



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA  
INSTITUTO FEDERAL GOIANO  
CAMPUS URUTAÍ  
GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR SUPERVISIONADO**

Sanidade Animal – Laboratório de Víroses de Bovídeos

Aluno(a): Alexandre Lopes Gomes

Orientador(a): Prof. Dra. Carla Cristina Braz Louly

URUTAÍ - GO

2019

Alexandre Lopes Gomes

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR SUPERVISIONADO**

Sanidade Animal – Laboratório de Viroses de Bovídeos

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Medicina Veterinária do Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí como parte dos requisitos para conclusão do curso de graduação em Medicina Veterinária

ORIENTADORA: Prof. Dra. Carla Cristina Braz Louly

SUPERVISORA: Prof. Dra. Liria Hiromi Okuda

URUTAÍ - GO

2019

**Repositório Institucional do IF Goiano - RIIF Goiano**

**Sistema Integrado de Bibliotecas**

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR PRODUÇÕES TÉCNICO-CIENTÍFICAS NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DO IF GOIANO**

Com base no disposto na Lei Federal nº 9.610/98, AUTORIZO o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, a disponibilizar gratuitamente o documento no Repositório Institucional do IF Goiano (RIIF Goiano), sem ressarcimento de direitos autorais, conforme permissão assinada abaixo, em formato digital para fins de leitura, download e impressão, a título de divulgação da produção técnico-científica no IF Goiano.

**Identificação da Produção Técnico-Científica**

- |                                                                      |                                                         |
|----------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Tese                                        | <input type="checkbox"/> Artigo Científico              |
| <input type="checkbox"/> Dissertação                                 | <input type="checkbox"/> Capítulo de Livro              |
| <input type="checkbox"/> Monografia – Especialização                 | <input type="checkbox"/> Livro                          |
| <input checked="" type="checkbox"/> TCC - Graduação                  | <input type="checkbox"/> Trabalho Apresentado em Evento |
| <input type="checkbox"/> Produto Técnico e Educacional - Tipo: _____ |                                                         |

Nome Completo do Autor:

Matrícula:

Título do Trabalho:

**Restrições de Acesso ao Documento**

Documento confidencial:  Não  Sim, justifique:

Informe a data que poderá ser disponibilizado no RIIF Goiano: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

O documento está sujeito a registro de patente?  Sim  Não

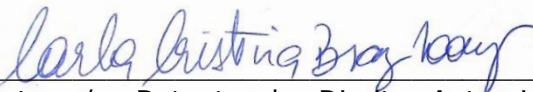
O documento pode vir a ser publicado como livro?  Sim  Não

**DECLARAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO NÃO-EXCLUSIVA**

O/A referido/a autor/a declara que:

1. o documento é seu trabalho original, detém os direitos autorais da produção técnico-científica e não infringe os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade;
2. obteve autorização de quaisquer materiais inclusos no documento do qual não detém os direitos de autor/a, para conceder ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano os direitos requeridos e que este material cujos direitos autorais são de terceiros, estão claramente identificados e reconhecidos no texto ou conteúdo do documento entregue;
3. cumpriu quaisquer obrigações exigidas por contrato ou acordo, caso o documento entregue seja baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano.

Urutaí, 10 de janeiro de 2019.



Assinatura do Autor e/ou Detentor dos Direitos Autorais

Ciente e de acordo:



Assinatura do(a) orientador(a)

**ATA DE APROVAÇÃO DE TRABALHO DE CURSO**

Às 08 horas do dia 18 de Dezembro de 2019, reuniu-se na sala nº 01 do Prédio Audatório do Cão-Guia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – *Campus Urutaí*, a Banca Examinadora do Trabalho de Curso intitulado "Relatório de Estágio Curricular e TCC intitulado: Padronização e validação da Reação de qPCR para o Gênero Parapoxvirus"

composta pelos professores Carla Cristina Braz Louly; Carolina Fonseca Osava; José Roberto Ferreira Alves Júnior

, para a sessão de defesa pública do citado trabalho, requisito parcial para a obtenção do Grau de Bacharelado em Medicina Veterinária. Para fins de comprovação, o aluno (a) Alexandre Lopes Gomes foi considerado APROVADO (APROVADO ou NÃO APROVADO), por unanimidade, pelos membros da Banca Examinadora.

Assinatura dos membros da Banca Examinadora	Situação (Aprovado ou Não Aprovado)
1. <u>Carla Cristina Braz Louly</u>	APROVADO
2. <u>José Roberto Ferreira Alves Júnior</u>	APROVADO
3. <u>Carolina Fonseca Osava</u>	APROVADO

Urutaí-GO, 18 de Dezembro de 2019.

Observações:

## AGRADECIMENTOS

Sobre agradecer...

Ultimamente venho me questionando, “o que seria agradecer?”. Por fim cheguei à conclusão que agradecer é tentar retribuir de alguma forma o amor, carinho, tempo, dedicação que outro individuo teve, ao te dar a mão ou ao nos proporcionar calma, para descansarmos durante a tempestade ou ate mesmo um ombro para repousarmos, quando o peso das lagrimas nos trazem para baixo. Com isso em mente, aqui deixo a melhor parte de tudo que assimilei durante esses anos, que arrisco dizer ser ate então os melhores.

Agradeço imensamente, Papai e Mamãe, que única e exclusivamente me apoiaram e incentivaram na realização de todas as coisas que sempre sonhei e ainda sonho, ao irmão chato, que na maioria das vezes me torra a paciência, mas mesmo assim me estimula a sempre ser melhor, nem que seja para jogar na cara dele.

Aos amigos, presentes que Deus nos dá, para tornar a caminhada mais gratificante, engraçada e suave. Muita das vezes mais que amigos e sim família, daquelas famílias imperfeitas cheias de altos e baixos, mesmo assim unida. E com eles aprendi que dividir a carga não é vergonhoso e que “Ohana quer dizer família, família quer dizer nunca abandonar ou esquecer...” e por isso sou grato, a todos vocês sou grato.

Não poderia deixar de agradecer a quem especialmente sempre me motivou a continuar e acreditar em meu potencial, meus estimados professores, onde sempre busquei orientação, e vislumbrei um sonho, de que um dia eu também poderia estimular e engajar outras pessoas como eles me estimularam. Vale evidenciar uma pessoa, e arrisco a dizer uma mãe para tantos outros, minha orientadora Carla Cristina Braz Louly, que me acompanha desde o 3º período, me dando suporte para subir e ate mesmo segurando minha mão nos pontos de instabilidade. Muito, muito obrigado.

E a Aquele, que com muito fervor discuti, insisti em não escutar e muito das vezes desobedeci, mesmo assim no ato ele já estava lá, com a mão estendida e dizendo “vamos, eu te levo na direção certa” me mostrando o verdadeiro significado de amar por amar... Muito obrigado Deus, por tudo e todos.

## SUMARIO

<b>CAPÍTULO 1 – RELATÓRIO DE ESTÁGIO</b> .....	1
<b>1 IDENTIFICAÇÃO</b> .....	1
<b>2 LOCAL DE ESTÁGIO</b> .....	1
<b>3 DESCRIÇÃO DO LOCAL E DA ROTINA DE ESTÁGIO</b> .....	1
3.1 Descrição do local de estágio .....	1
3.2 Descrição da rotina de estágio.....	3
3.2.1 Triagem e recepção de amostras.....	4
3.2.2 Processamento de amostra.....	4
3.2.3 Imunodiagnóstico .....	5
3.2.4 Biologia Molecular.....	7
3.2.5 Limpeza e esterilização .....	9
3.3 Resumo quantificado das atividades.....	10
<b>4 REFERÊNCIAS</b> .....	14
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	15
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	17
2.1 Titulação da amostra padrão.....	17
2.2 Extração .....	17
2.3 Gradiente de Anelamento dos Primers.....	17
2.4 Concentração de Primer, Prob e Amostra na qPCR .....	18
2.5 Sensibilidade, Repetibilidade e Reprodutibilidade .....	18
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	19
<b>4. CONCLUSÕES</b> .....	22
<b>5. REFERÊNCIA</b> .....	23
<b>ANEXO - NORMAS PARA PUBLICAÇÃO EM REVISTA ARQUIVOS DO INSTITUTO BIOLÓGICO</b> .....	24

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 1

- Figura 1 Construção do prédio Principal do Instituto Biológico de São Paulo. (A) Construção prédio principal 1930; (B) Prédio principal 2019. Fonte: <http://www.biologico.sp.gov.br/>. 02
- Figura 2 Triagem e Recebimento de amostras, etiquetagem e avaliação de inconformidades. Fonte: Arquivo pessoal. 04
- Figura 3 Estufa de crescimento viral; Amostras de BRSV e IND II de EV Fonte: Arquivo pessoal. 06
- Figura 4 Extratores; **1** Extrator QIAcube HT (Qiagen®); **2** Extrator Mag\_MaxTM (Thermofisher®). Fonte: Arquivo pessoal 08

### Capítulo 2

- Figura 1 Eletroforese PCPV, gradiente de anelamento. Corrida do PCPV em gel de agarose 3% com marcador de 20pbs. Fonte: Arquivo pessoal. 20
- Figura 2 Eletroforese PCPV, sensibilidade. Teste de sensibilidade, determinação da detecção das TCIDs. Fonte: Arquivo pessoal. 20
- Figura 3 Curva Padrão. A curva de padronização de qPCR; B gráfico linear de Curva Padrão. Fonte: Arquivo pessoal. 22

**LISTA DE QUADROS E GRÁFICOS****QUADROS**

Quadro 1	Reagentes da reagentes da PCR convencional; Instituto Biológico de São Paulo 2019.	18
----------	------------------------------------------------------------------------------------	----

