

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
CAMPUS URUGUAIANA
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**RELATÓRIO DO ESTÁGIO CURRICULAR
SUPERVISIONADO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

Orientador: Mário Celso Sperotto Brum

Laís Miranda Feio

Uruguaiana, dezembro de 2018

LAÍS MIRANDA FEIO

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR SUPERVISIONADO EM
MEDICINA VETERINÁRIA**

Relatório do Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária apresentado ao Curso de Medicina Veterinária, campus Uruguaiana da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientador: Médico Veterinário, Msc, Dr. Mário Celso Sperotto Brum.

**URUGUAIANA
2018**

LAÍS MIRANDA FEIO

Relatório do Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária apresentado ao Curso de Medicina Veterinária, campus Uruguaiana da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Área de concentração: Virologia Animal.

Relatório apresentado e defendido em 05 de dezembro de 2018.

Prof. Dr. Mário Celso Sperotto Brum
Medicina Veterinária/Universidade Federal do Pampa
Orientador

Prof. Dra. Carolina Kist Traesel
Medicina Veterinária/Universidade Federal do Pampa

Dra. Paula Fonseca Finger
Medicina Veterinária/Universidade Federal do Pampa

ESTÁGIO CURRICULAR SUPERVISIONADO EM MEDICINA VETERINÁRIA - ÁREA DE VIROLOGIA ANIMAL

O presente relatório descreve as atividades desenvolvidas e/ou acompanhadas durante a realização do Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária. Este foi realizado no Setor de Virologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), situado na cidade de Santa Maria, RS, sob supervisão do prof. Msc, Dr. Rudi Weiblen. Realizou-se estágio durante os dias 06 de agosto de 2018 e 01 de novembro de 2018, perfazendo um total de 450 horas. Abrangeu técnicas da virologia clássica como, manutenção de cultivo celular, imunofluorescência, hemaglutinação, inibição da hemaglutinação, e soroneutralização, assim como técnicas da virologia molecular, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), ambas voltadas tanto para o diagnóstico, quanto para a área de pesquisa. Também foi possível o acompanhamento de atividades como aulas da graduação, assim como a realização de curso de Técnicas de Diagnóstico Viroológico, e a participação na execução de um projeto de mestrado.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|----|
| Figura 1. Prédio do Setor de Virologia, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva. . | 12 |
| Figura 2. Sala de cultivo celular (A) e de vírus e sala da biologia molecular (B)..... | 13 |
| Figura 3. Demonstração do espelho de uma placa de titulação viral. | 20 |
| Figura 4. Papilomas limpos e cortados (A); Vacinas prontas e envasadas (B). | 21 |
| Figura 5. Espectrofotômetro utilizado para leitura da absorbância das placas de ELISA..... | 25 |
| Figura 6. Visualização das bancas de amplificação no gel de agarose..... | 30 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Atividades acompanhadas e desenvolvidas durante a realização do Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária..... | 15 |
| Tabela 2. Resultados obtidos pelo teste ELISA das amostras de monitoramento e das amostras de exportação..... | 33 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-----------------|---|
| % | Porcentagem/ por cento |
| °C | Grau <i>Celsius</i> |
| μL | Microlitro |
| ACMs | Anticorpos Monoclonais |
| ATB | Antibiótico |
| BABS | Albumina sérica bovina |
| BLV | Vírus da Leucose Bovina |
| BVDV | Vírus da Diarreia Viral Bovina |
| BoHV-1 | Herpesvírus bovino tipo 1 |
| cDNA | Ácido desoxirribonucleico complementar |
| CO ₂ | Dióxido de carbono |
| CRFK | Célula de Rim Felino |
| CRIB | Células refratárias ao BVDV |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| dNTP | Desoxirribonucleotídeos fosfatados |
| ECP | Efeito citopático |
| ECSMV | Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária |
| ELISA | Ensaio de imunoabsorção enzimática |
| IBR | Rinotraqueíte Infecciosa Bovina |
| ICC | Inoculação em cultivo celular |
| ICTV | <i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i> |
| IDGA | Imunodifusão em gel de ágar |
| IFI | Imunofluorescência indireta |
| MDBK | Célula de Rim Bovino |
| MEM | Meio Essencial Mínimo |
| mL | Mililitro |

