à -20°C durante 2 horas. Em seguida, as amostras foram centrifugadas à 12.000g por 20 minutos à 4°C. No final dessa etapa, o sobrenadante foi descartado por inversão dos microtubos em recipiente adequado, os quais em seguida foram colocados invertidos sobre papel absorvente. Adicionou-se 500µL de etanol 70%, homogeneizando por 15 segundos em agitador magnético. As amostras foram novamente centrifugadas à 12.000g por 10 minutos à 4°C.

O sobrenadante foi descartado em recipiente adequado e os microtubos colocados invertidos sobre o papel absorvente. Em seguida os microtubos foram colocados no termobloco (Loccus Biotecnologia modelo Dry Bath HC Control) à 56°C durante cerca de 5 minutos até secarem completamente. O DNA foi ressuspensionado em 20µL de água estéril e os microtubos colocados novamente no termobloco à 56°C por 10 minutos. Por último, as amostras foram homogeneizadas por 15 segundos em agitador magnético e armazenadas à -20°C até o uso.

3.2.3 – Preparo do Mix de PCR

A reação de PCR convencional foi realizada em microtubos de polipropileno de 200µL (Axygen) utilizando-se por reação um volume final de 50µL contendo água DPEC (Invitrogen Life Technologies), tampão PCR *buffer* (20mM de Tris-HCl, 50mM de KCl, pH 8,4 e), MgCl₂, desoxinucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, Fermentas, EUA), *primers* CPV-Pa e CPV-Pb (Integrated DNA Technologies), *Platinum Taq* DNA Polimerase (Invitrogen Life Technologies) e DNA alvo. As concentrações e volumes para uma reação estão descritos no quadro 4.

Reagentes	Concentração final	Volume (1reação)
dNTPs	0,2mM cada	1,0μL
MgCl ₂	1,5mM	1,5μL
Tampão	1x	5,0μL
CPV-Pa	0,2μM	1,0μL
CPV-Pb	0,2μM	1,0μL
DNA polimerase	1,0 U/μL	0,2μL
DNA alvo	N.A.	1,0μL
Água DPEC	N.A.	39,3μL
Total	N.A.	50,0 μL

N.A: Não se aplica.

Quadro 4 - Reagentes, concentração final de cada um e volume em μL para uma reação de PCR estabelecida neste estudo.

A reação de PCR foi conduzida em um termociclador automático modelo PCR *Express* (Thermohybaidd). As condições térmicas consistiram de ativação da *Platinum Taq* DNA Polimerase à 95°C por 2 minutos e 34 ciclos de desnaturação à 95°C por 45 segundos, anelamento à 50°C por 1 minuto e polimerização à 72°C por 1 minuto, seguida pela extensão final à 72°C por 7 minutos.

Em todas as reações foram utilizados controles negativos contendo a mesma mistura de reagentes, nos quais o DNA foi substituído por água DPEC (Invitrogen Life Technologies).

Amostras de DNA viral utilizadas como controle positivo na PCR foram derivadas de vacinas vivas atenuadas de laboratórios como Vanguard® (Pfizer), Recombitek® (Merial) e Duramune® (FortDodge), conforme descrito no quadro 6, item 3.7.3.

3.2.4 – Eletroforese do Produto Amplificado

Um volume de 12μL (10μL dos produtos de amplificação adicionados de 2μL de azul de bromofenol) foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE (Tris-

borato 0,9M; EDTA 10mM; pH 8,0) 0,5 x concentrado. A corrida eletroforética foi realizada a 120V por 90 minutos em cuba horizontal modelo B2 de 12x14cm (OWL).

As bandas foram visualizadas em transluminador de luz ultravioleta, após corar o gel com uma solução de brometo de etídio (Invitrogen Life Technologies) na concentração de 0,5µg/mL, conforme descrito por Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989).

O tamanho das bandas de DNA foi comparado a um padrão de peso molecular conhecido, apresentando escalas de 100pb (O'Gene Ruler 100pb DNA Ladder, Fermentas).

3.2.5 – Sensibilidade Analítica da PCR

O passo seguinte foi avaliar o limiar de detecção dos *primers* CPV-Pa e CPV-Pb, para verificar a possível utilização desses *primers* em testes de diagnóstico. Para tanto, o produto amplificado de uma amostra de suspensão vacinal com título inicial de $1 \times 10^{6,66}$ foi submetido a diluições seriadas 1:10, procedendo da reação de PCR descrita no item 3.3.2.

Além da amostra amplificada, no mesmo gel foi utilizado um controle negativo e um marcador de peso molecular de 100 a 1000pb (O'Gene Ruler 100pb DNA Ladder, Fermentas). A sensibilidade analítica foi repetida por mais três vezes.

3.3 – SEQUENCIAMENTO DA SEMENTE VACINAL

A identidade do produto de amplificado por PCR da amostra vacinal VR-953™ contendo o CPV foi confirmada através deste sequenciamento.

Além disso, o sequenciamento foi empregado para o desenho de *primers* e sondas para a PCR em tempo real (item 3.4).

3.3.1 – Purificação e Quantificação do Produto Amplificado

Inicialmente, bandas de DNA amplificado reveladas em gel de agarose 1,5% foram recortadas e purificadas utilizando um kit de purificação *GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare), de acordo com as instruções do fabricante.

Uma alíquota de 5µL do produto purificado foi novamente submetida à eletroforese para estimar a concentração de DNA presente, o qual foi quantificado visualmente com o *Low Mass DNA Ladder* (Invitrogen) em conformidade com as instruções do fabricante.

3.3.2 – Reação de Sequenciamento

Para a reação de seqüenciamento empregou-se o kit *BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* (Perkin Elmer). As quantidades de reagentes foram determinadas a partir da concentração do DNA purificado. Para uma reação com 10µL de volume final, foram utilizados 1µL de *BigDye*^{TM} v.3.1 (Applied Biosystems), 2 µL de tampão *Save Money* 5x (200mM Tris-HCl; 5mM MgCl₂; pH 9,0), 10pmols de *primer* (senso e anti-senso) e 11,5µL de DNA.

A reação de seqüenciamento foi conduzida em um termociclador automático modelo PTC-200 (Peltier Thermal Cycler MJ Research) seguindo o protocolo: desnaturação inicial à 96°C por 1 minuto, 40 ciclos de 96°C por 15 segundos, 50°C por 15 segundos e 60°C por 4 minutos.

3.3.3 – Precipitação do Produto Amplificado

Após a reação de seqüenciamento, os produtos foram purificados por precipitação em álcool. A cada amostra, adicionaram-se 80µL de isopropanol a 65%. Após a homogeneização, as amostras foram mantidas em local protegido da luz por 15 minutos, em temperatura ambiente, e em seguida centrifugadas a 14.000g por 25 minutos. Descartou-se o isopropanol por inversão dos microtubos, e o sedimento foi homogeneizado com 300µL de etanol 70%. Procedeu-se uma nova centrifugação a 14.000g por 10 minutos. O etanol foi cuidadosamente

aspirado com o auxílio de uma pipeta, sendo sua total remoção conduzida em banho-maria à 80°C por 2 minutos. As amostras foram mantidas à -20°C até o momento do sequenciamento.

3.3.4 - Sequenciamento

Antes de submetidas à eletroforese em sequenciador automático modelo *ABI Prism™ 377 DNA Sequencers* (Applied Biosystems), as amostras foram homogeneizadas com 3,4µL de formamida e Blue Dextran-EDTA (Applied Biosystems) na proporção de 5:1, desnaturadas à 95°C por 3 minutos e colocadas no gelo por 2 minutos.

3.3.5 – Alinhamento, Tradução das Sequências de Nucleotídeos e Edição Final

As sequências de nucleotídeos foram analisadas e modificadas no formato Contig com auxílio do programa Phred e a ferramenta de montagem Phrap disponível online (<http://www.embrapa.com.br/phredphrap>) e do BioEdit. As sequências resultantes foram comparadas no alinhamento múltiplo umas com as outras e contra 100 sequências homólogas representativas de diversos CPV-2 depositados no GenBank, tais como GU569943, FJ011097, EU659117, AJ002927, U22192, M38245, M19296, AY262281, M10989, entre outras. A sequência da semente vacinal Biovet® contendo 757pb após a reação de sequenciamento foi comparada com outras sequências similares obtidas através do BLAST.

3.4 – PADRONIZAÇÃO DA PCR EM TEMPO REAL

Afim de verificar o uso da PCR em tempo real para a quantificação do DNA de parvovírus canino, o fragmento de 119 pb encomendado na empresa especializada (Applied Biosystems) foi analisado no BLAST quanto à presença de nucleotídeos polimórficos (*Single Nucleotide Polymorphism*), cuja presença poderia interferir no desempenho da PCR em tempo real quando se utiliza o sistema TaqMan.

3.4.1 – Desenho de *primers* e sondas para a PCR em tempo real utilizando o produto sequenciado

O fragmento de 757pb obtido na reação de sequenciamento foi submetido ao *software File Builder v. 3.0* para a síntese de *primers* e sondas pelo sistema *Custom TaqMan Genomic Assay* (Applied Biosystems) para a PCR em tempo real (<http://www2.appliedbiosystems.com/support/software/assaysbydesign/installs>), onde foi informada a espécie animal, o código do produto (CPV), o nome da sequência (VP2) e as posições possíveis para a síntese.

Em seguida, os *primers* senso, anti-senso e a sondas (chamados de *Assay-by-Design^{SM}*) foram encomendados diretamente à empresa especializada (Applied Biosystems). A sonda interna foi do tipo MGB (*minor groove binder*) com *reporter* fluorescente FAM^{TM} para o CPV-2 na extremidade 5' e com *quencher* não fluorescente na extremidade 3'. As sequências dos *primers* senso, anti-senso e da sonda e o tamanho do fragmento obtido encontram-se no quadro 5.

Quando recebidos, os mesmos tiveram a especificidade da sequência nucleotídica testada no BLAST com outras 170 amostras do CPV depositadas no banco de dados GenBank.

Primer	Sequência	Tamanho Primer (pb)	Posição	Tamanho do Fragmento (pb)
CPV senso	GCAGCTATGAGATCTGAGACATTGG	25	562 – 586	119
CPV anti-senso	GCCACTAGTTCCAGTATGAGATGGTA	26	656 – 681	
Sonda	CCAACCATACCAACTCC	17	604 – 620	

Quadro 5 – Sequências, tamanho e posição dos *primers* e sonda encomendados neste estudo e tamanho do fragmento gerado na PCR em tempo real.

3.4.2 – Aplicação da PCR em Tempo Real

Para avaliar se o Assing-by-Design^{SM} encomendado amplificaria amostras da semente vacinação, a reação de PCR em tempo real foi preparada utilizando o conjunto de reagentes *TaqMan® Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems), contendo 300µM de cada dATP, dCTP e dGTP e 600µM de dUTP, tampão (10mM de Tris-HCl pH 8,3; 50mM de KCl; 5mM de MgCl₂), 0,625U de AmpliTaq Gold® DNA polimerase por reação, 0,25U de AmpErase UNG por reação e referência passiva (ROX).

O protocolo de reação utilizou *TaqMan Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems), *Assay-by-Design^{SM}* Service (conjunto de 900nmol/L de cada *primer* senso e anti-senso e 250nmol/L de cada sonda fluorescente específica), DNA genômico, água ultra-pura q.s.p. As concentrações e o volume para uma reação seguem no quadro 6. As reações foram realizadas em triplicatas.

Reagentes	Concentração final	Volume (1 reação)
Master Mix	2x	10,0µL
Assay	20x	1,0µL
Água DPEC	N.A.	7,0µL
DNA alvo	N.A.	2,0µL
Total	N.A.	20,0µL

Quadro 6 - Reagentes, concentração final de cada um e volume em µL para uma reação de PCR em tempo real.

Foi utilizada a plataforma StepOne (Applied Biosystems), com o seguinte protocolo de ciclagem para amplificação: um ciclo de 50°C durante 2 minutos, um ciclo de 95°C durante 10 minutos; 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos e 60°C durante 1 minuto, ocorrendo a leitura da fluorescência neste último passo durante a fase de “anelamento” e extensão.

3.5 – QUANTIFICAÇÃO ABSOLUTA DA CARGA VIRAL

3.5.1 – Clonagem

A quantificação absoluta da PCR em tempo real foi estabelecida com base em uma curva padrão, a partir de uma solução de estoque com concentração conhecida. Para gerar essa solução, um produto amplificado de 897pb do gene VP2 foi inserido em um plasmídeo pTZ57R/T (InsTAclone PCR Cloning Kit, Fermentas) de 2886pb.