**GRÁFICO**

Gráfico 1	Relação geral das atividades desempenhadas de 07/08/2019 a 29/10/2019. Instituto Biológico de São Paulo 2019.	11
Gráfico 2	Laboratório de ELIZA de 07/08/2019 a 29/10/2019. Instituto Biológico de São Paulo 2019.	11
Gráfico 3	Laboratório de Vírus Neutralização de 07/08/2019 a 29/10/2019. Instituto Biológico de São Paulo 2019.	12
Gráfico 4	Laboratório de Imunofluorescência Indireta de 07/08/2019 a 29/10/2019. Instituto Biológico de São Paulo 2019.	12
Gráfico 5	Relação geral das atividades desempenhadas de 07/08/2019 a 29/10/2019. Instituto Biológico de São Paulo 2019.	13



## LISTA DE ABREVIATURAS

® - Marca Registrada

**BLV** - Leucose Viral Bovina

**BOHV-1** - Herpes Vírus Bovino tipo 1

**BOHV-5** - Herpes Vírus Bovino tipo 5

**BPSV** - Vírus da Estomatite Papular Bovina

**BRSV** – Vírus Respiratório Sincicial Bovino

**BTV** - Blue Tongue

**BVD** - Diarreia Viral Bovina

**CQs** - *Quantification Cycle*

**ECTIM** - Ectima Contagioso

**FCM** - Febre Catarral Maligna

**IBR** - Rinotraqueite Viral Bovina

**IgG** - Imunoglobulina G

**IgM** - Imunoglobulina M

**LVB** - Laboratório de Viroses de Bovídeos

**NB3** - Laboratório Biossegurança Nivel 3

**NCBI** - *National Center for Biotechnology Information*

**NEO** - Neospora

**ORF** - Orfi virus

**PCPV** - Pseudocowpox Virus

**PCR** - Reação em Cadeia da Polimerase

**PI3** - Vírus da Parainfluenza III

**RIFI** - Reação de Imunofluorescência Indireta

**TOXO** - Toxoplasmose

**VACC** – Vaccinia

## CAPÍTULO 1 – RELATÓRIO DE ESTÁGIO

### 1 IDENTIFICAÇÃO

**1.1 Nome da supervisora:** Prof. Dra. Liria Hiromi Okuda;

Pesquisadora científica do Instituto Biológico de São Paulo desenvolvendo linhas de pesquisa em saúde animal, com enfoque em zoonoses virais e parasitárias. Atualmente coordena projeto sobre zika vírus em bovinos. Mestrado em Epidemiologia Experimental Aplicada Às Zoonoses pela FMVZ/USP (2002); Doutora em Ciências na área de concentração em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses pela FMVZ/USP (2013) e Especialista em *Advanced Res. Course Control Zoonosis Food Safety* pela *Japan International Cooperation Agency* (2008).

**1.2 Nome do aluno:** Alexandre Lopes Gomes      **Matrícula:**2015101201240205

**1.3 Nome da orientadora:** Prof. Dra. Carla Cristina Braz Louly

### 2 LOCAL DE ESTÁGIO

**2.1 Nome do local estágio:** Instituto Biológico de São Paulo.

**2.2 Localização:** Avenida Conselheiro Rodrigues Alves, 1252 Vila Mariana - CEP 04014-900 - São Paulo - SP

**2.3 Justificava de escolha do campo de estágio:** uma possibilidade de agregar e elevar meus conhecimentos na área de sanidade animal, voltado para o tema de técnicas diagnosticas e avanços na área de diagnostico molecular, sorológico e epidemiológico.

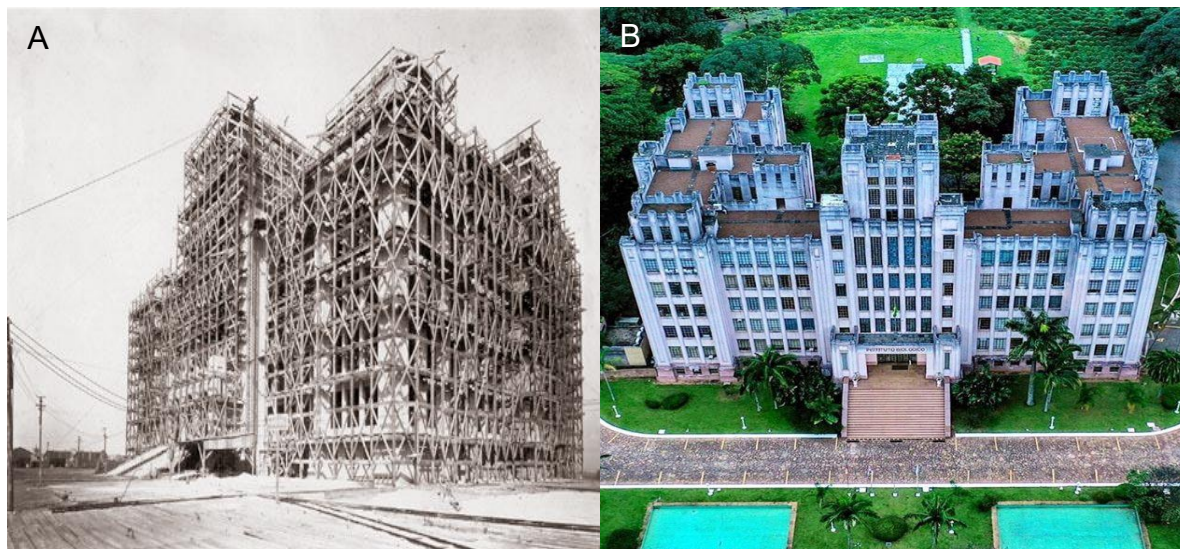
### 3 DESCRIÇÃO DO LOCAL E DA ROTINA DE ESTÁGIO

#### 3.1 Descrição do local de estágio

O Instituto Biológico (IB) é uma instituição que foi criada com a missão de desenvolver e transferir conhecimento científico e tecnológico para o negócio agrícola nas áreas de sanidade animal e vegetal e sua relações com o meio ambiente, visando a melhoria da qualidade de vida da população. Seu grande desafio como instituição, hoje, é aliar um histórico de contribuições a um presente que exige excelência e prontidão de resposta para a atual sociedade em profunda transformação (CENTRO DE COMUNICAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DO CONHECIMENTO, 2019).

A construção do prédio principal, do que no futuro se tornaria o IB teve inicio em 1927 (Figura 1) e inauguração em 25 de janeiro de 1945. Desde sua

construção, o mesmo se mantém como referência no diagnóstico e pesquisa para um grande número de agentes de impacto sanitário e ambiental tanto da parte animal como da parte vegetal.



**Figura 1:** Construção do prédio Principal do Instituto Biológico de São Paulo. (A) Construção prédio principal 1930; (B) Prédio principal 2019. Fonte: <http://www.biológico.sp.gov.br/>

Na sede possui mais de 5 grandes centros de pesquisa e mais 40 laboratórios distribuídos dentro dos centros. O IB também conta com a parte de ensino, apresentando programas de Pós-graduação Mestrado e Doutorado *stricto sensu* em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Dentre os inúmeros laboratórios da presente instituição, o estágio foi realizado no Laboratório de Vírus de Bovídeos (LVB), no qual se realiza análises, sorológicas, moleculares, isolamento e cultivo viral, para diagnóstico oficial (laboratório oficial credenciado ao MAPA) de inúmeras doenças: Febre Aftosa, IBR, BVD, FCM, BLV, BTV, BOHV-1, BOHV-5, PI3, PCPV, VACC, ORF, BPSV, entre inúmeros outros. As avaliações realizadas no laboratório atendem tanto ao público externo, sendo esta uma fonte de fomento para manutenção dos laboratórios juntamente com a verba pública. Outra vertente de atuação é na pesquisa, com a realização de levantamentos epidemiológicos, validação de técnicas diagnósticas e identificação de novos agentes de endemia.

A estrutura do LVB detém na parte administrativa, sala de recepção, sala de reunião, salas dos pesquisadores, sala de assistência em TI e cozinha. No que

se refere aos laboratórios temos inicialmente a sala de paramentação e processamento 1 e 2, onde as amostras são recebidas, checadas as conformidades e cadastradas ao sistema dos laboratório, recebendo uma numeração específica (processamento 1), após essa parte inicial a amostra é aliquotada para cada análise especificada pelo cliente (processamento 2). Posterior ao processamento a amostra é enviada ao laboratório correspondente ao diagnostico desejado, sendo estes, Isolamento Viral, Biossegurança Nível 3 (NB3), Vírus Neutralização, Febre aftosa, Imunodiagnóstico, Cultivo celular e Centro de Biologia Molecular.

Sobre a biossegurança, o laboratório conta com sistema de leitura biométrica para acesso aos laboratórios, existindo uma sala de paramentação que separa a parte administrativa da parte de análises e outra uma que sapara o Centro de Biologia Molecular de todo laboratório. No que se refere ao laboratório de cultivo celular, por este trabalhar com linhagens puras não contaminadas, o acesso é restrito somente a alguns pesquisadores, sendo esse acesso somente realizado pelo meio externo do laboratório, já que o não deve haver comunicação com áreas possivelmente contaminadas. O NB3 possui sala de paramentação e banho, além de todo sistema de purificação de ar e tratamento de esgoto separado, por se tratar de um ambiente onde se manipula agentes de alta virulência.

Para atender a demanda de materiais do laboratório este conta com sala de lavagem e montagens de materiais, onde toda vidraria, ponteiras, tubos e placas são limpos e montados para posterior autoclavagem.

### **3.2 Descrição da rotina de estágio**

A carga horaria total cumprida no estagio curricular obrigatório de 420 horas, sendo 40 horas semanais de segunda a sexta 8 horas diárias.

Durante todo o estagio tive a oportunidade de acompanhar e realizar boa parte de todas as atividades desempenhadas nos laboratórios. Sendo que dentre todas as atividades desempenhadas, tive maior foco na área de Biologia molecular, visto que meu trabalho de conclusão é referente a esta área.