| | |
|--------------------|---|
| ORF | <i>Open reading frame</i> |
| PBS | Solução Salina Fosfatada Tamponada |
| PCR | Reação em Cadeia da Polimerase |
| PI | Persistentemente infectado |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| RPM | Rotações por minuto |
| RPMI | Roswell Park Memorial Institute |
| SDS | Dodecil sulfato de sódio |
| Seq | Soro equino |
| SFB | Soro fetal bovino |
| SN | Soroneutralização |
| SV | Setor de virologia |
| Taq | <i>Thermus aquaticus</i> |
| TCID ₅₀ | <i>Tissue culture infection dose</i> |
| TE | Tampão de eluição |
| UHA | Unidade hemaglutinante |
| UTRs | <i>Untranslead region</i> |
| VAD | <i>Virus adjust diluent</i> |
| VERO | Células renais de macaco verde africano |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 – INTRODUÇÃO | 11 |
| 2- ATIVIDADES DESENVOLVIDAS | 12 |
| 2.1 – Equipe | 12 |
| 2.2 – O local de estágio..... | 13 |
| 2.3 - Rotina Laboratorial..... | 14 |
| 2.4 - Principais Técnicas Desenvolvidas | 15 |
| 2.4.1 - Manutenção de Cultivo Celular | 15 |
| 2.4.2 - Cultivo celular primário..... | 17 |
| 2.4.3 - Amplificação Viral..... | 18 |
| 2.4.4 - Titulação viral | 19 |
| 2.4.5 - Vacina contra papilomatose..... | 20 |
| 2.4.6 - Hemaglutinação e Inibição da Hemaglutinação | 22 |
| 2.4.7 - Imunofluorescência (IFA)..... | 23 |
| 2.4.8 - Soroneutralização (SN)..... | 24 |
| 2.4.9 – ELISA..... | 24 |
| 2.4.10 - Extração de DNA..... | 26 |
| 2.4.11 - Extração de RNA e síntese de cDNA | 27 |
| 2.4.12 - Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) | 28 |
| 2.4.13 – Eletroforese | 29 |
| 3 – DISCUSSÃO | 31 |
| 3.1 – ELISA | 31 |
| 3.1.1 – Vírus da Leucose Enzoótica Bovina (BLV)..... | 31 |
| 3.1.2 – Diagnóstico do vírus da Leucose Enzoótica Bovina (BLV) pela técnica de ELISA | 33 |

| | |
|---|----|
| 3.2 – Projeto “Caracterização antigênica e genética da porção terminal N da glicoproteína E2 a partir de isolados do vírus da diarreia viral bovina no Rio Grande do Sul” | 35 |
| 3.2.1 – Vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) | 35 |
| 3.2.2 – “Caracterização antigênica e genética da porção terminal N da glicoproteína E2 a partir de isolados do vírus da diarreia viral bovina no Rio Grande do Sul” | 37 |
| 4 – CONCLUSÃO | 40 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 41 |
| ANEXO A – Certificado de Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária.... | 44 |

1 – INTRODUÇÃO

Os vírus são os micro-organismos menores e mais simples que existem e são parasitas intracelulares obrigatórios, uma vez que necessitam da maquinaria celular para a sua multiplicação. Estes são causadores das mais variadas doenças em animais, plantas e humanos, sendo importante seu diagnóstico correto e precoce para a manutenção da sanidade e a diminuição do possível impacto econômico gerado por eles (FLORES, 2017).

O processo de diagnóstico depende diretamente da colaboração mútua entre o veterinário de campo e o laboratorista. Isto facilita que a amostra seja coletada, transportada e processada corretamente para a realização de um teste diagnóstico adequado (FLORES, 2017). Todo esse procedimento evita possíveis erros no resultado e possibilita o direcionamento adequado de tratamento ou outras medidas de controle e prevenção mais adequada à situação.

Além do diagnóstico, as técnicas de virologia permitem a caracterização destes agentes, possibilita o conhecimento de como replicam e interagem com o hospedeiro. Ainda, estes estudos de identificação e caracterização de amostras virais são fundamentais para identificação de variantes e na elaboração de vacinas, por exemplo.

O Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária (ECSMV) foi realizado na área de Virologia Veterinária, com a orientação do professor Mário Celso Sperotto Brum. O local escolhido para o desenvolvimento foi o Setor de Virologia (SV), Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), situada na cidade de Santa Maria, Avenida Roraima, nº 1000, prédio 63A, com a supervisão do professor Rudi Weiblen. Este ocorreu no período de 06 de agosto de 2018 a 01 de novembro de 2018. A escolha da área de concentração do ECSMV deu-se por interesse profissional, devido ao fato de que esta possui grande relevância no que tange a sanidade e bem estar animal.

2- ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

Durante o ECSMV, foi possível acompanhar e executar diversas técnicas de virologia, empregadas para o diagnóstico e/ou pesquisa. As técnicas de virologia clássica como manutenção de cultivo celular, até as da virologia molecular, como a PCR. Adicionalmente, foi possível participar da disciplina de Diagnóstico Viroológico Aplicado, ofertada para o curso de Medicina Veterinária da UFSM e do curso de Técnicas Básicas de Diagnóstico Viroológico. Ambos consistiam em aulas teóricas sucedidas por aulas práticas sobre cada técnica executada no setor. A seguir serão descritas as principais técnicas acompanhadas durante o período de estágio, bem como uma breve descrição do local (Figura 1) e sua rotina.