O plasmídeo foi clonado em *Escherichia coli* DH5 α e os clones transformados e selecionados foram multiplicados em meio LB (1 % Triptona, 0,5 % extrato de levedura, 1 % de cloreto de sódio) contendo 100 μ g/mL de ampicilina, 100 μ L de IPTG (isophropil 1 β -thiogalactoside – 100mM) e 20 μ L de X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside – 50mg/mL). O DNA plasmidial foi purificado de células transformadas usando o kit NucleoSpin (Macherey-Nagel), de acordo com as instruções do fabricante.

Em seguida, foi realizada uma PCR do produto purificado para confirmar a presença e tamanho do inserto no gel de agarose 1,5%. Os clones obtidos também foram avaliados pela PCR em tempo real para confirmar a presença do clone de CPV-2 no plasmídeo.

Para linearizar o plasmídeo e liberar o produto clonado, um mapa das enzimas de restrição foi gerado através do programa BioEdit e certificou-se que o produto de PCR clonado não possuía sítio de restrição para as enzimas *Bam*HI e *Eco*RI, as quais foram então adquiridas (Figura 2).

De posse dessas enzimas, o inserto clonado foi então linearizado através da digestão nas duas seqüências alvo para as enzimas *Bam*HI e *Eco*RI na região do sítio múltiplo de clonagem (“polylinker”) do plasmídeo (Figura 3). A concentração do plasmídeo foi calculada em um Nanodrop (Thermo 2000) no filtro com comprimento de onda de 260nm.

Após a linearização do plasmídeo, procedeu-se a purificação do clone utilizando o kit de purificação *GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare), de acordo com as instruções do fabricante.

1	AGTGGTTGTAATAATATGGATAAAACTGCAGTTAACGGAAACATGGCTTTAGATGATATTCATGCACAAATTGTAACAC	80
1	TCACCAACATTTATTATACCTATTTTGACGTCAATTGGCTTTGTACCGAAATCTACTATAAGTACGTGTTTAACATTGTG	80
	Sfci HincII TspDI	
	PstI TspGI	
	HpaI	
	Hpy8I	
81	CTTGGTCATTGGTTGATGCAAAATGCTTGGGGAGTTTGGTTTAATCCAGGAGATTGGCAACTAATTGTTAATACTATGAGT	160
81	GAACCAAGTAACCAACTACGTTTACGAACCCCTCAACCAAAATTAGGTCTCTAACC GTTGATTAACAATTATGATACTCA	160
	BsaII BstXI	
	StyI SfaNI	
161	GAGTTGCATTTAGTTAGTTTTGAACAAGAAATTTTTAATGTTGTTTTAAAGACTGTTTCAGAATCTGCTACTCAGCCACC	240
161	CTCAACGTAAATCAATCAAAACTTGTCTTTAAAAAATTACAACAAAATTTCTGACAAAGTCTTAGACGATGAGTCGGTGG	240
	ApoI DraI A1wNI	
241	AACTAAAGTTTATAATAATGATTTAACTGCATCATTGATGGTTGCATTAGATAGTAATAATACTATGCCATTTACTCCAG	320
241	TTGATTTCAAATATTATTACTAAATTGACGTAGTAACCTACCAACGTAATCTATCATTATTATGATACGGTAAATGAGGTC	320
	BspCNI PstI SfaNI BpmI	
	BseMII Eco57MI	
321	CAGCTATGAGATCTGAGACATTGGGTTTTATCCATGGAAACCAACCATAACCAACTCCATGGAGATATTATTTTCAATGG	400
321	GTCGATACTCTAGACTCTGTAAACCCAAAAATAGGTACCTTTGGTTGGTATGGTTGAGGTACCTCTATAATAAAAGTTACC	400
	BseMII BbvI BsaII BsaII	
	BspCNI BtgI BtgI	
	BglII NcoI NcoI	
	BstYI StyI StyI	
	BsmAI BstXI	
401	GATAGAACATTAATACCATCTCATACTGGAAC TAGTGGCACACCAACAAATATATACCATGGTACAGATCCAGATGATGT	480
401	CTATCTTGTAATTATGGTAGAGTATGACCTTGATCACC GTGGTTGTTTATATATGGTACCATGTCTAGGTCTACTACA	480
	AseI BsrI BsaII BstYI	
	SpeI BtgI Hpy188III	
	NcoI StyI	
	A1wI	
481	TCAATTTTATACTATTGAAAATTCTGTGCCAGTACACTTACTAAGAACAGGTGATGAATTTGCTACAGGAACATTTTTTT	560
481	AGTTAAATATGATAACTTTTAAAGACACGGTCATGTGAATGATTCTTGCCACTACTTAAACGATGTCCTTTGTAACAAAA	560
	ApoI BsrI ApoI HphI TspDI	
	TatI SfcI	
	Hpy8I	
561	TTGATTGTAGACCATGTAGACTAACACATACATGGCAACAAATAGAGCATTGGGCTTACCACCATTTCTAAATCTTTG	640
561	AACTAACATCTGGTACATCTGATTGTGTATGTACCGTTTGTCTCTGTAACCCGAATGGTGGTAAAGATTTAAGAAAC	640
	AccI AccI MslI ApoI	
	Hpy8I Hpy8I	
641	CCTCAATCTGAAGGAGATATTAAC TTTGGTGATATAGGAGTTCAACAAGATAAAAGACGTGGTATAACTCAATGGGAAA	720
641	GGAGTTAGACTTCCTCTATAATTGAAACCACTATATCCTCAAGTTGTTCTATTTTCTGCACCATATTGAGTTTACCC TTT	720
	MnII Eco57I HphI BmgBI	
	Eco57MI	
721	TACAACTATATTACTGAAGCTACTATTATGAGACCAGCTGAGGTT	766
721	ATGTTTGATATAATGACTTCGATGATAATACTCTGGTCGACTCCA	766
	BsaI MnII	
	BsmAI Eco57I	
	BseMII BbvCI	
	BspCNI	
	Eco57MI	
	MspAII	
	PvuII	
	Bpu10I	

Figura 2 - Descrição da sequência de 757pb de nucleotídeos do gene VP2 da proteína do capsídeo do CPV-2 acrescida dos seus respectivos sítios de clivagem de enzimas. Observa-se que as enzimas *Bam*HI e *Eco*RI não clivam nenhum segmento

Figura 3 - Mapa do vetor pTZ57R/T (InsTAclone, Fermentas) de 2886pb utilizado no processo de clonagem, com seus sítios de clivagem das enzimas de restrição

No caso de não se obter um clone com no mínimo 100ng/ μ L, uma segunda alternativa seria realizar uma nova linearização do plasmídeo para se obter um maior volume do clone. Esse por sua vez seria submetido à purificação, tentando-se concentrar o mesmo, ou seja, todo o volume obtido da linearização seria filtrado na mesma membrana de sílica do *kit* de purificação. Em seguida, a solução de estoque seria novamente quantificada em Nanodrop.

Uma terceira alternativa seria utilizar para a curva padrão um produto de PCR amplificado do gene VP2 do CPV-2 com concentração conhecida, proveniente de suspensões vacinais. Para isso, um produto amplificado foi quantificado em espectrofotômetro (Biophotometer Eppendorf®) com absorvância de 260nm para ácidos nucleicos e diluído até a concentração de 100ng (produto de referência).

Para a quantificação absoluta do genoma viral, a curva padrão foi desenhada a partir dos valores de C_T versus o Log_{10} das concentrações do produto de referência. Foi encontrada uma relação linear entre o Log do número de cópias inicial do DNA alvo e os valores de C_T , admitindo assim a interpolação da concentração inicial do CPV-2 (carga viral) das amostras contendo quantidades desconhecidas de DNA.

3.6 – CONSTRUÇÃO DA CURVA PADRÃO PARA A QUANTIFICAÇÃO ABSOLUTA

A quantificação absoluta da PCR em tempo real foi estabelecida com base em uma curva padrão que consistiu de cinco alíquotas em diluições seriadas na escala 1:10 a partir do produto de PCR contendo 100ng, citado no item anterior (3.5.1).

O número de cópias foi calculado pela seguinte fórmula disponível em: <http://www.uri.edu/research/gsc/resources/cndna.html>:

$$\text{Número de cópias} = (\text{Quantidade em ng} \times 6,022 \times 10^{23}) / (\text{Tamanho em pb} \times 1 \times 10^9 \times 650).$$

Os seguintes parâmetros foram utilizados para converter a concentração obtida em ng/μL para número de cópias: PM médio de 1 pb de DNA = 650 g/mol; 1 mol = $6,022 \times 10^{23}$ moléculas.

Os resultados foram então analisados por meio do *software* StepOne (Applied Biosystems) em gráficos de fluorescência (ΔRn) em função do número de ciclos da reação. O ciclo no qual se detecta fluorescência no limite arbitrariamente estabelecido (*threshold*) da fase exponencial da curva de amplificação foi denominado ciclo de limiar (*threshold cycle*) ou C_T (Heid et al., 2011). Quanto maior a carga viral, ou seja, quanto mais cópias virais existirem no início da reação, mais precocemente ocorrerá a amplificação e, conseqüentemente, menor será o C_T . Valores de $C_T < 35$ foram considerados positivos e acima desse valor, negativos.

As diluições foram analisadas em triplicatas e as médias dos C_T consideradas no cálculo da validação. As diferenças de C_T entre as curvas resultantes das diluições seriadas na escala de 1:10 deverão estar próximos de 3,3. A inclinação (*slope*) da curva-padrão de regressão linear deverá estar entre -3,1 e -3,6 conferindo uma eficiência de reação entre 90 e 110%.

Baseando-se nos dados fornecidos de inclinação (*slope*) da curva, calculou-se a eficiência (E) da reação pela seguinte fórmula matemática: $E = 10^{[-1/\text{slope}]}$

3.7 – VALIDAÇÃO DA PCR EM TEMPO REAL

3.7.1 – Precisão Intra-ensaio (Repetibilidade) e Inter-ensaio (Reprodutibilidade)

A precisão intra e inter-ensaio foi estabelecida para validar a PCR em tempo real padronizada. No intra-ensaio, a repetibilidade foi avaliada testando 5 amostras num mesmo

experimento, enquanto no inter-ensaio, a reprodutibilidade foi avaliada testando a mesma amostra em 5 ensaios independentes.

O Coeficiente de Variação (CV) intra-ensaio foi determinado a partir dos valores de C_T das triplicatas dentro de cada ensaio. Os Coeficientes de Variação inter-ensaio foram obtidos dos valores médios do C_T de 5 ensaios separados e executados em dias diferentes, estabelecendo-se o mesmo valor de *Threshold* para todas as reações.

A precisão intra e inter-ensaio foi calculada da seguinte maneira:

$$CV (\%) = (\text{Desvio Padrão}/\text{média das medidas em triplicatas}) \times 100.$$

Após mensurações sucessivas, foram considerados com precisão satisfatória valores de CV menores que 10%.

3.7.2 – Sensibilidade Analítica

Para avaliar a sensibilidade analítica da PCR em tempo real padronizada para detecção de DNA do CPV-2, uma curva padrão para cálculo da amplificação foi obtida pela diluição seriada 1:10 do DNA em água estéril q.s.p. Estas suspensões foram submetidas à PCR em tempo real como descrito no item 3.6.

3.7.3 – Especificidade Analítica

Para verificar a existência de reações cruzadas dos *primers* e sondas encomendados, foi utilizada uma suspensão vacinal contendo Adenovírus canino tipo 1 e 2 (Hu et al., 2001; Decaro et al., 2005) e o Herpesvírus equino tipo 1 (Mori et al., 2011) e água estéril. Preparações de DNA de diversas vacinas contendo Parvovírus Canino também foram analisadas, de acordo com o quadro 6.

Vírus	Nome Comercial	Laboratório/Instituição
Parvovírus Canino	Imunovet	Biovet
Parvovírus Canino	Vanguard	Pfizer
Parvovírus Canino	Recombitek	Merial
Parvovírus Canino	Nobivac Puppy	Intervet-Schering
Parvovírus Canino	Duramune	FortDodge
Adenovírus Canino	Imunovet	Biovet
Herpesvírus eqüino	NA	Mori (2011) USP/Brasil
Panleucopenia Felina	Felocell	FortDodge

NA: não se aplica

Quadro 7 - Agentes utilizados para a validação da especificidade analítica do ensaio de PCR em tempo real para o CPV-2.