### 3.2.1 Triagem e recepção de amostras

Importante etapa, onde o estagiário aprende a manipular as amostras, onde as amostras são recebidas e as documentações são conferidas. Nesse momento as amostras já são inseridas no sistema do IB recebendo uma numeração de TA (Triagem Animal). Um aviso de chegada de amostra é enviado ao laboratório de destino no momento do cadastro.

Com a amostra já dentro do LVB, esta recebe outra numeração que é específica para o laboratório (N° LVB) (Figura 2), e passa por uma segunda avaliação, conferindo o estado de conservação, volume e acondicionamento, processo que participei ativamente. Com a amostra qualificada são geradas etiquetas para possibilitar o rastreamento, contendo tanto o número de TA como o LVB, posteriormente enviada ao setor de processamento.



**Figura 2** – Recebimento, avaliação e identificação das amostras encaminhadas ao Instituto Biológico de São Paulo. Fonte: Arquivo pessoal

### 3.2.2 Processamento de amostra

As amostras já cadastradas e identificadas, agora serão alíquotadas para ser discriminadas aos setores de diagnóstico de interesse. A etapa de processamento proporciona uma prática na pipetagem de materiais, essencial para o bom desempenho nas outras áreas do laboratório. No início do estágio essa é a principal atividade do estagiário.

Na rotina normalmente se recebe amostras como sangue total, plasma, soro, partidas de sêmen, órgãos (sistema nervoso, fígado, coração, timo, rins) não

aconicionados em formol, fezes e fragmentos tegumentares (crostas, escaras e ápice de orelha). Dependendo do teste requisitado o sangue é centrifugado e separadas suas fases para retirada de alíquotas; o sêmen é retirado das palhetas e fracionado em eppendorfs; os órgãos e tecidos recebidos são fragmentados em pequenas porções e enviados para serem macerados.

### **3.2.3Imunodiagnóstico**

São realizados teste que tem como objetivo detecção de anticorpos, estes de memoria, comprovando que o animal passou pela fase de infecção em algum momento de sua vida ou ate mesmo esta em fase ativa obtendo altos títulos, em todas situações detectáveis aos testes, e qualificados de acordo com os pontos de corte determinados pela própria técnica.

Por se tratar de testes com segurança judicial a parte da avaliação e resultados é restrita aos pesquisadores, porem mesmo assim a pipetagem das amostras e reagentes me é permitida, possibilitando assim o melhor entendimento de todas as técnicas realizadas.

Alguns testes são mais comumente realizados, sendo estes descritos a seguir:

- ELISA ensaio imunoenzimático – Seguindo diretrizes de ENGVAL & PERLMANN, (1971) adaptada, consiste na aplicação da amostra do animal, em uma placa onde já se encontra adsorvido o antígeno específico, se o animal possuir anticorpos para o mesmo, estes se ligarão, resistindo assim a lavagem dos poços, com a placa lavada se aplica o conjugado (anti-anticorpo marcado com imunoperoxidase) que se liga especificamente com o anticorpo para o antígeno, seguida de outra fase de lavagem e por fim a colocação do substrato que ativa a enzima marcadora, produzindo uma reação colorimétrica que será avaliada pelo nível de absorbância, ou seja se o animal nunca tiver entrado em contato com o agente em teste, o mesmo não possuirá anticorpos, impossibilitando a ligação entre o anticorpo e o conjugado, produzindo níveis de absorbância negativos.
- Vírus neutralização (VN) - apesar de possuir uma avaliação complexa o principio da técnica é simples, consistindo em basicamente colocar uma cepa

padrão do agente desejado, em contato com o a amostra do animal em diluição seriada  $10^{-1}$  a  $10^{-8}$  em sistema de cultivo celular (importante lembrar que cada vírus possui uma preferencia pela célula de crescimento) mantendo o ensaio em estufa (Figura 3) para posterior avaliação do efeito citopático do vírus, que é a ação do vírus na célula seja de vacuolização ou de lise celular, sendo que cada vírus possui um efeito caracteristico. Depois de 3 a 4 dias as placas são novamente avaliadas, se houver efeito indica que o animal não dispunha de anticorpos para o agente, ou seja não foi exposto ao mesmo, se não houve efeito significa que os anticorpos impediram a ação de lise nas células do cultivo. A avaliação dos resultados segue o método de Reed & Muench (1938) tendo como resultado fina o titulo de anticorpos do animal para tal agente, já que sua amostra foi avaliada em diluição seriada, possibilitando visualizar a diferença do efeito em célula perante a diluição da amostra.



**Figura 3:** Estufa de crescimento viral; Amostras de BRSV e IND II de EV Fonte: Arquivo pessoal.

- Reação de imunofluorescência indireta (RIFI) – A avaliação tem como princípio a imunomarcção, baseada na pesquisa de anticorpos, para o agente requisitado, em lamina sensibilizada pelo mesmo, sendo necessário assim a prévia adsorção do antígeno na lamina em estufa por uma hora. Com a lamina preparada realiza-se a pipetagem das amostras, seguido de ciclos de lavagem em BPS e por fim a inclusão do anti-anticorpo marcado com a fluoresceína +

Azul de Evans, lavagem, secagem, formação do filme de glicerina, posicionamento da lâminula e visualização sob microscópio de fluorescência. Na avaliação, se o animal for positivo, o mesmo dispõe de anticorpos que se ligarão ao antígeno o qual o anti-anticorpo possui afinidade e se liga, proporcionando sob microscópio e luz UV um efeito de fluorescência que marca o alvo.

### 3.2.4 Biologia Molecular

Diferente do imunodiagnóstico, a biologia molecular trabalha com a detecção do antígeno de forma direta, e não do anticorpo. As atividades do setor, são numerosas e regulares o que contribuiu para minha pronta participação em cada etapa, desde a pipetagem dos materiais e reagentes até a programação dos equipamentos robotizados e avaliação dos resultados obtidos, consumindo boa parte dos dias trabalhados, já que além da rotina, ainda havia a preocupação com a aquisição de resultados para o trabalho de conclusão.

As etapas principais por mim desempenhadas serão a seguir descritas:

Extração – processo que como sugere o próprio nome, consiste em extrair o material genético presente na amostra, através de etapas de lise e purificação. Dentro da rotina contamos com 2 métodos robotizados utilizados:

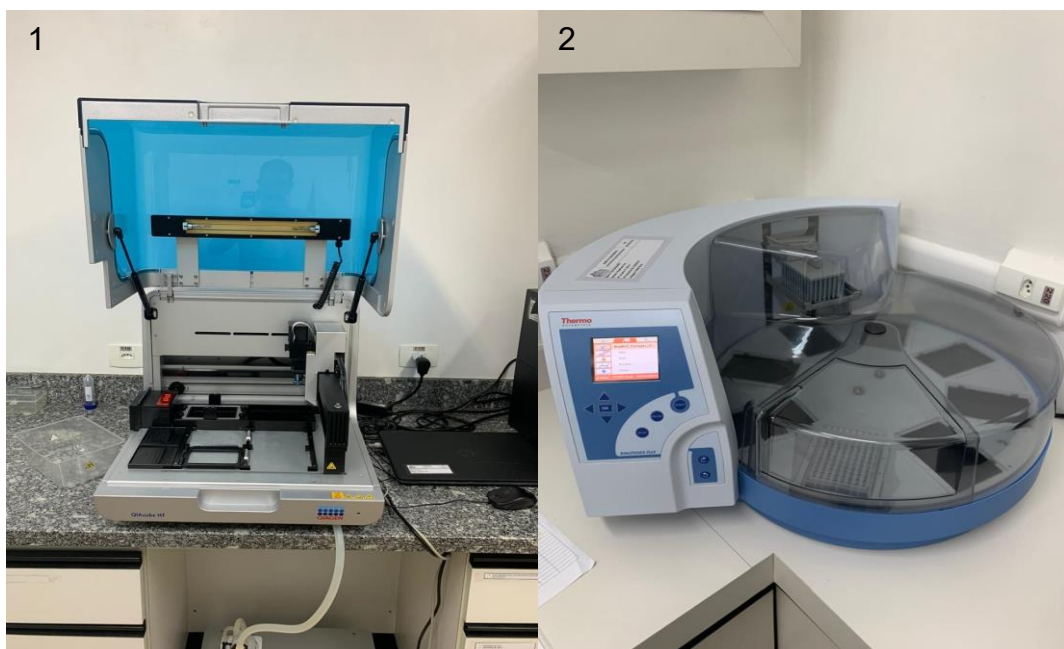
**QIAcube HT** (Qiagen®) (Figura 4) realiza a extração por um processo de purificação por filtro de coluna de sílica, que consiste na passagem de 200µL da amostra fluida em PBS por soluções de lise, que rompe a célula e expõe o material genético, seguidas etapas de lavagem para retirar resíduos que afetem a reação, e forçar a passagem por um filtro de sílica através de bomba de vácuo. A filtragem permite a passagem somente do material de eluição, ou seja o material genético.

**Kingfisher\_Mag\_Max™ Pathogen RNA/DNA Kit** (ThermoFisher®) (Figura 4) diferente do método anterior utiliza de um conjunto de *beads* magnética que torna o protocolo mais eficiente e rápido possibilitando a extração de 96 amostra em 35 min. Nesse protocolo a amostra passa por um pré-processamento, que consiste na montagem das placas de lavagem e da amostra já com a solução de Lise e *Beads*, que se ligam ao material genético e por meio de placas magnéticas



é atraído e assim possibilitando a lavagem do sobrenadante, retirando os resíduos celulares, e através de um processo térmico as Beads são separadas do material genético na placa de eluição, depositando o material já purificado.