FIGURA 1. Prédio do Setor de Virologia, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva.

2.1 – Equipe

No momento da realização do estágio, a equipe do SV era constituída por dois professores, um pós doutorando, cinco doutorandos, seis mestrandos, uma residente, um responsável pelo diagnóstico, uma responsável pelo apoio técnico, duas estagiárias curriculares e sete estagiários da rotina (bolsistas de iniciação científica).

2.2 – O local de estágio

O Setor de Virologia (SV) é responsável pelo diagnóstico e pesquisa de diversos agentes virais de enfermidades de animais domésticos e, para isto, conta com uma estrutura própria, um prédio de três andares. Adicionalmente, no SV também são ministradas aulas de graduação e pós-graduação. No primeiro andar do prédio está localizada: i) recepção (local para receber as amostras entregues por tutores ou veterinários); ii) sala de diagnóstico (onde as amostras para o diagnóstico são armazenadas e/ou processadas); iii) sala de lavagem e esterilização (onde realizava-se a lavagem, embalagem e esterilização do material de rotina); iv) sala refrigerada (onde ficam os freezers que armazenam as alíquotas de vírus, kits de ELISA, vacinas e outros reagentes que necessitam de refrigeração constante); v) sala de cultivo celular e viral (subdividida em três áreas: cultivo celular, cultivo viral e imunofluorescência/imunocitoquímica); vi) sala de biologia molecular (onde realizavam-se as técnicas de biologia molecular); vii) sala de meios e mix (subdividida em duas: onde preparavam-se os meios utilizados na rotina laboratorial e onde preparavam-se os mix de PCR). As salas de cultivo celular e viral e a biologia molecular estão demonstradas na Figura 2.



FIGURA 2. Sala de cultivo celular (A) e de vírus e sala da biologia molecular (B).

Ainda neste andar, tem-se a Sala Escura, que possui o microscópio de epifluorescência e o ovoscópio. A sala de Biossegurança para manuseio de amostras de animais com suspeita de raiva. E, por fim, o almoxarifado e a sala de estudantes.

No segundo andar encontra-se a sala dos alunos da pós-graduação e as salas dos professores e o refeitório. Já no terceiro andar, é onde fica o auditório, onde ocorrem aulas da graduação e pós graduação, e um segundo almoxarifado.

2.3 - Rotina Laboratorial

O atendimento ao público no SV acontecia de segunda a sexta-feira das 8 às 12 horas, e das 13:30 as 17:30. Os proprietários ou veterinários entregavam na recepção as amostras que eram protocoladas, armazenadas a -20°C e testadas de acordo com a requisição e o histórico entregue pelos mesmos. Cada amostra recebida no laboratório era protocolada com uma identificação numérica. A numeração atribuída era dada de acordo com a ordem cronológica de recebimento no laboratório, seguida do ano (SV 001/18, SV 002/18...). Estes registros eram armazenados em um caderno e no computador.

O diagnóstico era conduzido pelos alunos da iniciação científica supervisionado por um aluno de pós-graduação. As técnicas executadas na rotina laboratorial eram: ELISA para diagnóstico de Leucose Enzoótica Bovina; SN para Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR) e Diarreia Viral Bovina (BVDV), PCR para diversas enfermidades, a exemplo da Cinomose canina (CDV); Isolamento em Cultivo Celular (ICC) e vacina autógena contra papilomatose.

A primeira tarefa do dia consistia no auxílio da lavagem do material (vidraria, porcelana, material cirúrgico, plásticos...) e na esterilização do mesmo. Para isso, os materiais cirúrgicos e de vidro eram destinados ao forno, enquanto os materiais de/com plástico/borracha e porcelana eram autoclavados. Também realizava-se a organização do material já estéril. Após cumprida esta etapa, cada estagiário se destinava a sua atividade de rotina. As atividades realizadas durante o ECSMV estão apresentadas na Tabela 1.