3.8 – REPLICAÇÃO DO CPV-2 EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO CELULAR

Amostras de suspensão vacinal foram coletadas durante as etapas de produção da vacina Imunovet®. Para isso, uma ampola contendo $1,5 \times 10^6$ células CRFK/mL foi descongelada e inoculada em uma garrafa *Roux* (225cm² de área) contendo 120mL de meio essencial mínimo (meio Biovet® 209) e mais 7% de soro fetal bovino. A garrafa foi incubada em estufa à 37°C ± 1°C durante 72h.

Após a formação da monocamada de células, realizou-se o primeiro repique. Para isso, esgotou-se o sobrenadante e realizou-se a tripsinização das células, adicionando-se 20mL de uma solução contendo PBS pH 7,4 (q.s.p), tripsina 1,5% e EDTA 0,4%. As células foram transferidas para garrafas tipo *Roller* (958cm² de área) contendo 150mL de meio Biovet® 209 e 7% de soro fetal bovino. Posteriormente, essas células foram novamente submetidas ao repique até um total de 40 garrafas *Roller*.

Em seguida, a monocamada de células foi visualizada em microscópio óptico com aumento de 250x e realizada a contagem celular utilizando a câmara de Neubauer e corante vital azul de Tripan. Diferentes quantidades de células de linhagem CRFK foram adicionadas às garrafas *Roller*. A semente viral VR953™ (semente mãe) submetida a cinco passagens em cultivo de células CRFK (semente de trabalho) foi inoculada nas garrafas *Roller* em intervalos de incubação regulares, sendo 7mL da semente por garrafa, com um título de $10^{7,25}$ DICT₅₀/mL. As garrafas foram incubadas em estufa à $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e as coletas foram realizadas conforme a figura 4. As alíquotas foram armazenadas em criotubos de 3mL, sendo 4 a 5 alíquotas de cada coleta e congeladas a -80°C . Em seguida, esses criotubos foram armazenados em nitrogênio líquido à -196°C até o uso.

MÉTODO A			MÉTODO B		
INOCULAÇÃO DE CÉLULAS + VÍRUS SIMULTÂNEA			MONOCAMADA CÉLULAS + VÍRUS		
1,5 x 10 ⁶ CÉLULAS	3,0 x 10 ⁶ CÉLULAS	4,5 x 10 ⁶ CÉLULAS	1,5 x 10 ⁶ CÉLULAS	3,0 x 10 ⁶ CÉLULAS	4,5 x 10 ⁶ CÉLULAS
48h	48h	48h	48h	48h	48h
72h	72h	72h	72h	72h	72h
96h	96h	96h	96h	96h	96h
120h	120h	120h	120h	120h	120h

Figura 4- Desenho esquemático representando as diferentes condições de cultivo analisadas neste estudo. A figura representa desde a inoculação das células CRFK na garrafa *Roux*, a tripsinização das células e os repiques nas garrafas *Roller*, e os dois métodos utilizados, sendo o método A – inoculação das células e da semente vacinal simultânea e método B – formação da monocamada de células durante 72h e posterior inoculação da semente vacinal nas garrafas *Roller*. Nos dois métodos havia quantidades distintas de células. As coletas foram realizadas às 48h, 72h, 96h e 120h após a inoculação da semente VR-953™

3.9 – ANÁLISE DA CINÉTICA DE REPLICAÇÃO DO CPV-2

3.9.1 – Através da PCR em tempo real

Para quantificar a carga viral (qPCR) de DNA do CPV-2, realizou-se prova de PCR em tempo real das alíquotas de suspensões vacinais mantidas congeladas, nas condições distintas de cultivo e coleta descritas no item 3.9.

Os protocolos de reação e ciclagem utilizados foram os mesmos descritos no item 3.4.2. A quantificação absoluta foi estabelecida com base na curva padrão com cinco alíquotas em diluições seriadas na escala 1:10, a partir do produto amplificado de 100ng. O cálculo do número de cópias e os parâmetros analisados foram os mesmos descritos no item 3.6.

Amostras extraídas com um número de cópias acima de 100ng foram diluídas 1:10 ou 1:100 em água estéril e novamente testadas. O fator de diluição foi levado em consideração para o cálculo do número de cópias da amostra.

3.9.2 – Através do Cálculo do Título Infeccioso

Para o cálculo do título infeccioso do CPV-2, placas de 96 orifícios e fundo chato foram utilizadas e cada amostra foi submetida a 8 diluições seriadas na base 10, sendo adicionado para cada diluição 0,5mL da amostra e mais 4,5mL de meio essencial mínimo (MEM). Em cada placa foram utilizadas duas colunas para o controle de células, uma coluna para o controle positivo (vacina com título conhecido) e uma coluna para o controle negativo.

Posteriormente, 50µL de cada diluição foram inoculados em mais 100µL de células CRFK na concentração de $3,0 \times 10^5$ células/mL, iniciando-se pela maior diluição. As placas foram incubadas em estufa à 37°C e 3-6% de CO₂, durante 5 dias. Após esse período, as placas foram congeladas em freezer -20°C por no mínimo 24h.

Placas de fundo “V” foram lavadas adicionando-se 150µL de MEM em cada orifício, dispensando-o em seguida. Enquanto isso, as placas de fundo chato contendo as amostras

testadas foram descongeladas, e transferiu-se 50 μ L de células mais vírus para as placas com fundo “V”, iniciando da maior diluição (figura 5).

Hemácias de suíno coletadas em solução Alsever e estocadas à 4°C por no mínimo 24h, e não mais que 7 dias antes do uso foram lavadas 3 vezes em PBS (0,015M de fosfato, 0,9% NaCl, pH 7,0) e ressuspensas em PBS contendo 0,1% de soro-albumina bovina. Em seguida, 50 μ L de hemácias à 0,3% foram adicionadas em cada orifício, agitando suavemente. As placas com fundo “V” foram tampadas e refrigeradas entre 2 e 8°C por 12h, para posterior leitura e interpretação dos resultados. As amostras foram consideradas positivas quando houve a aglutinação das hemácias, e negativas quando não ocorreu a aglutinação e as hemácias se depositaram no fundo da placa, formando um pequeno “botão”. A dose infectante em 50% da cultura de tecidos (DICT₅₀) foi calculada utilizando-se a fórmula de Reed & Muench (1938).

Figura 5 - Foto das placas durante o cálculo do título infeccioso. À esquerda mostrando as células antes da adição das hemácias. À direita a placa após a adição das hemácias de suíno a 0,3%

3.10 – CORRELAÇÃO ENTRE O CÁLCULO DO TÍTULO INFECCIOSO E O NÚMERO DE CÓPIAS DE DNA POR PCR EM TEMPO REAL

Para investigar a correlação entre o número de cópias de DNA e o título infeccioso de cada suspensão vacinal analisada, esses valores foram convertidos em $\log_{10}$ e, em seguida, foram comparados entre si usando o teste do Coeficiente de Correlação de Pearson, através do programa de análise estatística Minitab 15.

Para comparar os dois métodos de cultivo celular (método A – inoculação simultânea das células CRFK e do vírus vacinal; método B – formação da monocamada de células e posterior infecção com o vírus vacinal), utilizou-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney, através do mesmo programa estatístico acima citado.

RESULTADOS

4– RESULTADOS

4.1 – PADRONIZAÇÃO, APLICAÇÃO E SENSIBILIDADE ANALÍTICA DA PCR

A PCR padronizada neste estudo foi capaz de detectar bandas positivas no gel de agarose corado por brometo de etídio. Os produtos de PCR obtidos das suspensões vacinais de 1 a 15 são mostrados na figura 6.

As amostras de suspensão vacinal analisadas apresentaram um claro e semelhante padrão de banda de aproximadamente 900pb. As amostras de 15 e 16 referem-se aos controles positivo e negativo, respectivamente. Nenhuma banda foi observada quando utilizada a água estéril como controle negativo, assim como não se observou a presença de bandas inespecíficas durante nenhuma corrida.

Figura 6 - PCR das suspensões vacinais (SV) coletadas em diferentes momentos de produção da vacina.

Amostras 1, 2, 3 e 4: $1,5 \times 10^9$ células, inoculação simultânea de células e SV, 48, 72, 96 e 120h depois, respectivamente. Amostras 5, 6, 7 e 8: 3×10^9 células, formação da monocamada e posterior infecção, 48, 72, 96 e 120h depois. Amostras 9, 10, 11 e 12: $4,5 \times 10^9$ células, formação da monocamada e infecção viral, 48, 72, 96 e 120h depois. Amostras 13, 14: 3×10^9 células, inoculação simultânea de células e vírus, 72 e 120h depois. Amostra 15 – vacina Recombitek®. Amostra 16 – controle negativo (água estéril)

A sensibilidade analítica da PCR está representada na figura 7. Bandas específicas foram visualizadas até a diluição de 10^{-4} . Como a amostra amplificada apresentou um título infeccioso de $10^{6,66}$ DICT₅₀/mL, consequentemente o limiar de detecção foi de 457DICT₅₀/mL, o que parece indicar uma boa sensibilidade analítica, possibilitando a utilização desta PCR para o diagnóstico de CPV-2 em amostras clínicas.

Figura 7 - Sensibilidade analítica da PCR realizada de uma suspensão vacinal com título de $10^{6,66}$ DICT₅₀/mL. A figura mostra o perfil das bandas no gel de agarose, visíveis até a diluição 10^{-4} . L: marcador de peso molecular de 100 a 1000pb; CP: controle positivo; P: amostra pura; CN: controle negativo

4.2 – REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO

A reação de sequenciamento confirmou a identidade da amostra vacinal do Laboratório Biovet como sendo de Parvovírus Canino tipo 2. A similaridade dos nucleotídeos e aminoácidos da região parcialmente sequenciada do gene VP2 variou entre 96,8% e 98,9% com as variantes CPV-2a, 2b e 2c e entre e 99,4% e 100% com o isolado YB8301, proveniente da China. Um dos eletroferogramas gerados na reação de sequenciamento utilizando os *primers* CPV-Pa e CPV-Pb é mostrado na figura 8.

Figura 8 - Eletroferograma gerado em uma das reações de seqüenciamento do *primer* anti-senso CPV-Pb. A qualidade foi avaliada usando o programa Phred-Phrap. Verificou-se a presença de picos homogêneos e ausência de picos sobrepostos, os quais ocorreram apenas no início e final da reação, porém foram desconsiderados, gerando assim o fragmento de 757pb

A amostra vacinal VR-953^{TM} apresentou um baixo grau de variação molecular nesta região, o que impossibilitou a verificação de diferenças filogenéticas entre a amostra vacinal e as variantes antigênicas CPV-2a, 2b e 2c, quando comparada com as cepas do CPV-2 depositadas no GenBank.

4.3 – PADRONIZAÇÃO E APLICAÇÃO DA PCR EM TEMPO REAL

A análise do fragmento de 119 pb no BLAST e o posterior alinhamento deste fragmento com outras 170 amostras de CPV-2 depositadas no GenBank pelo ClustalW do BioEdit mostrou que 93,53% das amostras (159/170) não apresentaram nenhum SNP, 5,88% amostras (10/170) apresentaram um SNP e 0,59% (1/170) apresentou dois SNP, indicando um potencial uso dos *primers* e sondas (Assign-by-design) encomendados no diagnóstico de amostras clínicas, além do uso para detecção e quantificação do CPV-2 em cultivo celular. Os números de acesso dessas amostras são mostrados no quadro 7.