Com o fim do processo de extração a placa de com o material eluído é colocada para análise seguindo algumas possíveis técnicas (PCR convencional, Nested PCR e qPCR)



**Figura 4** – Extratores; 1 Extrator QIAcube HT (Qiagen®); 2 Extrator Mag\_Max™ (ThermoFisher®). Fonte: Arquivo pessoal

- PCR convencional – descrita por MULLIS (1994) modificada, consiste em detectar o material genético de um antígeno específico, através do desenho de *primers* que se anelam somente com o material genético deste antígeno, assim viabilizando a ligação com a DNA polimerase e amplificação deste material delimitado pelos *primers forward* e *reverse* em sistema de termociclagem. Logo a após a amplificação à esse material é adicionado corante (Gel red + Loading 1:2) na proporção de 3 $\mu$ L de cortante e 2 $\mu$ L de amostra, em seguida pipetado em gel de agarose 1,5 %, imerso em TBE (Tris/Borato/EDTA) a 100 v por 1 hora. Depois de corrido e gel é posiciona em câmara de visualização de gel com luz UV e câmara acoplada, possibilitando a visualização dos pares de base marcados na amostra e comparado com seu controle positivo, identificando a presença ou não do antígeno.

- Nested PCR – técnica se assemelha muito com a técnica convencional, o grande diferencial da técnica é sua maior sensibilidade, que esta trabalha com 2 conjuntos de amplificações. Sendo que na primeira ciclagem o primer utilizado amplifica um produto maior, já na segunda amplificação são utilizados primers mais internos amplificando o produto já amplificado. Por se tratar de uma técnica mais especifica, esta detecta ate mesmo agentes em amostras com pouca carga viral. A avaliação segue o mesmo padrão da convencional, através da leitura dos pares de base em gel de agarose.
- PCR quantitativo (qPCR) – técnica, relatada desde 2003 que possibilita a quantificação do agente na amostra, através da curva de amplificação comparado aos “*quantification cycle CQs*” que pode ser visualizado durante o processo da corrida no equipamento. O grande diferencial da técnica, é a utilização de uma sonda marcada com fluoróforo, que se liga ao centro do produto amplificado, que posteriormente é degradado pela Taq-Polimerase, assim emitindo um feixe de onda luminosa detectável na formação da curva de amplificação durante a ciclagem.
- Sequenciamento – técnica que permite concluir com mais precisão o diagnostico em alguns casos especiais, em casos onde o animal apresenta sinais clínicos, porem o mesmo é negativo na molecular e positivo na sorologia, isso pode ocorrer por conta da especificidade dos primers que podem detectar uma subespécie e outra não mesmo sendo pertencentes a mesma espécie. Nesse caso temos a opção de sequenciar a amostra e blastar no GenBank (NCBI) para identificar o que foi sequenciado. Uma técnica ainda pouco utilizada na rotina por conta se seu custo ao requisitante, porem muito utilizada na pesquisa para identificar novas espécies de agentes que podem ser encontrados no ambiente.

### **3.2.5 Limpeza e esterilização**

A rotina de limpeza de materiais é diária e bem volumosa já que a rotina de todos os laboratórios e revertida para apenas uma sala de lavagem. O processo envolve a limpeza de ponteiras, vidrarias em geral, provetas, placas do imunodiagnostico, graal e pistilos, além da esterilização de gaze, meios e todos os materiais que já foram limpos.

Com relação a rotina, todos os dias as atividades de limpeza e esterilização eram as primeiras a ser desempenhadas, sendo estas permanentes por todo período de estagio diariamente.

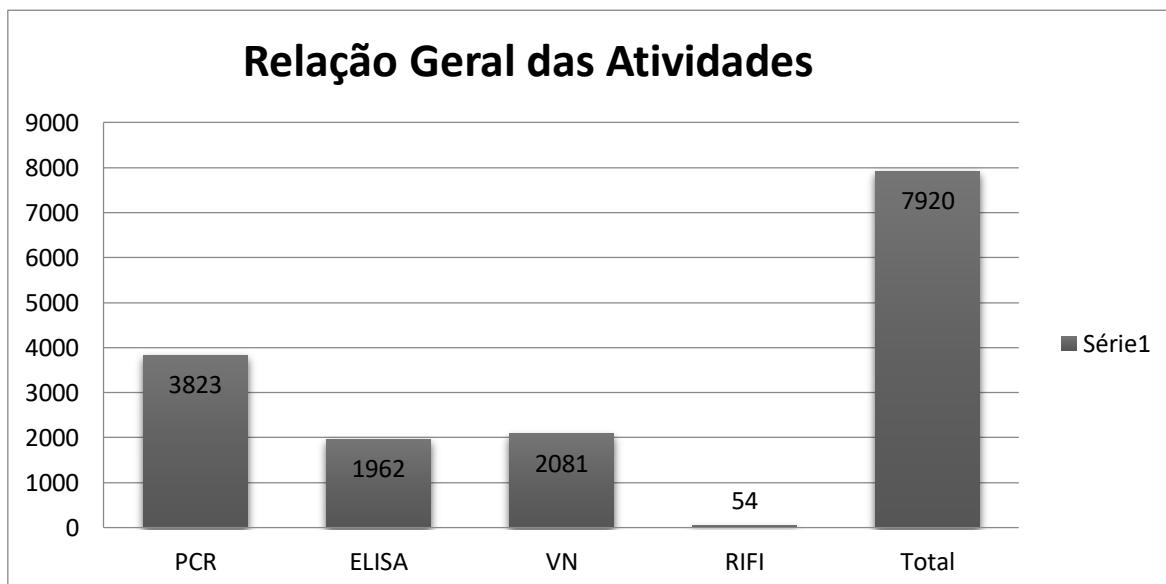
A lavagem segue um protocolo rígido por se tratar de material infectado que podem trazer risco aos manipuladores. Inicialmente se realiza a inativação em Hipoclorito 2% durante 30 min a 1 hora, seguido da lavagem abrasiva com Extran, enxague, em água de torneira acompanhado de molho em água destilada por de 30 min a 1 hora para retirar qualquer resíduo dos produtos de limpeza. Após o molho os materiais são levados a fornos a 80 °C até que os mesmos sequem, podendo ser enviados a sala de montagem onde serão embalados para a autoclavagem.

Outro ponto importante a se ressaltar e a higiene das vestimentas que são utilizadas na rotina. Quando as mesmas não são descartáveis, são utilizados jalecos com material que suporta a autoclavagem, sendo totalmente vetado o transporte dos mesmos para fora das instalações antes de sua esterilização.

### **3.3 Resumo quantificado das atividades**

As atividades realizadas tiveram inicio do dia 07 de agosto de 2019 e se finalizaram dia 29 de outubro de 2019 completando carga horaria de 420 horas. Dentro desse período foram acompanhadas inúmeras atividades dentro do próprio LVB, as atividades foram divididas entre as técnicas diagnosticas. De forma geral as atividades realizadas obedecem a descrição do gráfico 1 a seguir, gerando um montante final de 7920 avaliações.

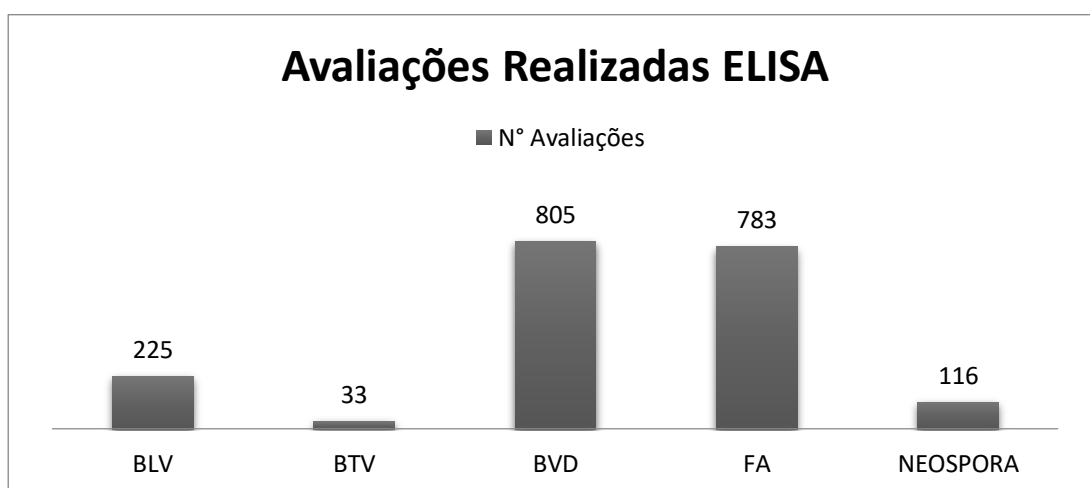
**Gráfico 1-** Relação geral das atividades desempenhadas de 07/08/2019 a 29/10/2019.



Instituto Biológico de São Paulo 2019

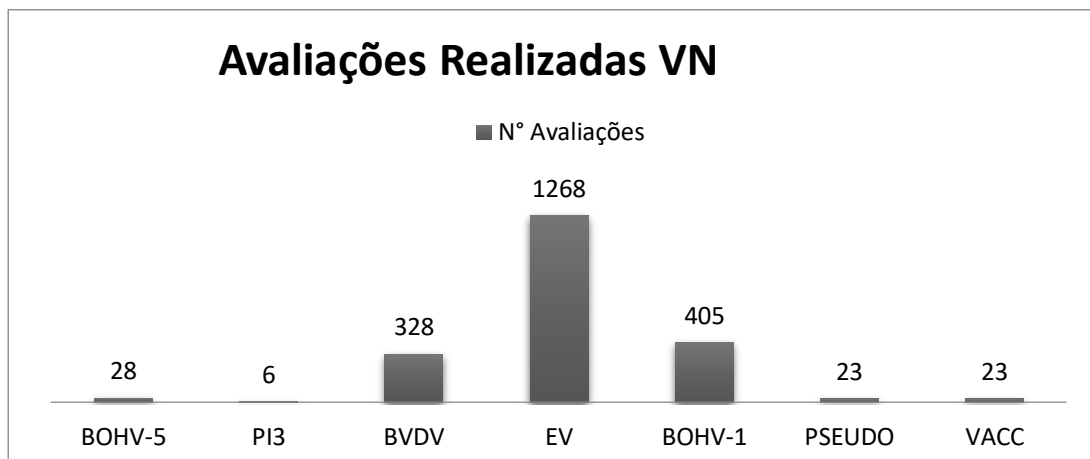
No imunodiagnostico para melhor entendimento a tabulação foi dividida entre as três principais avaliações do escopo ELISA, VN, RIFI descritas respectivamente nos gráficos 2, 3 e 4 respectivamente.