TABELA 1. Atividades acompanhadas e desenvolvidas durante a realização do Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária.

| Atividade | Número de vezes executada | Porcentagem (%) |
|---|----------------------------------|------------------------|
| Amplificação viral | 5 | 5 |
| Cultivo celular primário | 3 | 3 |
| Cultivo celular secundário | * | - |
| Curso Técnicas Básicas de Diagnóstico Viroológico | ** | - |
| Disciplina de Diagnóstico Viroológico Aplicado | ** | - |
| ELISA | 11 | 11 |
| Extração de DNA | 6 | 6 |
| Extração de RNA; cDNA | 17 | 17 |
| Hemaglutinação | 3 | 3 |
| Inibição da hemaglutinação | 3 | 3 |
| Imunofluorescência | 2 | 2 |
| Lavagem e esterilização do material de rotina | * | - |
| PCR e Eletroforese | 11 | 11 |
| Preparo de amostras para sequenciamento | 3 | 3 |
| Purificação de amostras | 3 | 3 |
| Recebimento e processamento de amostras | 4 | 4 |
| Soroneutralização | 8 | 8 |
| Titulação Viral | 3 | 3 |
| Vacina contra papilomatose | 18 | 18 |
| TOTAL | 100 | 100 |

* atividade realizada diariamente

** atividade semanal

2.4 - Principais Técnicas Desenvolvidas

2.4.1 - Manutenção de Cultivo Celular

O SV possui uma diversa gama de linhagens celulares, dentre elas, pode-se citar as células de rim bovino (MDBK), células renais de macaco verde africano (VERO), células de rim canino (MDCK), células de rim felino (CRFK), células refratárias ao BVDV (CRIB),

assim como cultivos celulares primários oriundos de diversos espécimes animais, a exemplo de células de testículos bovinos.

As células que estavam sendo utilizadas pelos laboratoristas no período de estágio se encontravam em garrafas de cultivo celular (T-25, T-75 e T-150) com Meio Essencial Mínimo (MEM) ou Meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI), dependendo do tipo celular; suplementadas com Soro Fetal Bovino (SFB) ou soro equino (SEq), e mantidas em estufa com 5% de CO₂ a 37°C. O SV também dispõe de um banco de células congeladas, possibilitando que se recupere e descongele as mesmas para uso de acordo com a necessidade.

Sendo assim, para a manutenção do cultivo celular, é necessário compromisso e disciplina, uma vez que após atingir próximo de 100% de confluência do tapete, é necessário que se faça um repique, para que elas possuam espaço para continuar se multiplicando. Isto implica em programação e organização, especialmente com relação aos finais de semana e feriados.

2.4.1.1 – Manutenção de cultivos celulares: Repique celular

O repique celular era feito, em média, a cada dois a três dias, dependendo do metabolismo das células em questão. Para isso, retirava-se todo o sobrenadante da garrafa, com pipeta de vidro e desprezava-se no descarte, para então efetuar-se uma lavagem com tripsina, com o intuito de retirar todos os resquícios de meio e soro. Após, adicionava-se tripsina e incubava a 37°C, em torno de 10 minutos. A tripsina promove a individualização celular e, este procedimento é denominado de tripsinização.

Retirada a garrafa da estufa, realizava-se a homogeneização, aspirando e desprezando o conteúdo, de forma a desprender qualquer célula que ainda se encontrasse aderida na superfície da garrafa e a individualizar os grumos celulares. Em seguida, desprezava-se o volume sobressalente de células e adicionava-se meio e 10% de soro. Esta recebia devida identificação, contendo o tipo celular, a quantidade de soro utilizado, a data e o número da passagem realizada. O volume excedente de células pode ser utilizado para a amplificação celular, possibilitando a confecção de novas garrafas, placas ou lâminas.

2.4.1.2 - Contagem celular

Para a confecção de novas garrafas e/ou placas de cultivo celular, realiza-se a contagem celular para ajustar a concentração de células com relação a área do frasco de cultivo. Desta forma se obtinha a confluência ideal da monocamada de células para o uso posterior.

A contagem celular no Setor de Virologia era realizada principalmente antes de inoculações ou na preparação de placas de SN. Onde, após a tripsinização, fazia-se uma pré-diluição na proporção 1:5 (400 µL de MEM e 100 µL da suspensão celular). Esta diluição era adicionada à uma câmara de Neubauer já montada e colocada no microscópio para a contagem. Contavam-se os quatro quadrantes externos e fazia-se a média entre eles.

Já para a obtenção da quantidade de células (células/mL), fazia-se o seguinte cálculo: Média da contagem x Fator de diluição (5) x 10^4 (área da câmara de Neubauer). Posterior a isto, checava-se a quantidade desejada de células e realizava-se o cálculo de diluição, com a seguinte fórmula:

$$C1 \times V1 = C2 \times V2, \text{ onde}$$

C1 é a concentração inicial (células por mL)

V1 é o volume inicial (volume desejado)

C2 é a concentração final (o que se deseja para a garrafa e/ou placa)

V2 não se aplica, uma vez que a célula é um sedimento e independe do volume final.