Presença de SNP	AB437434	EU914139	FJ197846	GQ169552	GU212791
	AJ698134	FJ011098	FJ222824	GU212790	GU212792*
	AJ002927	FJ005212	FJ005265	GQ857611	GU569948
Ausência de SNP	AY262281	FJ005215	FJ011097	GQ857612	HM236023
	AY742942	FJ005217	FJ197837	GQ857613	HM236024
	DQ025989	FJ005219	FJ222821	GQ857614	HM236025
	DQ025990	FJ005220	FJ265775	GQ865518	HM236026
	DQ025991	FJ005222	FJ265778	GQ865519	HM236027
	DQ025994	FJ005223	FJ265779	GU362932	HM236028
	DQ182620	FJ005224	FJ265781	GU362933	HM236029
	DQ340404	FJ005225	FJ265782	GU362934	HM236031
	DQ340405	FJ005226	FJ265783	GU362935	HM236032
	DQ340406	FJ005227	FJ265784	GU380298	HM236034
	DQ340407	FJ005228	FJ869122	GU380299	HM236035
	DQ340408	FJ005229	FJ869123	GU380300	HM236036
	DQ340409	FJ005230	FJ869124	GU380301	HM236037
	EU659116	FJ005232	FJ869128	GU380302	HM236038
	EU659117	FJ005234	GQ169553	GU380303	HM236039
	FJ005195	FJ005235	GQ379048	GU380304	HM236040
	FJ005196	FJ005237	GQ379049	GU452713	HM236041
	FJ005197	FJ005238	GQ857596	GU452714	HM236042
	FJ005198	FJ005239	GQ857598	GU452715	HM236043
	FJ005199	FJ005241	GQ857599	GU569936	HM236044
	FJ005200	FJ005242	GQ857600	GU569937	HQ025913
	FJ005201	FJ005244	GQ857601	GU569938	HQ694567
	FJ005202	FJ005245	GQ857602	GU569939	HQ883267
	FJ005203	FJ005246	GQ857603	GU569940	HQ883271
	FJ005204	FJ005247	GQ857604	GU569941	HQ883273
	FJ005205	FJ005249	GQ857605	GU569942	JF795452
	FJ0052106	FJ005257	GQ857606	GU569943	JF795453
	FJ005207	FJ005260	GQ857607	GU569944	JF795454
	FJ005208	FJ005261	GQ857608	GU569945	
	FJ005210	FJ005262	GQ857609	GU569946	
	FJ005211	FJ005263	GQ857610	GU569947	

*GU212792: única amostra que apresentou 2 SNP

Quadro 8 - Números de acesso das amostras de CPV-2 que apresentaram ou não um SNP quando alinhadas com o fragmento de 119 pb da PCR em tempo real

Conforme o esperado, o sistema TaqMan padronizado neste estudo foi capaz de detectar a carga viral de DNA do CPV-2 em todas as suspensões vacinais analisadas em diferentes condições de cultivo. Os valores obtidos serão mostrados no item 4.7.

4.4 – CONSTRUÇÃO DA CURVA PADRÃO PARA QUANTIFICAÇÃO DE DNA DO CPV-2

Foi possível clonar o produto amplificado de 897pb. A figura 9 mostra o gel contendo o inserto e o plasmídeo após a clonagem e antes da linearização usando as enzimas *Bam*HI e *Eco*RI.

Figura 9- PCR realizada antes da digestão e linearização do plasmídeo com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Eco*RI. L: marcador de peso molecular de 100pb. C1 e C2: inserto mais plasmídeo. O tamanho das bandas ficou em torno de 1000pb.

O tamanho do inserto ficou próximo de 1000pb devido à região do sítio múltiplo de clonagem do plasmídeo pTZ57R/T. Antes da linearização do plasmídeo com as enzimas de restrição, o clone foi quantificado em Nanodrop, obtendo-se 98,5ng/μL, abaixo do desejado (100ng).

Por esse motivo, foram realizadas outras três tentativas de linearização do plasmídeo para se obter um maior volume do clone, que por sua vez foi submetido à purificação, conforme descrito no item 3.5.1. No entanto, ao quantificar novamente em Nanodrop, a solução de estoque obtida não alcançou 100ng/μL necessários para obtenção da curva padrão.

Dessa forma, optou-se por utilizar um produto de PCR quantificado em espectrofotômetro e diluído até a concentração de 100ng como padrão de quantificação (produto de referência) para a curva padrão.

Para a quantificação absoluta do genoma viral, a curva padrão foi desenhada a partir dos valores de C_T versus o Log_{10} das concentrações do produto de referência. Foi encontrada uma relação linear entre o Log do número de cópias inicial do DNA alvo e os valores de C_T , admitindo assim a interpolação da concentração inicial do CPV-2 (carga viral) das amostras contendo quantidades desconhecidas de DNA.

4.5 – VALIDAÇÃO DA PCR EM TEMPO REAL

4.5.1 – Precisão Intra e Inter-ensaio

De acordo com o esperado, a PCR em tempo real foi altamente precisa e reprodutível. A precisão intra-ensaio (repetibilidade) para o gene VP2 teve um CV=0,43% (Figura 10 e Tabela 1), comparativamente maior que a precisão inter-ensaio (reprodutibilidade), com CV=0,29% (Tabela 2). Ainda que a diferença entre os CV intra e inter-ensaio seja pequena, o esperado seria que o inter-ensaio apresentasse um CV maior que o intra-ensaio, visto que o primeiro foi realizado em dias diferentes. Esse achado pode ser atribuído à variação de pipetagem durante a execução de uma prova considerada altamente sensível como a PCR em tempo real.

Figura 10 - Curva de monitoramento da fluorescência (ΔRn) em função do número de ciclos que ilustram a detecção do gene VP2 do capsídeo do CPV-2 e das cinco amostras de suspensão vacinal dispostas em triplicatas. Limiar (*Threshold*) arbitrariamente estabelecido de 0,08574 na fase exponencial da curva. Precisão intra-ensaio com coeficiente de variação (CV) = 0,43%

Tabela 1 - Valores do “ciclo de limiar” (*Threshold cycle* - C_T) de cinco suspensões vacinais (SV) VR-953™ dispostas em triplicatas. *Threshold* arbitrariamente estabelecido de 0,08574 na fase exponencial da curva. Precisão intra-ensaio com coeficiente de variação (CV%) = 0,43%.

	SV 1	SV 2	SV 3	SV 4	SV 5
C_T	12,97	13,20	13,09	13,16	13,27
	13,17	13,21	13,18	13,22	13,25
	13,08	13,15	13,16	13,31	13,22
Média $\pm$	13,07 $\pm$	13,17 $\pm$	13,14 $\pm$	13,23 $\pm$	13,25 $\pm$
Desvio padrão	0,101	0,031	0,048	0,077	0,029
CV%	0,77	0,23	0,36	0,58	0,22

Tabela 2 - Valores de C_T de cinco diferentes ensaios da suspensão vacinal (SV) VR-953™ disposta em triplicatas, referente à detecção do gene do capsídeo da proteína VP2 do CPV-2. *Threshold* arbitrariamente estabelecido de 0,187728 na fase exponencial da curva. Precisão inter-ensaio com coeficiente de variação (CV%) = 0,29%.

	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5
C_T	14,25	15,16	15,15	15,46	15,63
	14,38	15,20	15,20	15,51	15,56
	14,30	15,22	15,18	15,50	15,64
Média ±	14,31±	15,19±	15,18±	15,49±	15,61±
Desvio-padrão	0,092	0,041	0,030	0,038	0,019
CV%	0,64	0,27	0,20	0,24	0,12

4.5.2 – Sensibilidade Analítica da PCR em Tempo Real

O ensaio da sensibilidade analítica mostrou linearidade em toda a faixa de quantificação. Nas diluições seriadas na escala de 1:10, a partir da concentração de 100ng do produto amplificado, observou-se que as diferenças entre os C_T das curvas mantiveram-se em valores próximos de 3,3 até a diluição de 10^{-8} , apresentando 10^{-6} ng (1fg) ou 1030 cópias de DNA do CPV-2 (Tabela 3).

O valor da inclinação (*slope*) da curva padrão de regressão linear foi de -3,36 com uma eficiência de reação de 99,4% (Figuras 11 e 12). Duas amostras de suspensão vacinal analisadas nessa reação apresentaram valores de C_T de $19,43 \pm 0,062$ e $21,73 \pm 0,184$, correspondendo à 87,93ng e 19,37ng, respectivamente.

Tabela 3 - Avaliação da sensibilidade analítica da técnica de PCR em tempo real para a detecção do gene VP2.

Número de cópias de CPV-2 presente na amostra testada calculado a partir da concentração (em ng) do produto amplificado de referência.

Diluição	Massa	Número de cópias
10^0	100 ng	$1,03 \times 10^{11}$
10^{-1}	10 ng	$1,03 \times 10^{10}$
10^{-2}	1 ng	$1,03 \times 10^9$
10^{-3}	10^{-1} ng	$1,03 \times 10^8$
10^{-4}	10^{-2} ng	$1,03 \times 10^7$
10^{-5}	10^{-3} ng	$1,03 \times 10^6$
10^{-6}	10^{-4} ng	$1,03 \times 10^5$
10^{-7}	10^{-5} ng	$1,03 \times 10^4$
10^{-8}	10^{-6} ng	$1,03 \times 10^3$
10^{-9}	Não houve manutenção da linearidade	

Figura 11. Avaliação da sensibilidade analítica para a detecção do gene VP2 da proteína do capsídeo do CPV-2.

Curvas de monitoramento da fluorescência (ΔRn) em função do número de ciclos que ilustram a amplificação em tempo real de moléculas de DNA do CPV-2 presentes nas amostras testadas. Nove alíquotas de concentrações conhecidas em diluições na escala 1:10 a partir do produto amplificado de referência. Em destaque (setas), amplificações de suspensões vacinais. *Threshold* arbitrariamente estabelecido de 0,343268 na fase exponencial da curva.

Figura 12 - Avaliação da sensibilidade analítica da técnica de PCR em tempo real. Curva padrão de regressão linear referente à detecção do gene VP2 da proteína do capsídeo do CPV-2. Nove alíquotas em diluições seriadas na escala 1:10 de concentrações conhecidas em ng do produto amplificado (abscissa) e o Ciclo de *Threshold* de cada amostra (ordenada). Amostras de suspensão vacinal apresentaram 87,93ng (seta verde) e 19,43ng (seta preta)

Nas diluições acima de 10^{-8} (10^{-9} e 10^{-10}), não houve manutenção da faixa de linearidade observada anteriormente nas figuras 11 e 12, sendo assim consideradas abaixo do limite de detecção da técnica (Figura 13). Nas diluições 10^{-9} e 10^{-10} observou-se valores de C_T 33,8 e 36,154, respectivamente. O valor da inclinação (*slope*) da curva padrão de regressão linear foi de -2,972 com uma eficiência de reação de 117,013 (Figura 15).

Figura 13 - Curvas de monitoramento da fluorescência (ΔRn) em função do número de ciclos que ilustram a amplificação em tempo real de moléculas de DNA do CPV-2 presentes nas amostras testadas. Em destaque (setas) amplificação referente às diluições 10^{-9} e 10^{-10} . *Threshold* arbitrariamente estabelecido de 0,343268 na fase exponencial da curva

Figura 14 - Curva-padrão de regressão linear referente à detecção do gene VP2 da proteína do capsídeo do CPV-2. Diluições 10^{-9} e 10^{-10} de concentrações conhecidas em ng do produto amplificado de referência (abscissa) e C_T de cada amostra (ordenada).

4.5.3 – Especificidade Analítica da PCR em Tempo Real

Conforme o esperado, suspensões vacinais contendo DNA do Adenovírus canino tipo 1 e 2 não amplificaram (Figura 15), assim como o DNA do gene da glicoproteína B do Herpesvírus equino tipo 1. Para a vacina contendo o FPV (Felocell®) houve amplificação do DNA viral. Isso era esperado, devido à semelhança entre o CPV-2 e o FPV. Essa vacina também amplificou na PCR convencional.

Foi confirmada a especificidade analítica dos *primers* e sonda para o gene VP2 padronizados neste estudo para outras vacinas contendo o CPV-2, além da vacina Immunovet®, visualizando-se curvas de amplificação com valores de $C_T < 35$ (Figura 15).

Figura 15 - Curvas de monitoramento da fluorescência (ΔRn) em função do número de ciclos ilustrando a amplificação em tempo real de moléculas de DNA do CPV-2 da vacina Immunovet® (seta amarela, $C_T=13,83 \pm 0,09$), da vacina Duramune® (seta preta, $C_T= 9,32 \pm 0,047$), da vacina Nobivac® Puppy (seta vermelha, $C_T=12,04 \pm 0,024$) e da vacina Recombitek® (seta azul, $C_T=12,19 \pm 0,041$). Não houve curva de amplificação do DNA do Adenovírus canino tipo 1 e 2 (seta verde, $C_T=34,845 \pm 0,125$), os quais não foram detectados. *Threshold* arbitrariamente estabelecido de 0,115562 na fase exponencial da curva

4.6 – ANÁLISE DA CINÉTICA DE REPLICAÇÃO DO CPV-2 EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO ATRAVÉS DE PCR EM TEMPO REAL

Para avaliar a cinética de replicação do CPV-2, o número de cópias de DNA foi obtido através da PCR em tempo real, em diferentes condições de cultivo em células CRFK mantidas em garrafas tipo *Roller*, em que se variou a quantidade de células por garrafa e o método de infecção dessas células com o vírus vacinal apresentando o mesmo título para os dois métodos.

Um dos gráficos de amplificação das suspensões vacinais em diferentes condições de cultivo celular está demonstrado na figura 16. A curva padrão é apresentada na figura 17. O mesmo valor de *Threshold* foi estabelecido para todas as análises.