**Gráfico 2-** Laboratório de ELIZA de 07/08/2019 a 29/10/2019.



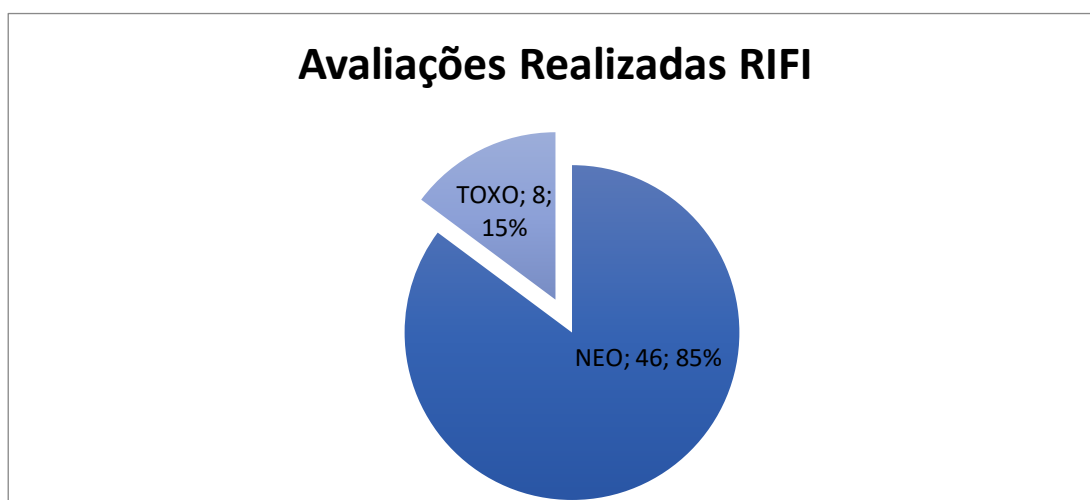
Instituto Biológico de São Paulo 2019

**Gráfico 3-** Laboratório de Vírus Neutralização de 07/08/2019 a 29/10/2019.



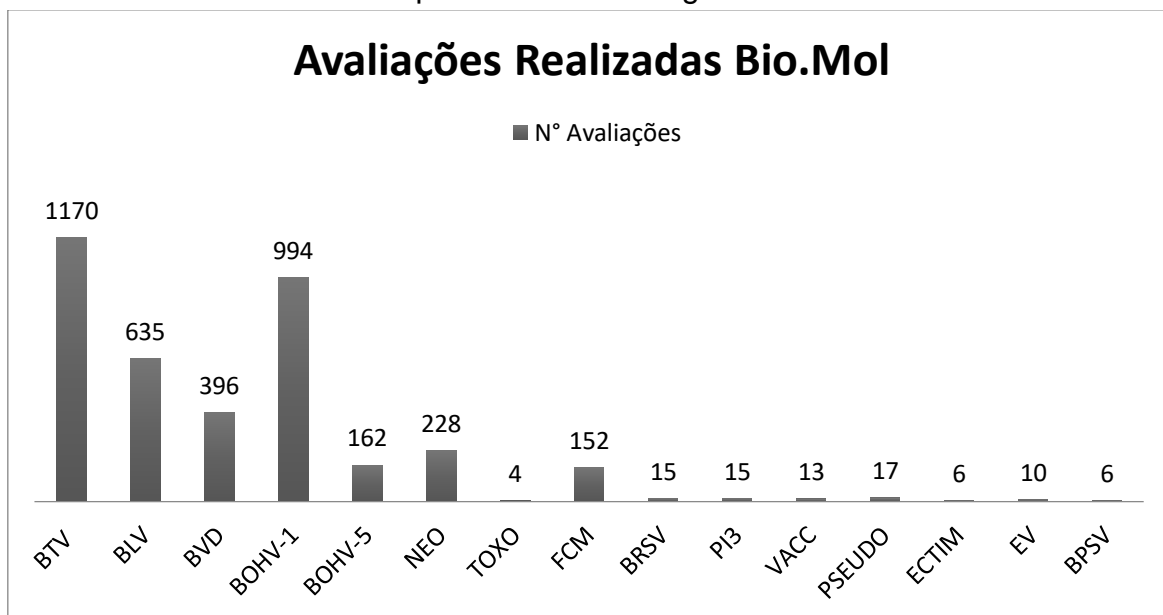
Instituto Biológico de São Paulo 2019

**Gráfico 4-** Laboratório de Imunofluorescência Indireta de 07/08/2019 a 29/10/2019.



Instituto Biológico de São Paulo 2019

As atividades realizadas na Biologia Molecular fecharam um total de 3823 avaliações segregadas entre as enfermidades como descrito no gráfico 5.

**Gráfico 5:** Atividades desempenhadas na Biologia Molecular

Instituto Biológico de São Paulo 2019

Importante ressaltar que algumas atividades como as de limpeza, montagem e autoclavagem não entram nos gráficos, mesmo assim estas foram desempenhadas diariamente pela manhã, antes do início da rotina do Laboratório.

#### 4 REFERÊNCIAS

CENTRO DE COMUNICAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DO CONHECIMENTO.

Saiba mais sobre o Instituto Biológico. Instituto Biológico. Julho de 2019.

Acessado em: 16/10/2019. Disponível em:

<http://www.biologico.sp.gov.br/page/quem-somos>

Engvall, E., & Perlmann, P. (1971). *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G*. *Immunochemistry*, 8(9), 871–874.

Mullis, KB, Ferré, F. & Gibbs, RA (Eds.). (1994). *A reação em cadeia da polimerase*. doi: 10.1007 / 978-1-4612-0257-8

Reed, L.J.; Muench, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Hyg.*, v.27, p.493-497, 1938.

## CAPÍTULO 2

### PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA REAÇÃO DE qPCR PARA O GÊNERO *PARAPOXVIRUS*.

GOMES, A. L.<sup>1</sup>; FUSUMA, M. M.<sup>2</sup>; ROMALDINI, A.H.C.N<sup>3</sup>.; STEFANO, E<sup>4</sup>.; OKUDA, L. H.<sup>5</sup>; LOULY, C. C. B<sup>6</sup>;

<sup>1</sup>Alexandre Lopes Gomes – e-mail: [alexandrelopesgomes97@gmail.com](mailto:alexandrelopesgomes97@gmail.com) - Instituto Federal Goiano - Campus Urutaí Rodovia Geraldo Silva Nascimento Km 2,5, Urutaí - Goiás – Brasil, CEP 75790-000.

<sup>2</sup>Marcia Mayumi Fusuma – e-mail: [mmayumi06@gmail.com](mailto:mmayumi06@gmail.com) - Instituto Biológico Avenida Conselheiro Rodrigues Alves, 1252 Vila Mariana - CEP 04014-900 - São Paulo – SP.

<sup>3</sup>Adriana Nogueira – e-mail: [adriananogueira@biologico.sp.gov.br](mailto:adriananogueira@biologico.sp.gov.br) - Instituto Biológico Avenida Conselheiro Rodrigues Alves, 1252 Vila Mariana - CEP 04014-900 - São Paulo – SP.

<sup>4</sup>Eliana Stefano – e-mail: [stefano@biologico.sp.gov.br](mailto:stefano@biologico.sp.gov.br) - Instituto Biológico Avenida Conselheiro Rodrigues Alves, 1252 Vila Mariana - CEP 04014-900 - São Paulo – SP.

<sup>5</sup>Liria Hiromi Okuda – e-mail: [liriahok@gmail.com](mailto:liriahok@gmail.com) - Instituto Biológico Avenida Conselheiro Rodrigues Alves, 1252 Vila Mariana - CEP 04014-900 - São Paulo – SP.

<sup>6</sup>Carla Cristina Braz Louly - [carlalouly@gmail.com](mailto:carlalouly@gmail.com) - Instituto Federal Goiano - Campus Urutaí Rodovia Geraldo Silva Nascimento Km 2,5, Urutaí - Goiás – Brasil, CEP 75790-000.

#### Resumo:

O gênero *Parapoxvirus* inclui 4 espécies, dentre eles, o vírus da Estomatite Papular Bovina (BPSV), Orf virus (ORFV), *Parapoxvirus* do veado vermelho da Nova Zelândia (PVNZ) e vírus da Pseudovariola Bovina (PCPV). Estas espécies acometem bovídeos e, tem sua importância no diagnóstico diferencial para febre aftosa, além de poder infectar humanos que tiveram contato direto ou indireto com o animal. Este estudo tem como objetivo padronizar e validar a reação de PCR quantitativo (qPCR), para implantação na rotina diagnóstica do Laboratório de Vírus de Bovídeos (LVB), Instituto Biológico de São Paulo. Como estirpe de referência foi utilizado o vírus da Pseudovariola Bovina (PCPV), ATCC VR-634 na 4ª passagem em células de linhagem MDBK. O material viral foi extraído e submetido a uma série de etapas para a otimização da reação incluindo a determinação das concentrações de *Primer*, sonda além da temperatura de anelamento, sensibilidade e repetibilidade. A eficiência do teste foi de 91,398% mantendo a distância (*slope*) entre as diluições virais de -3,547, com coeficiente de relação ( $R^2$ ) 0,948 e uma alta sensibilidade detectando 1 TCID 50/50µL, obtendo uma reação otimizada e padronizada para a inclusão na rotina laboratorial.