2.4.2 - Cultivo celular primário

O laboratório dispõe de cultivo celular primário e cultivo celular secundário. As células mais utilizadas na rotina e pesquisa são as do cultivo secundário, uma vez que estas perduram por mais repiques, sendo mais prático para os laboratoristas. Uma cultura primária é estabelecida a partir do crescimento de células oriundas de um fragmento de tecido/órgão obtido por desagregação mecânica ou enzimática. As células que conseguirem sobreviver ao processo de desagregação e aderirem à garrafa formarão a primeira monocamada de células daquele tecido. Essas células possuem as características do tecido de origem, podem crescer em cultura por um determinado período de tempo e são denominadas células primárias. (ALVES; GUIMARÃES, 2010).

Em contrapartida, de acordo com Alves e Guimarães (2010), o cultivo celular secundário, são células que sobrevivem ao processo de renovação tecidual (apoptose) e, mesmo com os repiques celulares, ainda possuem melhores taxas de proliferação e não perdem completamente as características do tecido de origem.

O cultivo celular primário realizado durante o ECSMV foi obtido a partir de testículos bovinos oriundos da castração de bezerros, uma vez que células de animais jovens tem maior taxa de mitose. No primeiro momento, lavou-se o órgãos em PBS 1x para a retirada de sujidades e hemácias. Depois disto, retirou-se a túnica vaginal do testículo e picou-se com lâmina de bisturi. O tecido foi colocado em *becker* estéril contendo tripsina, o suficiente para cobri-lo e, então, deixado na incubadora com agitação orbital em a 37°C/30 minutos.

Posteriormente, o sobrenadante foi filtrado em gaze estéril e transferido para um frasco e centrifugado. Após centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o pellet ressuspendido com 1 mL de MEM 2x antibiótico (ATB), colocado em garrafa T-25, adicionada de 3 mL de MEM e 1 mL de soro. O processo de obtenção de células foi repetido até o esgotamento do material.

2.4.3 - Amplificação Viral

O processo de amplificação viral é utilizado com o intuito de amplificação do estoque, que poderá ser utilizado em técnicas de diagnóstico, produção de vacinas, inoculações, experimentos e estudos de patogenia. Para isso, preparava-se uma garrafa com células no dia anterior (tipo celular escolhido de acordo com o a espécie do vírus testado), com o objetivo de se obter de 60 a 70% de confluência da monocamada. Almejava-se esta confluência, uma vez que o vírus se utiliza da maquinaria celular para o processo de replicação, o que garante maior eficiência na amplificação da amostra.

A solução de vírus utilizada como inóculo deve ser livre de contaminantes. Para a inoculação, utilizava-se o mínimo de volume suficiente para cobrir a superfície da garrafa, variando de acordo com o tamanho da mesma, podendo atingir até 3 mL.

Primeiramente, retirava-se todo o conteúdo da garrafa, substituindo-o pelo inóculo. Em seguida, a garrafa era colocada em um *shaker* por duas horas, em temperatura ambiente para ocorrer a adsorção. O processo de adsorção é independente de energia e do metabolismo celular e ocorre com a mesma eficiência à temperatura corporal ou a 4° C (FLORES, 2017). Passadas as duas horas, adicionava-se meio e soro.

A garrafa era observada diariamente e quando o efeito citopático (ECP) estava próximo de 100% (em média dois dias depois da inoculação), colocava-se a mesma no freezer horizontal a -80°C para congelar. Segundo Flores (2017), entende-se efeito citopático como alterações morfológicas celulares associadas com a replicação viral.

Por fim, a mesma era descongelada e aliqüotada em microtubos. Estes eram identificados com o nome do responsável, a passagem que o vírus se encontrava, a data da amplificação e o nome do vírus ou amostra.

2.4.4 - Titulação viral

A realização de várias técnicas virológicas requer o conhecimento da quantidade de partículas víricas presente no material. O procedimento de quantificação é denominado titulação, e o valor obtido é dito título viral (BRUM; WEIBLEN, 2017). O título pode ser obtido a partir da diluição limitante em placa de 96 poços, também conhecida como titulação por esgotamento.

O título era calculado a partir do resultado da diluição por esgotamento realizado em microplacas de 96 cavidades. Cada microplaca contém oito linhas (A - H) e 12 colunas (1 - 12). Primeiramente, realiza-se uma diluição seriada da amostra viral a ser titulada. Para isso preparava-se oito microtubos contendo $900\ \mu\text{L}$ de MEM cada, seguido da adição de $100\ \mu\text{L}$ de solução viral no primeiro microtubo, que era homogeneizado (diluição 10^{-1}) e $100\ \mu\text{L}$ desta era repassado para o segundo (diluição 10^{-2}) e, assim sucessivamente, até chegar no oitavo (diluição 10^{-8}), onde após homogeneizar, desprezava-se $100\ \mu\text{L}$.