Figura 16 - Curvas de amplificação do DNA do CPV-2 mostrando o padrão de cada sequência e o aumento do sinal fluorescente versus o número de ciclos durante um ensaio de PCR em tempo real. Os valores de C_T foram calculados automaticamente, determinando-se o ponto no qual a fluorescência excedeu o valor fixado de *Threshold*

Figura 17 - Curva padrão para o DNA de CPV-2, mostrando o valor de C_T versus o número de cópias/μL de DNA. Para a curva padrão foi utilizado um produto amplificado de referência com 100ng/μL. Os valores de carga viral das suspensões vacinais com valor desconhecido foram determinados pelo *software* detector de sequências StepOne, interpolando-os na curva padrão

Para a quantificação absoluta da carga viral, a curva padrão foi desenhada a partir dos valores de C_T versus o log₁₀ das concentrações padrão encontradas. Houve uma correlação linear altamente significativa entre o log₁₀ do número de cópias inicial do DNA alvo e os valores de C_T, admitindo-se assim a interpolação da concentração conhecida do CPV-2 (carga viral) com as suspensões vacinais contendo quantidades desconhecidas de DNA do CPV-2.

Nas reações mostradas nas figuras 16 e 17, as curvas de amplificação do produto de PCR de 100ng mostraram valores de C_T médios variando entre 19,19 e 15,08. O número de cópias de DNA das suspensões vacinais contendo quantidades diferentes de células CRFK e nos dois métodos de cultivo, variou entre 2,7x10¹¹ e 39,15x10¹¹, correspondendo à 11,43 cópias/mL e 12,59 cópias/mL, respectivamente.

4.7 – CORRELAÇÃO ENTRE O CÁLCULO DO TÍTULO INFECCIOSO E O NÚMERO DE CÓPIAS DE DNA POR PCR EM TEMPO REAL

Para verificar a existência de correlação entre a PCR em tempo real e o cálculo do título infeccioso, os resultados obtidos nessas duas técnicas foram comparados entre si usando o Coeficiente de Correlação de Pearson, conforme descrito no item 3.10.

A comparação entre os valores obtidos no cálculo do título infeccioso e o número de cópias de DNA, juntamente com os valores dos Coeficientes de Variação das triplicatas na PCR em tempo real, são mostrados nas tabelas 4 e 5.

Tabela 4 - Número de células CRFK em cada garrafa *Roller*, tempos de coleta em horas, cálculo do título infeccioso (DICT₅₀/mL) expresso em Log₁₀ das suspensões vacinais coletadas após a inoculação simultânea da VR-953™ e das células CRFK nas garrafas *Roller*, número de cópias de DNA/mL expresso em Log₁₀ e o Coeficiente de Variação (CV%) das triplicatas.

A – Inoculação simultânea do vírus + células				
Nº Células por <i>Roller</i>	Tempos	Título Infeccioso (DICT ₅₀ /mL) (log ₁₀)	PCR em Tempo Real	
			Nº Cópias/mL (log ₁₀)	CV%
1,5x10 ⁹	48h	5,80	13,19	0,42
	72h	5,57	12,97	0,48
	96h	5,66	12,87	1,24
	120h	5,80	13,42	0,57
3,0x10 ⁹	48h	5,50	13,10	0,44
	72h	5,50	13,13	4,64
	96h	5,20	13,17	3,57
	120h	5,50	13,51	1,63
4,5x10 ⁹	48h	6,00	12,83	0,30
	72h	6,20	12,94	2,70
	96h	5,80	13,62	0,45
	120h	4,50	13,36	1,87

Tabela 5 - Número de células CRFK em cada garrafa *Roller*, tempos de coleta em horas, cálculo do título infeccioso ($\text{DICT}_{50}/\text{mL}$) expresso em Log_{10} das suspensões vacinais coletadas após a infecção da monocamada de células pré-estabelecida com a VR-953™, número de cópias de DNA/mL expresso em log_{10} e o Coeficiente de Variação (CV%) das triplicatas.

B – Formação da monocamada de células e posterior infecção viral				
Nº Células por <i>Roller</i>	Tempos	Título Infeccioso ($\text{DICT}_{50}/\text{mL}$) (log_{10})	PCR em Tempo Real	
			Nº Cópias/mL (log_{10})	CV%
1,5x10 ⁹	48h	7,50	13,90	0,13
	72h	5,80	14,05	2,28
	96h	5,80	13,97	1,00
	120h	6,00	13,79	0,32
3,0x10 ⁹	48h	7,50	14,59	0,47
	72h	6,60	14,45	2,28
	96h	7,33	14,58	0,06
	120h	7,50	14,49	1,03
4,5x10 ⁹	48h	7,33	13,59	3,09
	72h	6,57	14,54	1,10
	96h	5,80	14,56	1,10
	120h	5,57	14,39	2,29

As tabelas 4 e 5 mostram que os Coeficientes de Variação (CV%) de todas as triplicatas ficaram abaixo de 5%, sendo que os maiores valores de CV% alcançados ocorreram para as triplicatas contendo 3x10⁹ células/*Roller* coletas 72 e 96h após a infecção do cultivo no método A (CV%=4,64 e 3,57, respectivamente), e para as triplicatas contendo 4,5x10⁹ células/*Roller* coletas com 48h após a infecção do cultivo no método B (CV%=3,09). Essa variação pode ser explicada principalmente por falhas na pipetagem. No entanto, um CV menor que 5% pode ser considerado um resultado satisfatório.

Ao comparar os valores do título infeccioso e o número de cópias na PCR em tempo real através do teste de Correlação de Pearson, o coeficiente de correlação (r) obtido foi 0,55, num intervalo de confiança de 95,4%. Segundo Santos (2007), o coeficiente de correlação $r = 0,55$ indicou que houve uma correlação moderadamente positiva entre o título infeccioso e o número de cópias de DNA.

Para avaliar o número de cópias obtido durante a replicação da semente vacinal nas diferentes condições de cultivo, os gráficos gerados são apresentados na figura 18.

Figura 18- Representação gráfica da cinética de replicação da semente vacinal nos diferentes momentos de coleta, comparando o método A de inoculação simultânea das células CRFK e da semente vacinal, com o método B onde a monocamada previamente formada foi infectada com a semente vacinal (não simultânea). Gráfico 1: $1,5 \times 10^9$ células/Roller. Gráfico 2: $3,0 \times 10^9$ células/Roller. Gráfico 3: $4,5 \times 10^9$ células/Roller

Ainda que a quantidade de células tenha variado, os gráficos demonstraram que mesmo variando a quantidade de células, o método B foi o que apresentou o maior número de cópias de DNA do CPV-2, quando comparado ao método A, em todos os períodos coletados.

Para confirmar se houve diferença significativa entre os dois métodos de cultivo A e B em relação ao número de cópias de DNA e ao título infeccioso, utilizou-se o teste de comparação de médias de Mann-Whitney. Para o número de cópias de DNA, houve diferença significativa entre os métodos de cultivo ($p=0,0001$). Para o título infeccioso, também houve diferença significativa entre os métodos de cultivo ($p=0,0020$). Os valores de média obtidos seguem na tabela 6.

Tabela 6 – Valores de média ao comparar o número de cópias de DNA entre os dois métodos de cultivo A e B, e ao comparar o título infeccioso entre os métodos de cultivo A e B, analisados no teste comparativo de Mann-Whitney.

Parâmetro	Nº cópias/mL		Título Infeccioso (DICT50/mL)	
	Método A	Método B	Método A	Método B
Média	5,615 ^a	6,585 ^b	13,150 ^c	14,420 ^d
Valor de P	0,0020		0,0001	

a e b: estatisticamente diferentes entre si

c e d: estatisticamente diferentes entre si

Diante desses resultados, foi possível verificar que o método B, no qual se aguardou a formação da monocamada de células nas garrafas *Roller* por um período de 72h, e em seguida infectou-se a monocamada com a semente vacinal, foi o método de cultivo que apresentou os maiores valores médios no número de cópias de DNA do CPV-2 e no título infeccioso, quando comparado ao método de cultivo A.

DISCUSSÃO

5– DISCUSSÃO

5.1 – Caracterização da Amostra Vacinal

A aplicação da técnica de PCR dirigida ao gene VP2 utilizando os *primers* CPV-2a e 2b sintetizados permitiu a identificação e análise das sequências da amostra vacinal VR-953™. Os produtos amplificados apresentaram bandas únicas, o que corrobora as informações de Rosseti, Silva e Rodrigues (2006), afirmando que o desenho do *primer* é fundamental para o sucesso da PCR, e que o par de *primers* ideal para uma reação de PCR é aquele que anela a uma única sequência-alvo e não a outras regiões do DNA.

Não foi possível verificar diferença perceptível no tamanho das bandas ao analisar amostras dos diferentes métodos de cultivo empregados nesse estudo, mostrando que a PCR convencional não é uma prova de eleição para se tentar quantificar o DNA viral. Isso concorda com o relato de Baigent et al. (2005) que analisando o vírus da doença de Marek, afirmaram que a técnica de PCR representa uma maneira rápida e sensível de inferir o DNA viral a partir de uma ampla variedade de tecidos, mas não demonstra o número de células infectadas ou mesmo o número de genomas virais no interior de uma célula infectada.

Schunck, Kraft e Truyen (1995), verificaram que um par de *primers* ótimo codificando uma pequena região do genoma (cerca de 220pb) em condições favoráveis ao anelamento sob altas temperaturas, demonstrou ser um fator crucial na PCR. No entanto, verificou-se no presente estudo que apesar do tamanho relativamente grande do fragmento amplificado pelos *primers* CPV-Pa e CPV-Pb (897pb), eles amplificaram de forma eficiente. Uma hipótese para isso pode ser o fato dos *primers* terem sido sintetizados a partir de uma região altamente conservada do gene VP2 da proteína do capsídeo do CPV-2, o que foi confirmado pelo sequenciamento.

Os *primers* CPV-Pa e CPV-Pb amplificaram o DNA do FPV presente na vacina Felocell®. Isso pode ser explicado pela alta similaridade entre o CPV-2 e FPV, de acordo com o relato de Truyen et al. (2005). Além disso, no registro da semente vacinal VR-953™ consta a informação de que a mesma é indistinguível do FPV (APPEL, 1979; CARMICHAEL, 1981).

A técnica de sequenciamento de DNA consiste na identificação da sequência de bases de um determinado fragmento de DNA e pode ser realizada para confirmar determinado gene isolado ou amplificado (ROSSETI; SILVA; RODRIGUES, 2006). Nesse estudo, a reação de sequenciamento parcial da proteína VP2 do capsídeo confirmou a identidade da amostra vacinal VR-953™, a qual mostrou baixo índice de variação na região sequenciada, insuficiente para verificar diferenças filogenéticas entre os subtipos antigênicos (CPV-2a, 2b e 2c).

A confirmação da identidade da amostra e da baixa variabilidade genética na região alvo, ou seja, 6,47% neste estudo, também foi fundamental para a padronização da PCR em tempo real usando o sistema TaqMan, que é considerado altamente específico. Isso é reforçado pelo trabalho de Decaro et al. (2006) ao testarem a habilidade de sondas MGB em diferenciar os subtipos CPV-2, 2a, 2b e 2c, os quais diferem entre si por poucas substituições de aminoácidos (PARRISH et al., 1988), sobretudo o CPV-2c que possui apenas uma substituição (T→A) (BUONAVOGLIA et al., 2001), ou seja, um único nucleotídeo polimórfico (SNP). Esses autores verificaram que sondas MGB permitiram uma identificação direta e confiável das variantes do CPV-2, confirmando a especificidade do sistema TaqMan.

Embora esse estudo tenha sido conduzido apenas em amostras de cultivo celular, nas quais a quantidade de inibidores da reação de PCR provavelmente é menor do que em amostras de campo, sobretudo em amostras de fezes que geralmente são as mais utilizadas, a possibilidade de utilização desta PCR em tempo real para o diagnóstico do CPV-2 é um achado importante, corroborando os trabalhos de outros autores (SENDA et al., 1995; HIRASAWA; YONO; MIKAZUKI, 1996; DESARIO et al., 2006; PÉREZ et al., 2007; STROTTMANN et al., 2008).

Essa foi a primeira caracterização molecular da semente VR-953™ da vacina Imunovet® e representa uma importante contribuição para pesquisas futuras.

5.2 – PCR em Tempo Real

Para o diagnóstico do Parvovírus canino, inúmeras técnicas de amplificação de ácidos nucléicos para a detecção do CPV-2 principalmente em amostras de fezes de cães suspeitos têm sido descritas (ÇARMICHAEL, 1980; PEREIRA, 1997; DECARO et al., 2005, 2006, 2007a, b; DESARIO et al., 2005; ELIA et al., 2007; KUMAR; NANDI, 2010). Porém, não

são freqüentes trabalhos que analisem a cinética de replicação do CPV-2 em diferentes condições de cultivo celular através da técnica de PCR em tempo real.