Palavras-chave: PCR em tempo real, *poxviridae*, PCPV

### STANDARDIZATION AND REACTION VALIDATION OF QPCR FOR *PARAPOXVIRUS* GENRE.

#### Abstract:

The genus *Parapoxvirus* includes 4 species, including Bovine Papular Stomatitis Virus (BPSV), Orf virus (ORFV), New Zealand *Parapoxvirus* of red deer (PVNZ) and Pseudocowpox (PCPV). These species affect cattle and have their importance in the differential diagnosis for foot and mouth disease, besides being able to infect humans who had direct or indirect contact with the animal. This study aims to standardize and validate quantitative PCR reaction (qPCR) for implementation in the diagnostic routine of the Laboratório de Vírus de Bovídeos (LVB), Instituto Biológico de São Paulo. As reference strain the *Pseudocowpoxvirus* (PCPV), ATCC VR-634 was used in the 4th pass in MDBK strain cells. The viral material was extracted and subjected to a series of steps for reaction optimization including determination of Primer concentrations, probe in addition to annealing temperature, sensitivity and repeatability. The efficiency of the test was 91.398%, maintaining the slope between the viral dilutions of -3.547, with a ratio coefficient ( $R^2$ ) of 0.948 and a high sensitivity detecting 1 TCID 50 / 50µL. Obtaining an optimized and standardized reaction for inclusion in the laboratory routine.

Key words: *Real time PCR*, *poxviridae*, PCPV



## 1. INTRODUÇÃO

Os vírus do gênero *Parapoxvirus* da família *Poxviridae* causam doenças generalizadas, porém localizadas, de pequenos e grandes ruminantes (BUTTNER, 2002). O mesmo inclui 4 agentes diferentes, dentre eles vírus da Estomatite Papular Bovina (BPSV), Orf virus (ORFV), Parapoxvirus do veado vermelho da Nova Zelândia (PVNZ) e vírus da Pseudovariola Bovina (PCPV) (DAS et al, 2016). Dentre suas características, em destaque observa-se sua adaptabilidade a diversos hospedeiros, sendo sabidamente zoonótico, podendo infectar humanos que tiveram contato direto ou indireto com animais infectados, além de envelopados, portanto muito resistentes em condições ambientais, com genoma DNA de fita dupla (CARGNELUTTI et al, 2014).

A distribuição geográfica dos agentes do gênero é ampla, acometendo animais de diversas regiões do planeta. No Brasil o padrão de distribuição se repete, sendo encontrado em todas as cinco regiões do país (LAGUARDIA-NASCIMENTO et al, 2017). Existem relatos da detecção de agentes da família *Poxviridae* nas florestas de São Paulo desde a década de 60 e 70, porém somente a partir de 1999 com o Programa Nacional de Erradicação e Prevenção da Febre aftosa (PNEFA) a circulação do agente se tornou evidente, já que os testes diagnósticos buscavam a distinção entre essas duas doenças (MEGID, J. et al, 2012).

Devido o quadro de sinais clínicos, as Parapoxviroses se encaixam no grupo das doenças vesiculares. Mesmo que as lesões causadas pelo PCPV e BPSV sejam confundíveis com febre aftosa, estomatite vesicular e vaccínia bovina, pouca importância tem sido dada a esses agentes (CARGNELUTTI et al, 2014). Sendo necessário o desenvolvimento de trabalhos que mostrem a importância da identificação dessas doenças, para a compreensão da epidemiologia e impacto sanitário de doenças vesiculares em bovinos.

As parapoxviroses normalmente são diagnosticadas, através de um conjunto de técnicas, envolvendo a observação dos sinais clínicos, isolamento do próprio agente em amostras, a detecção de anticorpos, até mesmo a visualização de partículas virais em ensaios de microscopia eletrônica e técnicas de PCR convencional (TORFASON, 2002). Contudo, esses métodos tradicionais geralmente estão associados a desvantagens, como baixa sensibilidade de detecção ou demorados protocolos (Wang et al, 2017).

Objetivou-se com o trabalho, padronizar e validar a reação qPCR, método rápido e sensível para detecção e confirmação da presença de agentes do gênero Parapoxvirus em amostras de rotina laboratorial veterinária.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Titulação da amostra padrão**

Como amostra teste foi utilizado vírus vivo padrão de Pseudovariola Bovina (PCPV), ATCC VR-634 na 4ª passagem em células de linhagem MDBK (Madin-Darby Bovine Kidney), mantido em criopreservação no banco criogênico do Laboratório de Vírus de Bovídeos (LVB), do Instituto Biológico de São Paulo. Após a ambientalização, a amostra pura sofreu diluições seriadas em base 10 ( $10^{-1}$  a  $10^{-8}$ ) em meio MEM, segundo método de Titulação descrito por Reed & Muench (1938), onde são distribuídos em placa, 50 µL de amostra e 50 µL de células MDBK (possibilitando determinar as TCIDs 50/50µLs), 8 repetições por amostra sempre em duplicata (resultando em 2 placas), e acondicionadas em estufa a 37°C durante 3 a 5 dias aguardando o efeito citopático. Após a avaliação do efeito em placa as amostras foram transferidas para eppendorfs e enviadas à extração.

### **2.2 Extração**

O processo de extração foi realizado utilizando diretrizes do método de extração por beads magnéticas (Mag\_Max™ Pathogen RNA/DNA Kit- Thermofisher®). Este método parte do princípio onde 200 µLs da amostra são expostos a uma solução de Lysis, que tem como objetivo básico romper as células e liberar o material genético para a suspensão, onde encontra-se partículas magnéticas (*beads*) que possuem afinidade pela carga polar do próprio material genético se aderindo ao mesmo. Após essa fase de inicial toda a solução é exposta as *Tips* magnéticas que atraem todas as partículas (aderidas as *beads*) para uma coluna imantada, que passara por processos conseguintes de lavagem, a fim de retirar qualquer resíduo que possa prejudicar a reação de qPCR, finalizando com o processo de eluição, que consiste na liberação do material genético em uma placa própria, gerando o material genético puro eluído.

### **2.3 Gradiente de Anelamento dos Primers**

Com o material genético extraído, foi necessário determinar qual a melhor temperatura, para que ocorra o anelamento dos primers utilizados na reação a fita de DNA do agente. Para determinar qual a temperatura ideal foi realizado PCR convencional em

várias temperaturas (57,4; 58,5; 60; 61,8; 64,4; 66,5; 67,8 e 68,6°C). A sequência da ciclagem foi a seguinte: 1º ciclo desnaturação a 95°C por 2min, seguida de 45 ciclos desnaturação a 95°C por 5seg, anelamento gradiente 20seg, extensão 72°C – 10seg e resfriamento a 4°C. A reação foi realizada utilizando termociclador BioRad® C100 Touch, com concentrações de reagente descritas no quadro 1. A corrida de PCR foi realizada usando marcador de 20 pbs, em gel de agarose 3%, imerso em TBE e corrente de 70V por uma hora.

**Quadro 1:** Reagentes da PCR convencional.

Master Mix Promega®	1X
Primer F Generic PPOX	0,4 µmol/L
Primer R Generic PPOX	0,4 µmol/L
Água ultrapura	-
Amostra	5 µL
Total da Reação	25 µL

Instituto Biológico de São Paulo 2019

#### 2.4 Concentração de Primer, Prob e Amostra na qPCR

Na determinação de tais concentrações utilizando o kit VetMAX™ -Plus (Thermofisher®) no QuantStudio 12K Flex Real Time PCR (Life Technology®), em concentração de primer (PPOX forward CGCGGTCTGGTCCTTG PPOX reverse CAGCATCAACCTCTCCTACATCA) 0,4; 0,6 e 0,8 µmol/L e Prob (PPOX probe CCACGAAGCTGCGCAGCAT) 0,2; 0,25; 0,3; 0,5; 0,6 e 0,8 µmol/L, em ciclagem de 95 °C 10 min 1cilo; 95°C 15 seg, 58°C 45 ciclos. Com a otimização da reação para os reagentes foram realizados testes para determinar qual o melhor volume de amostra, tendo sido testados 2, 3, 4 e 5 µLs, sendo os critérios utilizados para a escolha a precocidade dos *quantification cycle* (Cq), padrão de curva e mínimo ruído. Após a realização dos testes com as amostras padronizadas foram incluídas algumas amostras da rotina para se observar o comportamento destas nas concentrações determinadas.

#### 2.5 Sensibilidade, Repetibilidade e Reprodutibilidade

A sensibilidade é determinada através da, aplicação da reação para amostras em diluição seriada do vírus padrão ( $10^{-1}$  a  $10^{-8}$ ) em triplicata assim possibilitado a determinação do limiar de detecção e assim qual a sensibilidade desta reação. Para a

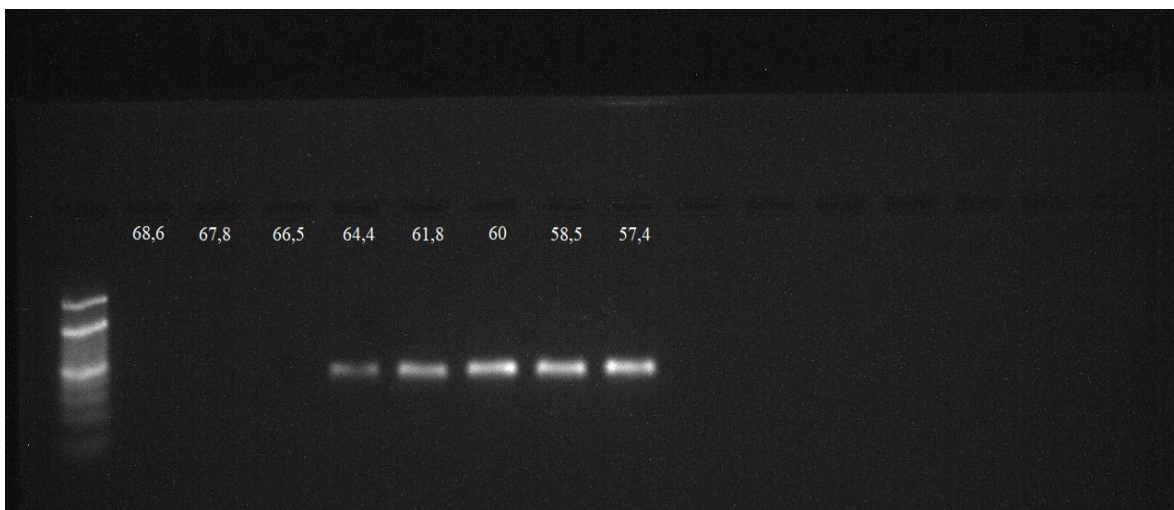
repetibilidade são realizados ensaios com mesma amostra em triplicata em diferentes dias (ao menos 3), utilizando sempre os mesmos padrões de diluição, método, matriz, threshold manual e threshold automático. A reprodutibilidade valida a possibilidade de outro técnico realizar o mesmo ensaio e obter resultados minimamente variáveis do determinado na padronização, normalmente realizada intralaboratorial onde técnicos diferentes executam o mesmo ensaio possibilitando a comparação dos resultados.