Posteriormente, adicionava-se $50\ \mu\text{L}$ de MEM em cada poço da placa. As diluições ($50\ \mu\text{L}$) eram pipetadas em cada coluna (8 réplicas), sendo a disposição da placa a seguinte: cada diluição em uma coluna de A à H, começando em ordem crescente a partir do microtubo 3 até o 7, reservavam-se as colunas 6 e 7 para o controle celular e recomeçando em ordem decrescente do microtubo sete ao 3, como demonstrado a seguir (Figura 3).

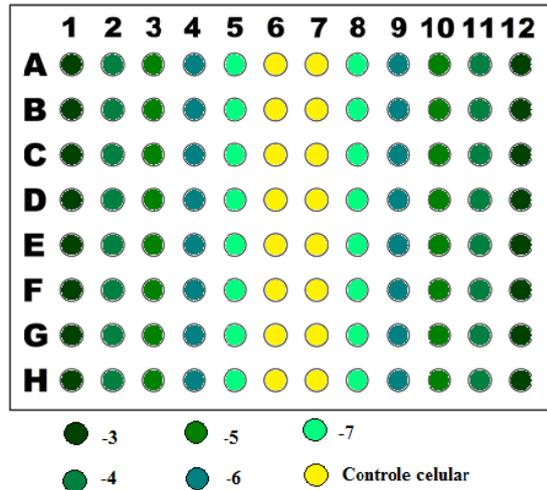


FIGURA 3. Demonstração do espelho de uma placa de titulação viral.

Por fim, adicionava-se 50 μ L de solução de célula em toda placa e incubava-se a placa em estufa de CO₂ por 96 horas. O resultado é dependente do aparecimento de efeitos citopáticos (ECP), que são identificados e considerados para o cálculo do título pelo Método de Reed & Munch.

De acordo com Brum & Weiblen (2017), o título viral é expresso como a recíproca da maior diluição capaz de produzir infecção (ECP ou antígenos virais) em 50% dos cultivos e a unidade será TCID₅₀ (*tissue culture infection dose*).

2.4.5 - Vacina contra papilomatose

O Setor de Virologia também é responsável pela produção de vacina experimental autógena contra a papilomatose bovina, equina e canina. A papilomatose é caracterizada pelo aparecimento de lesões tumorais na pele dos animais, podendo ocasionar diminuição de produção, de acordo com o lugar que se encontra no animal (OLIVEIRA; MORAIS; NETO, 2007).

Para a produção da mesma, ao receber os papilomas no laboratório, lavava-se em água corrente, retirava-se as sujidades e pesava-se para a determinação da quantidade de vacina que poderia ser produzida. Para equinos e bovinos, o protocolo indica o uso de 4,5 g de papiloma por vacina e para caninos indica-se o uso de 0,6 g por vacina. E dependendo da quantidade total de lesões, optava-se por macerar utilizando cadinhos e pistilo ou pelo uso do liquidificador.

Feito isto, o papiloma era colocado em recipiente estéril e adicionado de 10% do volume do material de solução de Hanks, ou seja, a cada 1g de material, adicionava-se 10 mL de solução balanceada de Hanks. Sendo assim, utilizava-se 50 mL de solução de Hanks para cada vacina, para que não faltasse volume no final do processo.

Em seguida, adicionava-se clorofórmio (4,5 mL) para a inativação das partículas víricas e lise das células, e após agitar bastante, congelava-se a -20°C *overnight*. No dia seguinte, pela manhã, retirava-se o recipiente do freezer e após o total descongelamento, centrifugava-se a 3500 rpm/10 min. Então o sobrenadante era coletado, transferido para um frasco estéril e acrescido de 0,5 mL de formol a 1% (que auxilia na conservação da vacina) e 1% de penicilina e estreptomicina. O controle de esterilidade era realizado pelo envio para exame bacteriológico. Posterior a isto, armazenava-se esta solução a 4°C por 24 horas. Após isso, ela era envasada, tampada e congelada (Figura 4).



FIGURA 4. Papilomas limpos e cortados (A); Vacinas prontas e envasadas (B).

2.4.6 - Hemaglutinação e Inibição da Hemaglutinação

A técnica de hemaglutinação (HA) acompanhada era com o objetivo de titular o vírus da parvovirose canina, previamente à inibição da hemaglutinação (HI). Ambas são realizadas para vírus que possuem a capacidade de aglutinar hemácias, a exemplo do parvovírus canino e influenza equina.

A hemaglutinação é o resultado da ligação de glicoproteínas da superfície dos vírions, denominadas genericamente de hemaglutininas, com os receptores da superfície dos eritrócitos. Essa ligação, quando realizadas em uma placa em fundo V, impedem a sedimentação das hemácias, que acabam formando uma rede na superfície do poço (FLORES; CARGNELUTTI, 2017). No caso da parvovirose canina, utilizavam hemácias de suíno, que depois de clarificadas, eram diluídas em tampão VAD, possibilitando seu armazenamento em até 5 dias.