Nesse estudo, uma PCR em tempo real baseada no sistema TaqMan foi padronizada para a quantificação da carga viral do Parvovírus canino em diferentes condições de cultivo de células da linhagem CRFK. Essa técnica demonstrou ser uma ferramenta molecular sensível e complementar para a quantificação do CPV-2 em suspensões vacinais durante as etapas de produção da vacina Imunovet®.

Outra vantagem da PCR em tempo real consiste no tempo de execução da prova. Segundo Perkins et al. (2008), a técnica de PCR em tempo real quantitativa (qPCR) pode ser realizada em cerca de 6 horas, incluindo o preparo do mix, e testes usando o sistema TaqMan com reagentes chamados *fast* são considerados valiosos, uma vez que levam 35 minutos para gerar a curva de amplificação da amostra analisada. Por causa do custo, nesse trabalho foi usado o sistema chamado de *standard*, cujo tempo de corrida foi de 95 minutos, o que ainda assim pode ser considerado um tempo curto quando comparado a outras provas (Elisa, PCR, HI, entre outros). A PCR em tempo real utilizando *primers* e sondas *fast* é mais rápido, porém ainda apresenta um custo alto, dependendo do objetivo analisado.

Foi possível o processamento simultâneo de várias amostras pela PCR em tempo real. A prova foi realizada em placas de 48 orifícios e muitos passos da mesma foram automatizados. O tempo de realização da PCR em tempo real, desde o preparo do mix até o final da curva de amplificação, foi cerca de 3 horas.

A sensibilidade analítica da PCR em tempo real apresentou um limite de detecção de 1030 cópias de DNA. Os Coeficientes de Variação obtidos no intra e inter-ensaio foram satisfatoriamente baixos, o que garantiu a repetibilidade e qualidade da prova e permitiu um cálculo preciso do DNA de CPV-2. Essas achados se assemelham aos de Decaro et al. (2005) e Desario et al. (2005), que também obtiveram alta sensibilidade, reprodutibilidade e rapidez em seus experimentos, e com os achados de Heid et al. (2011) que obtiveram amplificações de PCR em triplicatas altamente reprodutíveis, demonstrando que ao comparar os valores de Desvio Padrão e Coeficiente de Variação do ciclo de *Threshold* (C_T), a PCR em tempo real apresentou uma variação baixa na análise quantitativa.

Heid et al. (2011) relataram ainda que resultados de amplificação semelhantes nas triplicatas demonstraram que o método de preparo das amostras utilizado por eles foi altamente reprodutível em relação à pureza da amostra. Isso indica que também no experimento realizado aqui, a metodologia de purificação do DNA através do Isotiocianato de

Guanidina e clorofórmio aparentemente foi eficiente, já que as triplicatas apresentaram um Coeficiente de Variação muito baixo.

A PCR em tempo real desenvolvida demonstrou-se específica na detecção de DNA do CPV-2, quando se testou amostras contendo DNA do Adenovírus canino tipo 1 e 2 e do Herpesvírus equino tipo 1, não havendo reação cruzada com esses agentes. Esses resultados se assemelham aos obtidos por Decaro et al. (2005) utilizando o Herpesvírus ovino tipo 2, e aos de Decaro et al. (2006) e Elia et al. (2007) utilizando o Adenovírus canino tipo 1 e 2 para analisar a especificidade da técnica de PCR em tempo real para a detecção e quantificação do CPV-2 em amostras de fezes. Entretanto, para reforçar a especificidade analítica da PCR em tempo real padronizada, outros agentes deverão ser analisados, sobretudo se o sistema for utilizado para diagnóstico.

Todas as reações de PCR realizadas neste estudo, seja a técnica convencional ou a PCR em tempo real, não tiveram finalidade diagnóstica, mas sim permitir a identificação e quantificação da amostra vacinal usada pelo Laboratório Biovet®. No entanto, a baixa presença de SNP no fragmento gerado pela PCR em tempo real padronizada pode ser um achado promissor para uso no diagnóstico de amostras clínicas, porém experimentos adicionais serão necessários.

5.3 – Cálculo do Título Infeccioso das Suspensões Vacinais

Assim como relatado por alguns autores sobre a importância do teste diagnóstico altamente sensível e específico para a detecção do CPV-2 em cães infectados, para estudos de distribuição epidemiológica das variantes do CPV-2, bem como para se avaliar a eficácia das vacinas disponíveis e estabelecer estratégias de controle e prevenção da parvovirose (DECARO et al., 2005; 2006a, b; 2007; DESARIO et al., 2005; VIEIRA et al., 2008; KUMAR; NANDI, 2010), a determinação precisa do número de cópias de DNA do vírus presente no cultivo celular pode ser um dado relevante ao se avaliar a produção das vacinas.

Decaro et al. (2005) relataram que muitas cepas do CPV-2 não produzem efeito citopático evidente e a presença de antígenos virais muitas vezes só pode ser evidenciada através do uso de uma técnica complementar, como a Imunofluorescência, implicando em um tempo adicional na execução da prova. Nesse estudo, devido à dificuldade de se evidenciar claramente o efeito citopático do CPV-2 vacinal, foi preciso adicionar hemácias de suíno às

placas contendo a suspensão vacinal em diluições seriadas para visualizar a aglutinação, indicando a presença do vírus. Além disso, hemácias de suíno frescas e de boa qualidade são necessárias, o que acaba se tornando um fator limitante devido ao manejo dos animais durante a coleta, o que pode interferir no coeficiente de sedimentação das hemácias, assim como relatado por Desario et al. (2005).

Após a adição das hemácias durante o cálculo do título infeccioso, verificou-se que em alguns orifícios não houve a formação evidente da hemaglutinação (Figura 19). Achados semelhantes foram encontrados por Decaro et al. (2005), que ao utilizar o HA em amostras de fezes, concluiu que essa técnica foi pouco sensível e grandes quantidades de vírus são necessárias para se determinar uma hemaglutinação visível. Além disso, a hemaglutinação incompleta pode gerar confusão no momento da leitura, principalmente nos casos em que for realizada por mais de um técnico. Corroborando essa colocação Desario et al. (2005) afirmaram que faz-se necessária a padronização efetiva dos testes laboratoriais de detecção do CPV-2 (figura 20).

Outro fato a ser destacado é que para o cálculo do título infeccioso, apenas uma amostra é analisada em cada placa de 96 orifícios, nesse trabalho em 8 diluições seriadas, porém com o inconveniente de não ser possível calcular o coeficiente de variação entre as diluições. O tempo total para a execução dessa análise ficou em torno de 8 dias, o que comparado à técnica de PCR em tempo real, apresentou um consumo de tempo muito maior, o que pode se tornar um fator limitante na rotina de trabalho em que na maioria das vezes há um grande volume de análises.

Figura 19 - Foto mostrando a leitura do título infeccioso após a adição de hemácias em cada orifício. As setas mostram orifícios onde não há formação clara nem da hemaglutinação, nem do “botão” de hemácias, claramente formado nos orifícios utilizados como controle de células (colunas 1 e 2 da esquerda)

Figura 20 – Foto ilustrando o efeito biológico “ideal” esperado quando se analisa a presença de um vírus capaz de aglutinar hemácias em cultivo celular. Os orifícios superiores mostram a ausência do vírus e a formação do “botão” de hemácias no fundo da placa. Os orifícios inferiores mostram a ligação das hemaglutininas virais à superfície das hemácias.

5.4 – ANÁLISE DA CINÉTICA DE REPLICAÇÃO DA SEMENTE VACINAL PELA PCR EM TEMPO REAL E PELO CÁLCULO DO TÍTULO INFECCIOSO

Avaliando a cinética de replicação do vírus vacinal da doença de Marek, Baigent et al.(2005) afirmaram que a quantificação da carga viral e sua relação com a proteção é exigido quando se buscam vacinas mais eficazes. Com isso em mente, um dos objetivos do presente estudo foi quantificar o DNA do CPV-2 em suspensões vacinais pela PCR em tempo real, buscando avaliar se houve interferência em relação ao número de células e o tempo de multiplicação da semente vacinal em cultivo, e se houve diferença entre o momento de infecção do cultivo celular, ou seja, inoculação simultânea das células e do vírus vacinal e a infecção depois de formada a monocamada de células.

Além disso, tentou-se avaliar a existência de correlação entre os valores obtidos no cálculo do título infeccioso com o número de cópias de DNA através da PCR em tempo real, a qual tem se tornado um ensaio importante para a análise e quantificação de ácidos nucleicos virais (MACKAY; ARDEN; NITSCHKE, 2002). Para a comparação desses dados, aplicou-se teste de Correlação de Pearson (r) avaliando se nas duas técnicas, os valores obtidos aumentariam ou diminuiriam ao mesmo tempo. Um valor de r igual a zero indica nenhuma correlação, entre 0,5 e 0,8 indica moderada correlação e $r = 1$ indica correlação perfeita (SANTOS, 2007). Como o valor de r para a correlação entre o título infeccioso e o número de cópias foi de 0,55, a correlação entre as provas foi moderada. Esse achado não se assemelha aos encontrados por Reddy, Witter e Gimeno (2000), que verificaram uma boa correlação entre a quantificação do DNA pela qPCR e o título infeccioso em fibroblastos de embrião de pato para o vírus de Marek, sugerindo que o número de cópias é uma boa medida do título viral.

Entre as hipóteses que podem explicar essa correlação moderada, algumas podem ser levantadas: (1) no cálculo do título infeccioso, podem ser formadas gotículas de água que ficam aderidas à tampa das placas durante a etapa de congelamento, que ao serem descongeladas previamente à adição das hemácias, podem ter diluído alguns orifícios, interferindo na leitura do teste; (2) viés durante a leitura do sinal biológico nos casos em que a reação de hemaglutinação não foi totalmente estabelecida, podendo as partículas virais em alguns orifícios das placas terem sido sub ou super-estimadas; (3) ainda que o cálculo do título infeccioso seja realizado em replicatas, não há como calcular o coeficiente de variação entre as diluições, diferentemente da técnica de PCR em tempo real, o que garante a repetibilidade,

precisão e confiabilidade dos resultados; (4) subjetividade do técnico durante a leitura das placas, sobretudo nos casos em que há mais de um técnico responsável no setor; (5) maior sensibilidade da técnica de PCR comparada ao cálculo do título infeccioso, nas condições analisadas.

Embora alguns autores relatem que o CPV-2 replica-se somente em células mitoticamente ativas (BASAK; COMPANS, 1989), e que após a formação da monocamada é possível que não se obtenha um número de células suficiente para suportar uma replicação viral eficiente (ÂNGELO et al., 1980; CARMICHAEL et al., 1981; PARADISO; RHODE; SINGER, 1982; STROTTMANN et al., 2008), tanto pelo título infeccioso como através da quantificação da carga viral pela PCR em tempo real, foi possível verificar que a inoculação da semente vacinal na monocamada de células previamente formada (células CRFK cultivadas durante 72h antes da infecção viral) apresentou valores mais altos do que quando as células e a semente vacinal foram inoculados simultaneamente, com uma diferença significativa entre os resultados.

Por outro lado, num trabalho realizado para detecção de Herpesvírus equino tipo 1 em suabes nasais de equinos pela PCR em tempo real, Perkins et al. (2008) relataram que a qPCR é capaz de medir apenas o número de cópias de DNA e não partículas infecciosas, e esses valores não representam o potencial de replicação viral, pois o vírus acumula muitas partículas durante sua replicação que não são incorporadas na fase final (partícula infecciosa). Essa abordagem deve ser levada em consideração durante a análise da cinética de replicação viral, sugerindo que os resultados fornecidos pela qPCR devem ser analisados com cautela.