Para cada padrão anteriormente estabelecidos é realizada uma avaliação estatística de comparação de CQs determinada pelo Manual de verificação de desempenho de métodos para diagnóstico molecular de doenças infecciosas na rede nacional de laboratórios agropecuários (MAPA/ACS, 2015).

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÕES**

No processo de titulação viral, após apenas 24 hs já foi possível a visualização de efeito citopático, atingindo efeito total após 3 dias de incubação, alcançando títulos de  $10^{-4}$  TCID<sub>50</sub>/50 $\mu$ L (Doses Infectantes em Cultivo de Células) pelo método de Reed & Muench (1938).

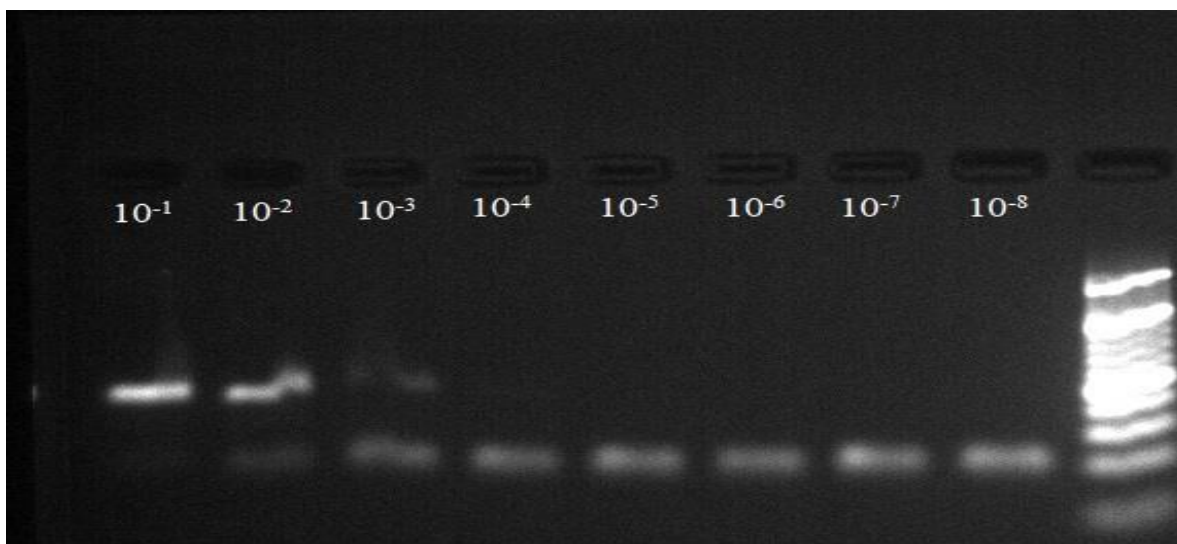
Após a extração as amostras foram utilizadas para determinar a temperatura de anelamento dos primers, através da realização do gradiente já citado, resultando em temperatura de 58,5 °C sendo mantido 58°C, justificado pela melhor banda formada em gel de agarose (Figura 1). Este resultado difere das temperaturas descritas por ZHAO, 2013; DAS, A et al, 2017 e YAEGASHI, G. el al, 2016 que encontraram temperatura de 60 °C, o que pode ser justificado pelas diferenças dentro do processo de validação, equipamentos, Master mix, e condições deferentes, que podem indiretamente interferir no valor determinado. Além do fato que temperaturas mais altas estão diretamente relacionadas com a maior especificidade de *annealin* (Green, 2015) o que também pode estar diretamente ligado com a diferença na temperatura encontrada.



**Figura 1-** Eletroforese PCPV, gradiente de anelamento. Corrida do PCPV em gel de agarose 3% com marcador de 20pbs. Fonte: Arquivo pessoal

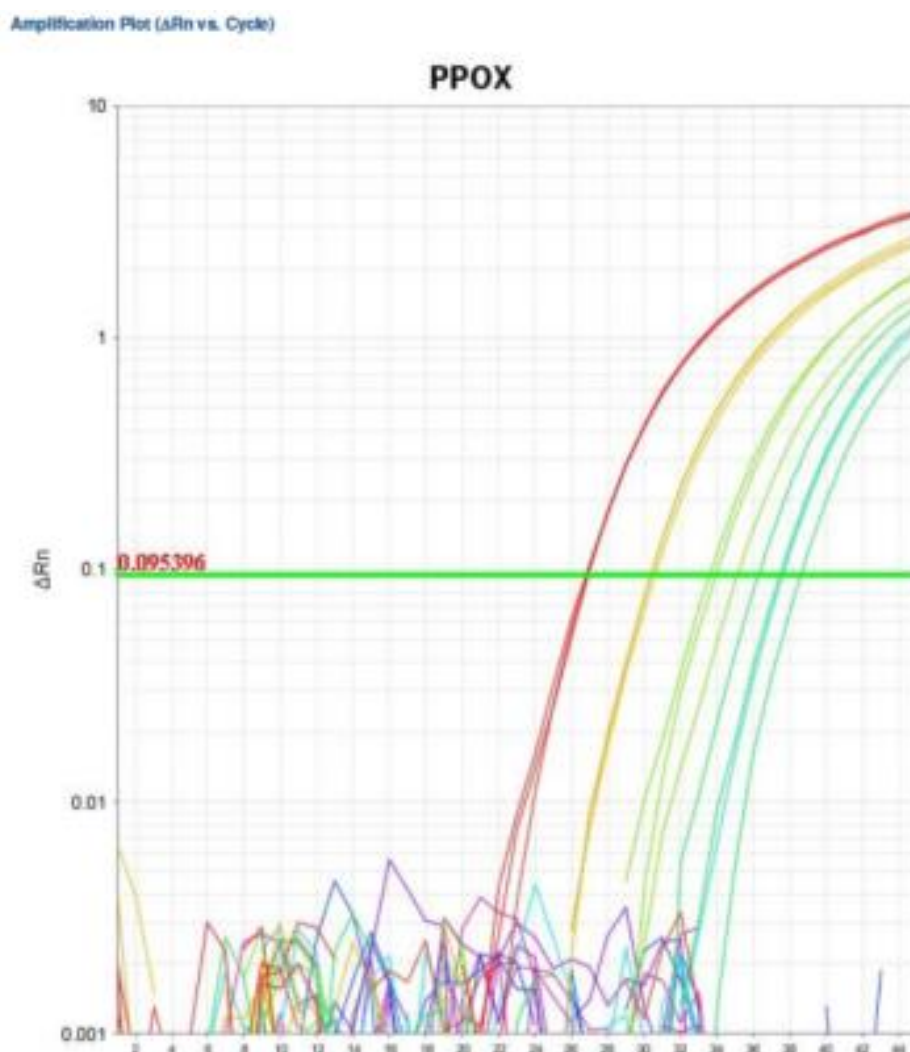
No processo de otimização da reação, o ajuste da concentração de primer e sonda foi harmonizado em um binômio de 0,6 pMol de primer e 0,25 pMol de sonda, ajustados para um volume de amostra de 2  $\mu$ Ls, resultado parcialmente similar ao observado por ZHAO, 2013 que também utilizou do mesmo volume de amostra porém com proporção de primer e sonda diferentes, diferença que pode estar relacionada com a concentração de material genético presente nas amostras, visto que no referido trabalho foram utilizadas amostras de campo sendo assim necessário maior quantidade de primer para melhor desempenho em curva.