2.4.6.1 - Hemaglutinação para parvovírus canino

A HA era feita com a adição de 50 μ L solução tampão (BABS) em toda placa, mais o vírus (no primeiro orifício das linhas A, C, E e G), que era diluído em duas linhas, numa proporção 1:2, iniciando na diluição 1:2, 1:4, 1:8, assim sucessivamente (até a coluna 1:4.194.304), uma vez que o vírus da parvovirose canina possui títulos muito altos. Comumente, testavam-se quatro vírus por placa, contudo, também pode-se optar pelo teste em quadruplicata do mesmo vírus em uma placa. Após diluído, a coluna 12 era reservada para o controle de hemácias, que continha apenas a solução tampão e hemácias.

Por fim, incubava-se a 4°C durante 12 horas. E a maior diluição capaz de aglutinar as hemácias, correspondia a uma unidade hemaglutinante (UHA). Contudo, a quantidade utilizada para a HI são oito unidades hemaglutinantes, para isso, dividia-se a diluição de 1 UHA por 8.

2.4.6.2 - Inibição da Hemaglutinação para parvovírus canino

Enquanto a HA é um teste de quantificação do vírus, a HI é um teste sorológico. Para a realização da mesma, adicionava-se solução BABS em toda placa, seguido do soro a ser testado, no mesmo esquema utilizado na HA (linhas A, C, E e G). Estes eram diluídos em

base 5 (1:5, 1:10, 1:20 e, assim sucessivamente) até a coluna 11 (1:5.120). A coluna 12 era reservada para o controle de hemácias (A12 até D12) e controle do vírus (E12 até H12).

Após a diluição do soro, adicionava-se suspensão de vírus (25µL) contendo 8 UHA/poço, exceto nos orifícios que seriam o controle de hemácias. E, em seguida, incubava-se a placa por duas horas a 37°C. Passadas esse tempo, adicionava-se suspensão de hemácias em toda placa, e esta era incubada a 4°C durante 12 horas. Na leitura, obtinha-se como título a maior diluição do soro capaz de impedir a hemaglutinação.

2.4.7 - Imunofluorescência (IFA)

A IFA era realizada na rotina para certificação da ausência de contaminação por BVDV das células susceptíveis (MDBK) ou como teste complementar ao isolamento em cultivo celular (ICC). Esta técnica também é utilizada em projetos de pesquisa. As IFAs acompanhadas eram parte do projeto intitulado “Caracterização antigênica e genética da porção terminal N da glicoproteína E2 a partir de isolados do vírus da diarreia viral bovina no Rio Grande do Sul”.

A imunofluorescência em si, é uma reação dependente da relação e formação do complexo antígeno-anticorpo. E, para a detecção desta, utilizam-se anticorpos marcados. Entre os marcadores mais comumente empregados, podem-se citar os fluorocromos (AOKI, 2010). No SV utilizava-se o isotiocianato de fluoresceína (FITC).

As células a serem testadas eram colocadas em lâminas *multispot* específicas para a técnica. Estas ficavam aderindo em estufa a 37°C por, no mínimo, duas horas, e depois fixadas em acetona.

A técnica utilizada era a de imunofluorescência indireta (IFI), que consistia na adição de um anticorpo primário específico (monoclonal), incubação (uma hora) e a subsequente lavagem para remoção dos anticorpos não aderidos. Após isto, adicionava-se o anticorpo secundário (anti IgG de camundongo, conjugado com FITC), seguida de incubação. Ao término destas etapas, lavava-se novamente a lâmina em PBS e água, para então corar com *Evans Blue*.

A leitura era feita em microscópio de epifluorescência. As células que apresentavam a coloração avermelhada eram consideradas negativas, enquanto as células de coloração amareladas/esverdeadas eram consideradas positivas.

2.4.8 - Soroneutralização (SN)

O teste de SN é utilizado para se detectar anticorpos que possuem capacidade de neutralizar a infectividade do vírus (FLORES; CARGNELUTTI, 2017). É um teste sorológico que consiste na formação do complexo antígeno-anticorpo, impedindo a penetração do vírus nas células, por conta disso, impede a sua replicação. Ou seja, a ausência de efeitos ou replicação viral, indica a presença de anticorpos (amostra positiva para anticorpos) e a presença de efeitos, indica a ausência de anticorpos (amostra negativa para anticorpos).