CONCLUSÕES

6 – CONCLUSÕES

- Foi padronizada uma técnica de PCR para a detecção de DNA do CPV-2 em cultivo celular, com uma sensibilidade analítica de 457 DICT₅₀/mL.
- Foi padronizada uma técnica de PCR em tempo real usando o sistema TaqMan e sondas MGB para a detecção e quantificação do DNA do CPV-2 em cultivo celular, com uma sensibilidade analítica de 1030 cópias de DNA/mL.
- Não foi encontrada correlação fortemente positiva entre o cálculo do título infeccioso e o número de cópias de DNA na PCR em tempo real.
- Devido a baixa presença de nucleotídeos polimórficos, a PCR em tempo real padronizado pode ter potencial para uso no diagnóstico de amostras clínicas.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ACTOR, J. K. **Imunologia e Microbiologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 184p, 2007.
- AFONINA, I.A., REED, M.W., LUSBY, E., SHISHKINA, I.G., AND BELOUSOV, Y.S. Minor groove binder conjugated DNA probes for quantitative DNA detection by hybridization-triggered fluorescence. **Biotechniques** 32,940-949, 2002.
- ÂNGELO, M. J. O.; JULY, J. R.; HAGIWARA, M. K.; CARVALHO, R. P. S. Enterite hemorrágica dos cães: isolamento de provável parvovirus em culturas celulares. **In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 17**, Fortaleza, p. 41, 1980.
- APPEL, M. J et al. Isolation and immunization studies of a canine parvo-like virus from dogs with haemorrhagic enteritis. **Veterinary Records**. 105: 256-159, 1979.
- APPEL, M. J.; PARRISH, C. R. Canine parvovirus type 2. In: Virus Infections of Carnivores. **Elsevier Science Publishers**, 500p. 1987.
- APPLIED BIOSYSTEMS. Real-time PCR: understanding C_T. Tutorial Applied Biosystems, 2006. Disponível em: <http://www.appliedbiosystems.com.br>. Acesso em: 13/11/10.
- APPLIED BIOSYSTEMS. Applied Biosystems StepOne and StepOnePlus. Real-time PCR Systems. Reagent Guide, 2010. Disponível em: <http://www.appliedbiosystems.com.br>. Acesso em: 13/11/10.
- ASHIHARA, T.; BASERGA, R. In: Methods in enzymology, v. LVIII (Cell Culture), Jakoby W. B.; Pastan, I. H. **Academic Press**, New York, p. 248-262, 1979.
- ATCC. In: ATCC Quality Control Methods for Cell Lines. American Type Culture Collection, Rockville, MD, pp. 11-12, 1985. Disponível em: <http://www.atcc.org>. Acesso em 01/03/2009.
- BADGETT, M. R.; AUER, A.; CARMICHAEL, L. E.; PARRISH, C. R.; BULL, J. J. Evolutionary dynamics of viral attenuation. **Journal of Virology**. vol. 76, n. 20, p. 10524-10529, 2002.
- BAIGENT, S. J.; SMITH, L. P.; CURRIE, R. J. W.; NAIR, V. K. Replication kinetics of Marek's disease vaccine virus in feathers and lymphoid tissues using PCR and virus isolation. **Journal of General Virology**. 86, 2989–2998, 2005.
- BASAK, S.; COMPANS, R. W. Polarized entry of canine parvovirus in an epithelial cell line. **Journal of Virology**. v. 63 (7): 3164-3167, 1989.

BINN, L. N.; LAZAR, E. C.; EDDY, G. A.; KAJIMA, M. Recovery and characterization of a minute virus of canines. **Infection and Immunity** 1: 503-508, 1970.

BINN, L. N.; MARCHWICKI, R. H.; STEPHENSON, E. H. Establishment of a canine cell line: derivation, characterization and viral spectrum. **American Journal Veterinary Research** 41: 855-860, 1980

BOHM, M.; THOMPSON, H.; WEIR, A.; HASTED, A. M.; MAXWELL, N. S.; HERRTAGE, M. E. Serum antibody titres to canine parvovirus, adenovirus and distemper virus in dogs in the UK which had not been vaccinated for at least three years. **Veterinary Record**, v.154, p.457-463, 2004.

BUONAVOGLIA, C.; MARTELLA, V.; PRATELLI, A.; TEMPESTA, M.; CAVALLI, A.; BUONAVOGLIA, D.; BOZZO, G.; ELIA, G.; DECARO, N.; CARMICHAEL, L. Evidence for evolution of canine parvovirus type 2c in Italy. **Journal of General Virology**. 82, 3021-3025, 2001.

BURTONBOY, S.; CHARLIER, P.; HERTOOGHS, J.; LOBMANN, M.; WISWMAN, A.; WOODS, S. Performance of high-titre attenuated canine parvovirus vaccine in pups with maternally derived antibody. **Veterinary Records** 128: 377-381, 1991.

CALDERON, M. G.; MATTION, N.; BUCAFUSCO, D.; FOGEL, F.; REMORINI, P.; LA TORRE, J. Molecular characterization of canine parvovirus strains in Argentina: detection of the pathogenic variant CPV-2c in vaccinated dogs. **Journal of Virological Methods**. 159, p. 141-145, 2009.

CARMICHAEL, L. E.; JOUBERT, J. C. AND POLLOCK, R. V. H. Hemagglutination by canine parvovirus serologic studies and diagnostic applications. **American Journal Veterinary Research** 41: 784-791, 1980.

CARMICHAEL, L. E.; JOUBERT, J. C. AND POLLOCK, R. V. H. A modified live canine parvovirus strain with novel plaque characteristics. I – Viral attenuation and dog response. **Cornell Vet**. 71: 408-427, 1981.

CARMICHAEL, L. E. Canine parvovirus type-2. An evolving pathogen of dogs. **Annual Veterinary Medicine**. 135: 459-464, 1994.

CAVALLI, A.; MARTELLA, V.; DESARIO, C.; CAMERO, M.; BELLACICCO, A. L.; DE PALO, P.; DECARO, N.; ELIA, G.; AND BUONAVOGLIA, C. Evaluation of the antigenic relationships among Canine Parvovirus type 2 variants. **Clinical and Vaccine Immunology** 15 (3) 534-539, 2008.

CHINCHKAR, S. R.; SUBRAMANIAN, B. M.; RAO, N. H.; RANGARAJAN, P. N.; THIAGARAJAN, D.; SRINIVASAN, V. A. Analysis of VP2 gene sequences of canine parvovirus isolates in India. **Archives of Virology** 151: 1881 – 1887, 2006.

CHOMCZYNSKI, P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cells and tissue samples. **Biotechniques, Natick** 15 (3): 532-537, 1993.

COSTA, A. P.; LEITE, J. P. G.; LABARTHE, N. V.; CUBEL GARCIA, R. C. N. Genomic typing of canine parvovirus circulating in the state of Rio de Janeiro, Brazil from 1995 to 2001 using polymerase chain reaction assay. **Veterinary Research Communication** 29: 735-743, 2005.

DECARO, N.; ELIA, G.; MARTELLA, V.; DESARIO, C.; CAMPOLO, M.; TRANI, L.; TARSITANO, E.; TEMPESTA, M.; BUONAVOGLIA, C. A real-time PCR assay for rapid detection and quantitation of canine parvovirus type 2 in the feces of dogs. A real-time PCR assay for rapid detection and quantitation of canine parvovirus type 2 in the feces of dogs. **Veterinary Microbiology** 105: 19-28, 2005a.

DECARO, N.; CAMPOLO, M.; DESARIO, C.; ELLIA, G.; MARTELLA, V.; LORUSSO, E.; BUONAVOGLIA, C. Maternally-derived antibodies in pups and protection from canine parvovirus infection. **Biologicals** 33: 261-267, 2005b.

DECARO, N.; ELIA, G.; MARTELLA, V.; DESARIO, C.; CAMPOLO, M.; ROPERTO, S.; LORUSSO, A.; CAVALLI, A.; BUONAVOGLIA, C. A minor groove binder probe real-time PCR assay for discrimination between type 2-based vaccines and field strains of canine parvovirus. **Journal of Virological Methods** 136: 65-70, 2006a.

DECARO, N.; MARTELLA, V.; DESARIO, C.; BELLACICCO, A. L.; CAMERO, M.; MANNA, L.; D'ALOJA, D.; BUONAVOGLIA, C. First detection of canine parvovirus type 2c in pups with haemorrhagic enteritis in Spain. **Journal of Veterinary Medicine B** 53: 468-472, 2006b.

DECARO, N.; DESARIO, C.; ADDIE, D. D.; MARTELLA, V.; VIEIRA, M. J.; ELIA, G.; ZICOLA, A.; DAVIS, C.; THOMPSON, G.; THIRY, E.; TRUYEN, E.; BUONAVOGLIA, C. Molecular epidemiology of canine parvovirus, Europe. **Emerging Infectious Diseases**. 13, 8, 2007a.

DECARO, N.; DESARIO, C.; ELIA, G.; CAMPOLO, M.; LORUSSO, A.; MARI, V.; MARTELLA, V.; BUONAVOGLIA, C. Occurrence of severe gastroenteritis in pups after canine parvovirus vaccine administration: a clinical and laboratory diagnostic dilemma. **Vaccine** 25, 1161-1166, 2007b.

DESARIO, C.; DECARO, N.; CAMPOLO, M.; CAVALLI, A.; CIRONE, F.; ELIA, M.; MARTELLA, V.; LORUSSO, E.; CAMERO, M.; BUONAVOGLIA, C. Canine parvovirus infection: Which diagnostic test for virus? **Journal of Virological Methods** 126, 179-185, 2005.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA 6.0. **Vaccines for veterinary use**. General Monographs 01/2008, 707-712. Disponível em <http://www.edqm.eu/en/European-Pharmacopoeia-1401.html>. Acesso em: 02/02/2011.

DIALLO, I. S.; HEWITSON, G.; WRIGHT, L.; RODWELL, B. J.; CORNEY, B. G. Detection of equine herpesvirus type 1 using a real-time polymerase chain reaction. **Journal of Virological Methods** 131 (1) 92-98, 2006.

FENNER, F.; BACHMANN, P. A.; GIBBS, E. P. J.; MURPHY, F. A.; STUDDERT, M. J.; WHITE, D. O. Virología Veterinaria. **Editora Acribia**. 691p., 1992.

FILIPOV, C.; DECARO, N.; DESARIO, C.; AMORISOC, F.; SCJARRETTA, R.; BUONAVOGLIA, C. Canine parvovirus epidemiology in Bulgaria. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation** 23: 152-154 2011.

FLINT, S. J.; ENQUIST, L. W.; KRUG, R. M.; RACANIELLO, V. R.; SKALKA, A. M. Principles of virology. **ASM Press, Washington, D.C.**, 2000.

FOX, J. M.; BLOOM, M. E. Identification of a cell surface protein from Crandell Feline Kidney Cells that specifically binds aleutian mink disease parvovirus. **Journal of Virology**. 73, 5, 3835-3842, 1999.

FRESHNEY, R. I. Culture of animal cells: a manual of basic technique. **In: Mahy, B. W. J. e Kangro, H. O. Virology Methods Manual**, cap. 1, p. 3-24, 1996.

GEORGE, V. G.; HIERHOLZER, J. C.; ADES, E. W. CELL CULTURE. **IN: MAHY, B. W. J. E KANGRO, H. O. Virology Methods Manual**, cap. 1, p. 3-24, 1996.

HAGIWARA, M. K.; JULY, J. R.; BACCARO, M. R.; ANGELO, M. J. O. Enterite hemorrágica em cães associada à infecção por um parvovirus. **Arquivos do Instituto Biológico - São Paulo**, 47 (1/2): 47-49, 1980.

HEID, C. A.; STEVENS, J.; LIVAK, K. J.; WILLIAMS, P. M. Real time quantitative PCR. **Genome Research**. 6: 986-994, 1996.

HEID, C. A.; STEVENS, J.; LIVAK, K. J.; WILLIAMS, P. M. Real-time quantitative PCR. **Genome Research** 14: 986-994, 2011.

HIERHOLZER, J. C.; KILLINGTON, R. A. Virus isolation and quantitation. **In: Mahy, B. W. J. e Kangro, H. O. Virology Methods Manual**. cap. 2, p. 3-24, 1996.

HIRASAWA, T.; YONO, K.; MIKAZUKI, K. Detection and genomic analysis of canine parvovirus by the polymerase chain reaction. **Journal of Veterinary Medicine Series B** 43: 545-554, 1996.

HOARE, C. M.; DEBOUCK, P.; WISEMAN, A. Immunogenicity of a low-passage, high-titer modified live canine parvovirus vaccine in pups with maternally derived antibodies. **Vaccine**, vol.15, n. 33, p. 273-275, 1997.

HOLLAND, P. M.; ABRAMSON, R. D.; WATSON, R.; GELFAND, D. H. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 88: 7276-7280, 1991.

HONG, C.; DECARO, N.; DESARIO, C.; TANNER, P.; PARDO, C.; SANCHEZ, S.; BUONAVOGLIA, C.; SALIKI, J. Occurrence of canine parvovirus type 2c in the United States. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation** 19: 535 – 539, 2007.