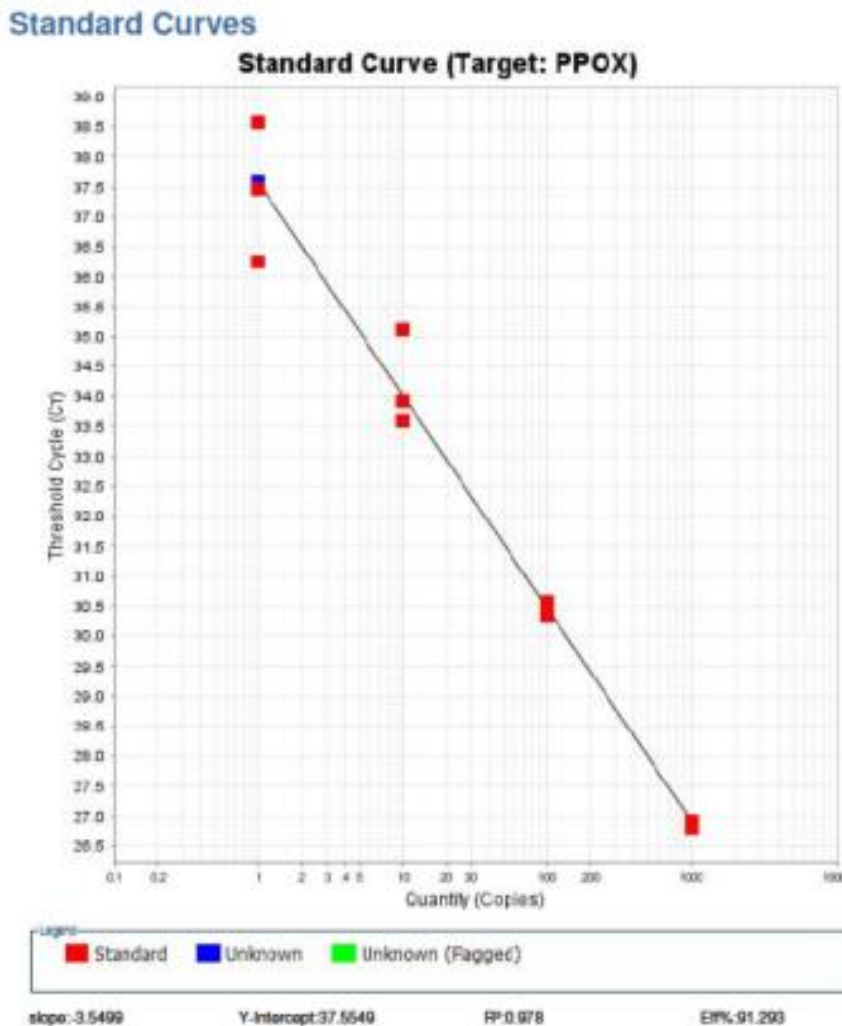
Nos testes de sensibilidade, os resultados de detecção foram de 1 TCID<sub>50</sub>/50 $\mu$ Ls (Figura 2), que mostra a alta sensibilidade do teste.



**Figura 2-** Eletroforese PCPV, sensibilidade. Teste de sensibilidade, determinação da detecção das TCIDs. Fonte: Arquivo pessoal

Com a sensibilidade determinada e a reação otimizada o mesmo foi submetido a testes em triplicata com o intuito de rodar a avaliação *standard*. A curva *standard* atingiu valores, eficiência de 91,398%, distancia (*slope*) entre as diluições virais de -3,547, com coeficiente de relação ( $R^2$ ) 0,948 (Figura 3), resultados satisfatórios, levando em consideração erros de pipetagem. Outro ponto que influi diretamente sobre os valores principalmente da eficiência, seria a presença de mais pontos na curva, ou seja se tornando necessário uma estirpe com títulos maiores.





**B**

**Figura 3-** Curva Padrão. **A** curva de padronização de qPCR; **B** gráfico linear de Curva Padrão. Fonte: Arquivo pessoal.

#### 4. CONCLUSÕES

Padronizou-se a qPCR para Parapoxvirus, podendo ser implementada na rotina de diagnóstico, como diferencial de doenças vesiculares, colaborando com o desenvolvimento científico, uma vez que Brasil caminha para ser livre de febre aftosa sem vacina. Evidenciando que diagnóstico rápido no atendimento de doenças vesiculares é vital para a tomada de decisão, mitigação e controle.

## 5. REFERÊNCIA

- Brasil. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Manual de verificação de desempenho de métodos para diagnóstico molecular de doenças infecciosas na rede nacional de laboratórios agropecuários / Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília 2015. 57p.
- Buttner M, Rziha HJ. Parapoxviruses: from the lesion to the viral genome. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2002;49:7–16.
- Cargnelutti, J. F. et al. Pseudovariola e estomatite papular em bovinos no Estado de Rondônia, Brasil. *Ciência Rural, Santa Maria*, v.44, n.3, p.479-485, mar, 2014.
- Das, A et al. Development and validation of a highly sensitive real-time PCR assay for rapid detection of parapoxviruses. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2017, Vol. 29(4) 499– 507.
- Green, S.J; Venkatramanan, R; Naqib, A. Desconstruindo a reação em cadeia da polimerase: entendendo e corrigindo o viés associado a degenerescências de primer e incompatibilidades de modelo de primer. *PLoS ONE* 10 (5), 2015
- Laguardia-Nascimento, M. et al. Spread of poxviruses in livestock in Brazil associated with cases of double and triple infection. Springer-Verlag Wien 2017.
- Megid, J. et al. Infecção Zoonótica por Vírus Vaccinia, Estado de São Paulo, Brasil. *Emerging Infectious Diseases* . 2012; 18 (1): 189-191.
- Reed, L.J.; Muench, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Hyg.*, v.27, p.493-497, 1938.
- Torfason, E. G; Guðnadóttir, S. Polymerase chain reaction for laboratory diagnosis of orf virus infections. *Journal of Clinical Virology* 24 (2002) 79–84.
- Wang, Y. et al. Development of a SYBR Green I real-time PCR for the detection of the orf virus. *AMB Express* 2017, 7 (1).
- Yaegashi, G. et al. Detection and quantification of parapoxvirus DNA by use of a quantitative real-time polymerase chain reaction assay in calves without clinical signs of parapoxvirus infection. *American Journal of Veterinary Research – AJVR*. Vol 77, No. 4, p.383-387, April 2016.
- Zhao, H., Wilkins, K., DAMON, IK, & Li, Y. (2013). Specific qPCR assays for the detection of orf virus, pseudocowpoxvirus and bovine papular stomatitis virus. *Journal of Virological Methods*, 194 (1-2), 229-234. doi: 10.1016 / j.jviromet.2013.08.027



## ANEXO - NORMAS PARA PUBLICAÇÃO EM REVISTA ARQUIVOS DO INSTITUTO BIOLÓGICO

**Artigo científico:** compreenderá os seguintes itens: título, nome do(s) autor(es), endereço do autor correspondente e local de origem dos demais autores, resumo em português, palavras-chave, título em inglês, abstract, keywords, introdução, material e métodos, resultados e discussão, conclusões, agradecimentos e referências.

**Apresentação:** os trabalhos deverão ser elaborados em Word (.doc ou .docx), página A4, com margens de 2,5 cm, fonte Times New Roman, tamanho 12, espaço duplo e páginas numeradas em sequência. As linhas deverão ser numeradas de forma contínua, utilizando a ferramenta Layout em Configurar Página. O máximo de páginas será 25 para artigos de revisão, 20 para artigos científicos e 10 para comunicação científica, incluindo tabelas e figuras.

**Título:** embora breve, deverá indicar com precisão o assunto tratado no artigo, focando a sua finalidade principal.

**Nome(s) e Endereço(s) do(s) autor(es):** Não deve constar do corpo do manuscrito, pois Arquivos do Instituto Biológico segue revisão por pares duplo cega. Essas informações devem ser inseridas no campo específico do sistema online de submissão.

**Resumo:** deverá apresentar concisamente o objetivo do trabalho, material e métodos e conclusões, em um único parágrafo. Não ultrapassar 250 palavras.

**Palavras-chave:** abaixo do resumo e separado por um espaço, citar no máximo cinco palavras-chave, separadas por vírgula. Não utilizar termos que apareçam no título.

**Abstract:** apresentar uma tradução para o inglês do título do trabalho e do resumo. A seguir, relacionar também em inglês as mesmas palavras-chave (keywords) já citadas. Não ultrapassar 250 palavras.

**Introdução:** descrever a natureza e o objetivo do trabalho, sua relação com outras pesquisas no contexto do conhecimento existente e a justificativa da pesquisa feita.

**Material e Métodos:** apresentar descrição breve, porém, suficiente para permitir uma repetição do trabalho. Técnicas e processos já publicados, exceto quando modificados, deverão ser apenas citados. Nomes científicos de espécies, bem como drogas, deverão ser citados de acordo com regras e padrões internacionais.

**Resultados:** apresentá-los acompanhado de tabelas e/ou figuras, quando necessário. As

tabelas e figuras devem ser inseridas após as referências.

**Discussão:** discutir os resultados obtidos comparando-os com os de outros trabalhos publicados (resultados e discussão poderão fazer parte de um único item).

**Tabelas e Figuras:** incluir título claro e conciso que possibilite o seu entendimento sem consultas ao texto. As tabelas não deverão conter linhas verticais. No texto, use a palavra abreviada (ex.: Fig. 3). As figuras devem estar no formato jpg (fotos) ou gif (gráficos e esquemas) e com tamanho inferior a 500 Kb. As figuras originais ou com maior resolução poderão ser solicitadas após o aceite. Devem ser enviadas em arquivos individuais e nomeadas de acordo com o número da figura. Exemplos: Fig1.gif, Fig2.jpg.

**Conclusões:** serão citadas em ordem de importância. Poderão constituir um item à parte ou serem incluídas na discussão.

**Agradecimentos:** poderão ser incluídas pessoas ou instituições. No caso de agência de fomento, deve-se incluir o número do processo do financiamento.

**Referências e citações no texto:** Citar apenas as referências estritamente necessárias para a compreensão do trabalho. Recomenda-se em torno de 25 referências para artigos e comunicações científicas. Citações no texto e referências estão diretamente vinculadas. Todos os autores citados devem figurar nas referências. A referência no texto deve seguir o sistema sobrenome do autor e ano de publicação e deverá estar em maiúscula, tal como: 1 autor - ALLAN (1979) ou (ALLAN, 1979); 2 autores – LOPES; MACEDO (1982) ou (LOPES; MACEDO, 1982); mais de 2 autores - BESSE et al. (1990) ou (BESSE et al., 1990); coincidências de autoria e ano de publicação - (CURI, 1998a), (CURI, 1998b) ou (CURI, 1998a, 1998b). As referências deverão ser baseadas na NBR 6023/2018, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), e estar em ordem alfabética de primeiro autor. A exatidão dos dados nas referências é de responsabilidade dos autores.