HU, R. L.; HUANG, G.; QIU, W.; ZHONG, Z. H.; XIA, X. Z.; YIN, Z. Detection and differentiation of CAV-1 and CAV-2 by polymerase chain reaction. **Veterinary Research Communications** 25: 77-84, 2001.

ISLAM, A.; HARRISON, B.; CHEETHAM, B. F.; MAHONY, T. J.; YOUNG, P.; WALKDEN-BROWN, S. W. Differential amplification and quantitation of Marek's disease viruses using real-time polymerase chain reaction. **Journal of Virological Methods** 119: 103-113, 2004.

JACOBS, R. M.; WEISER, M. G.; HALL, R. L.; KOWALSKI, J. J. Clinicopathologic features of canine parvoviral enteritis. **Journal of the American Animal Hospital Association** 16: 809-814, 1980.

KAPIL, S.; COOPER, E.; LAMM, C.; MURRAY, B.; REZABEK, G.; JOHNSTON, L.; CAMPBELL, G.; JOHNSON, B. Canine parvovirus types 2c and 2b circulating in North American dogs in 2006 and 2007. **Journal of Clinical Microbiology**. 45 (12): 4044- 4047, 2007.

KUMAR, M.; NANDI, SUKDEB. Development of a SYBR Green based real-time PCR assay for detection and quantitation of canine parvovirus in faecal samples. **Journal of Virological Methods**. 169, 198-201, 2010.

LAPPIN, M. R. Diagnóstico laboratorial de doenças infecciosas. **In: Medicina Interna de Pequenos Animais**. Rio de Janeiro: Elsevier, 4 ed, 1468p, 2010.

LIVAK, K. J.; FLOOD, S. J.; MARMARO, J.; GUISTI, W.; DEETZ, K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. **PCR Methods Appl.** 4: 357-362, 1995.

LOPEZ DE TURIZO, J.; CORTÊZ, E.; RANZ, A.; GARCÍA, J.; SANZ, A.; VELA, C.; CASAL, J. I. Fine mapping of canine parvovirus B cell epitopes. **Journal of General Virology**. 72 (10): 2445-2456, 1991.

MACKAY, I. M.; ARDEN, K. E.; NITSCHKE, A. Real-time PCR in virology. **Nucleic Acids Research**. 30 (6): 1292-1305, 2002.

MACKAY, I. M.; MACKAY, J. F.; NISSEN, M. D.; SLOOTS, T. P. Real-time PCR: history and fluorogenic chemistries. In: **Real-time PCR in Microbiology. From diagnosis to characterization.** Mackay, I. M. Academic Press. 464p, 2007.

MACARTNEY, L.; MCCANDLISH, I. A.; THOMPSON, H.; CORNWELL, H. J. Canine parvovirus enteritis 2: Pathogenesis. **The Veterinary Record.** 115 (18): 453-460, 1984.

MARTELLA, V.; CAVALLI, A.; DECARO, N.; ELIA, G.; DESARIO, C.; CAMPOLO, M.; BOZZO, G.; TARSITANO, E.; BUONAVOGLIA, C. Immunogenicity of a modified-live canine parvovirus type-2b vaccine administered intranasally um pups with maternally derived antibodies. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology** 12 (10): 1243-1245, 2005.

MEHNERT, D. U.; MONEZI, T. A.; PRADO, M. A.; HARSI, C. M.; CAVALIERO, M. J.; QUEIROZ, A. P. S.; MULLER, N. M. G.; ÂNGELO, M. J. O. Canine gastroenteritis in Brazil: preliminary results of a viral etiological study. **Anais do VIII Encontro Nacional de Virologia.** p. 43, São-Lourenço/MG, 1996.

MOCHIZUKI, M.; SAN GABRIEL, M. V.; NAKATANI, H.; YOSHIDA, M.; HARASAWA, R. Comparasion of polymerase chain reaction with virus isolation, haemagglutination assays for the detection of canine parvoviruses in faecal specimens. **Research in Veterinary Science** 55, 60-63, 1993.

MORAES, M. P.; COSTA, P. R. S. **Virologia Veterinária.** Eduardo Flores, capítulo 14. Santa Maria: Ed. UFSM, 888p, 2007.

MORI, C. M. C.; MORI, E.; FAVARO, L. L.; SANTOS, C. R.; LARA, M. C. C. S. H.; VILLALOBOS, E. C.; CUNHA, E. M. S.; BRANDÃO, P. E.; RICHTZENHAIN, L. J.; MAIORKA, P. C. Equid herpesvirus type-1 exhibits neurotropism and neurovirulence in a mouse model. **Journal of comparative pathology,** Edinburgh, v. 144, p. 1-9, 2011.

MOON, H. S.; LEE, S. A.; LEE, S. G.; CHOI, R.; JEOUNG, S. Y.; KIM, D. HYUN, C. Comparison of the pathogenicity in three different Korean canine parvovirus 2 (CPV) isolates. **Veterinary Microbiology.** 131 (1-2): 47-56, 2008.

MURPHY, F. A.; GIBBS, E. P.J.; HORZINEK, M. C.; STUDDERT, M. J. **Veterinary Virology,** Academic Press, 3 ed., 629p., 1999.

MUSKA, A.; PECK, E.; PALMER, S. Standards and controls: concepts for preparation and use in real-time PCR applications. In: **Real-time PCR in Microbiology. From diagnostic to characterization.** Caister Academic Press, cap. 4. 2007.

NITSCHKE, A. Oligonucleotide design for in-house real-time PCR applications in microbiology. In: **Real-time PCR in Microbiology. From diagnostic to characterization.** Caister Academic Press, cap. 2. 2007.

NOLAN, T.; MUELLER, R.; BUSTIN, S. QPCR: target preparation, **In: Real-time PCR in Microbiology. From diagnostic to characterization.** Caister Academic Press, cap. 3. 2007.

PARADISO, P.; RHODE, S.; SINGER, I. Canine parvovirus: a biochemical and ultrastructural characterization. *Journal of General Virology* 62: 113-125, 1982.

PARRISH, C. R.; EVERMANN, J. F.; CARMICHAEL, L. E. Nature variation of canine parvovirus. *Science* 230: 1046-1048, 1985.

PARRISH, C. R.; HAVE, P. D.; FOREYT, W. J.; EVERMANN, J. F.; SENDA, M.; CARMICHAEL, L. E. The global spread and replacement of canine parvovirus strains. *Journal of General Virology* 69: 1111-1116, 1988.

PÉREZ, R.; FRANCIA, L.; ROMERO, V.; MAYA, L.; LÓPEZ, I.; HERNÁNDEZ, M. First detection of canine parvovirus type 2c in South America. *Veterinary Microbiology* 124: 147-152, 2007.

PEREIRA, C. A. D.; DURIGON, E. L. Caracterização molecular do parvovirus canino pela reação em cadeia da polimerase (PCR). **Dissertação de mestrado – Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas ICB da USP, São Paulo, 1997.**

PEREIRA, C. A. D.; DURIGON, E. L. Genetic diversity of the VP1/VP2 gene of canine parvovirus type 2b amplified from clinical specimens in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. 31: 312-314, 2000.

PEREIRA, C. A. D.; MONEZI, T. A.; MEHNERT, D. U.; D'ANGELO, M.; DURIGON, E. L. Molecular characterization of Canine Parvovirus in Brazil by polymerase chain reaction assay. *Veterinary Microbiology*. 75, p. 127-133, 2000.

PERKINS, G. A.; GOODMAN, L. B.; DUBOVI, E. J.; KIM, S.G.; OSTERRIEDER, N. Detection of Equine Herpesvirus-1 in nasal swabs of horses by quantitative Real-time PCR. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 22: 1234-1238, 2008.

POLLOCK, R. V. Experimental canine parvovirus infection in dogs. *Cornell Vet* 72: 103-119, 1982.

POLLOCK, R. V.; CARMICHAEL, L. E. Maternally derived immunity to canine parvovirus infection: transfer, decline and interference with vaccination. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 180: 37-42, 1982.

POLLOCK, R. V.; PARRISH, C. R. Canine parvovirus. In: **R. G. Olson (Ed.) Comparative Pathobiology of Viral Disease of Domestic Animals.** CRCs Publicaions, 1985.

POLLOCK, R. V.; CARMICHAEL, L. E. Canine viral enteritis. **In: Greene, C. E. Infection diseases of dog and cat.** WB Saunders Company, p. 268-287, 1990.

REDDY, S. M.; WITTER, R. L.; GIMENO, I. Development of a quantitative-competitive polymerase chain reaction assay for serotype 1 Marek's disease virus. **Avian Diseases**. 44: 770-775, 2000.

REED, A. P.; JONES, E. V.; MILLER, T. J. Nucleotide sequence and genome organization of canine parvovirus. **Journal of Virology**. 62 (1): 266-276, 1988.

REED, L.J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. **The American Journal of Hygiene**. 27: 493-497, 1938.

ROSSETI, M. L.; SILVA, C. M. D.; RODRIGUES, J. J. S. **Doenças Infecciosas: Diagnóstico Molecular**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. 2 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 957p, 1989.

SANTOS, C. **Estatística Descritiva. Manual de auto-aprendizagem**. Lisboa, Edições Sílabo, 2007.

SCHUNCK, B.; KRAFT, W.; TRUYEN, U. A simple touch-down polymerase chain reaction for the detection of canine parvovirus and feline panleukopenia virus in feces. **Journal of Virological Methods**. 55: 427-433, 1995.

SENDA, M.; PARRISH, C.; HARASAWA, R.; GAMOH, K.; MURAMATSU, M.; HIRAYAMA, N.; ITOH, O. Detection by PCR of wild-type canine parvovirus wich contaminates dog vaccines. **Journal of Clinical Microbiology** 33: 110-113, 1995.

SIEGL, G. Canine parvovirus: origin and significance of a "new" pathogen. In: **Berns, K. I. The Parvoviruses New York, Plenum Publishing Corp.**, p. 363-388, 1984.

SPIBEY, N.; GREENWOOD, N. M.; SUTTON, D.; CHALMERS, W. S. K; TARPEY, I. Canine parvovirus type 2 vaccine protects against virulent challenge with type 2c virus. **Veterinary Microbiology** 128: 48-55, 2008.

STRECK, A. F.; SOUZA, C. K.; GONÇALVES, K. R.; ZANG, L.; PINTO, L. D.; CANAL, C. W. First detection of canine parvovirus type 2c in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**. 40: 465-469, 2009.

STROTTMANN, D. M.; SCORTEGAGNA, G.; KREUTZ, L. C.; BARCELLOS, L. J. G.; FRANDOLOSO, R.; ANZILIERO, D. Diagnóstico e estudo sorológico da infecção pelo parvovirus canino em cães de Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**. 38, 2, Santa Maria, 2008.

TSAO, J.; CHAPMAN, M.S.; AGBANDJE, M.; KELLER, W.; SMITH, K.; WU, H.; LUO, M.; SMITH, T. J.; ROSSMANN, M. G.; COMPANS, R. W. The three dimensional structure of canine parvovirus and its functional implications. **Science**. 251 (5000): 1456-1464, 1991.

TRUYEN, U.; GRUENBERG, A.; CHANG, S. F.; OBERMAIER, B.; VEIJALAINEN, P.; PARRISH, C. R. Evolution of the feline-subgroup parvoviruses and the control of canine host range. **Journal of Virology** 69: 4702-4710, 1995.

TRUYEN, U. Canine Parvovirus. In: CHARMICHAEL, L.E. **Recent Advances In Canine Infectious Diseases**, München, 2000. Disponível em: http://www.ivis.org/advances/Infect_Dis_Carmichael/toc.asp. Acesso em: 13/07/2010

TRUYEN, U. Evolution of canine parvovirus – a need for new vaccines? **Veterinary Microbiology** 117, 1: 9-13, 2006.

VIEIRA, M. J.; SILVA, E.; OLIVEIRA, J.; VIEIRA, A. L.; DECARO, N.; DESARIO, C.; MULLER, A.; CARVALHEIRA, J.; BUONAVOGLIA, C.; THOMPSON, G. Canine parvovirus 2c infection in central Portugal. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation** 20: 488-491, 2008.

WITTWER, C. T.; FILLMORE, G.C.; GARLING, D.J. Minimizing the time required for DNA amplification by efficient heat transfer to small samples. **Anal. Biochem.** 169: 1-25, 1990.

WU, H.; ROSSMAN, M. The canine parvovirus empty capsid structure. **Journal of Molecular Biology.** 223 (2): 231-244, 1993.

YOUNG, N. S. Hematologic and hematopoietic consequences of B19 parvovirus infection. **Seminars in Hematology.** 25 (2): 159-172, 1988.