Para isso, colocava-se MEM na placa de 96 cavidades, adicionava-se os soros testes, e diluíam-se os mesmos, de acordo com o vírus testado (1:5 até 1:320 para BVDV e 1:2 até 1:256 para BoHV). Em seguida, a solução viral era preparada e adicionada em uma quantidade aproximada de vírus (100 TCID₅₀/50 µL) e após isto, a placa era incubada a 37°C, em estufa com 5% de CO₂, durante duas horas. Em seguida, adicionava-se solução de células e a placa voltava para estufa, onde permanecia durante 48 a 96 horas, dependendo da biologia de cada vírus. As células utilizadas para o teste de SN eram MDBK para as amostras suspeitas de BVDV e células CRIB para as amostras suspeitas de BoHV-1.

O resultado era obtido a partir da leitura da placa em microscópio, onde identificava-se até qual diluição o soro do animal era capaz de inibir a formação de ECP, sendo esta a titulação de anticorpos.

2.4.9 – ELISA

ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) ou teste de imunoabsorção enzimática é um teste que consiste na detecção da relação antígeno-anticorpo através de uma reação enzimática que produz mudança de cor (BRUM; WEIBLEN, 2017). Esta era analisada em espectrofotômetro (*Multiskan FC - Thermo Scientific*), que lê a absorbância do mesmo e indica a positividade ou negatividade, como demonstrado na Figura 5. Esta técnica pode detectar antígeno ou anticorpo, dependendo da configuração da reação. O ELISA pode ser desenvolvido pelo próprio laboratório ou então adquirido comercialmente.



FIGURA 5. Espectrofotômetro utilizado para leitura da absorbância das placas de ELISA.

O SV realiza o diagnóstico para a Leucose Enzoótica Bovina, com o uso do *kit* da IDvet (*ID Screen® BLV Competition*) que é um ELISA de competição para a detecção de anticorpos anti-BLV em amostras de soro. Neste *kit*, o que já vem fixado na placa é o antígeno, que é uma glicoproteína do envelope do vírion (gp51). Esta mesma glicoproteína já vinha sendo utilizada nos testes de IDGA, tanto sozinha, quanto em consórcio com uma proteína do capsídeo (p24).

De acordo com o protocolo da IDvet, adicionava-se uma solução tampão, seguido dos controles positivo e negativo, em duplicata, nas cavidades da placa, para então se adicionar as amostras a serem testadas. As placas de ELISA possuem uma peculiaridade de ter colunas (*strips*) destacáveis, possibilitando que se utilize apenas o número de colunas compatíveis com o número de amostras. Feito isso, tampava-se a placa e esta ficava incubando, de forma que se houvessem anticorpos anti-BLV nas amostras de soro, estes se ligariam aos antígenos fixados na placa e haveria a formação de complexos antígeno-anticorpo. Passado o período de incubação, realizava-se a lavagem da placa com uma solução de lavagem e, adicionava-se o

conjugado, que nada mais é que um anticorpo também anti-BLV marcado com enzima. Após uma segunda incubação, lavava-se a placa, para que então se adicionasse o substrato.

No caso de uma amostra positiva, os anticorpos presentes no soro, teriam ocupado muitos sítios de ligação, não dando a oportunidade dos anticorpos do conjugado se ligarem, então, ao adicionar o substrato, não haveria enzima o suficiente para degradar o mesmo, havendo assim, uma mudança de cor muito sutil ou até mesmo a ausência de cor. Já no caso de uma amostra negativa, haveria poucos ou nenhum anticorpo na amostra, deixando livres os sítios de ligação do antígeno, que seriam ocupados pelos anticorpos do conjugado. Assim, ao adicionar o substrato este seria degradado pela enzima, mudando a coloração do meio.

Em seguida, adicionava-se uma solução reveladora (*stop solution*), que é imprescindível para que não ocorram falsos positivos, uma vez se a reação não for suspensa, ela vai continuar ocorrendo. Posterior a isto, a placa era colocada em um espectrofotômetro para a leitura da densidade ótica de cada cavidade. Feita a leitura, a absorbância de cada poço da placa era transferida para um *software* que a própria empresa do *kit* disponibiliza, para que fosse feita a validação e gerado o resultado do teste. Diferente do IDGA, mesmo que ocorra a mudança de cor perceptível à olho nu, faz-se sempre a leitura do teste em espectrofotômetro.

No estágio também foi acompanhado o diagnóstico de amostras de animais destinados à exportação. Com isso foi possível acompanhar o ELISA para detecção de antígeno do BVDV, utilizando o kit *ID Screen® BVD P80 Antigen Capture*. Este é um ELISA sanduíche ou de captura, do tipo direto. Onde o antígeno presente no soro do animal se liga ao anticorpo fixado na placa (antígeno capturado). Após, há a adição de um segundo anticorpo (conjugado à enzima), formando assim um sanduíche (anticorpo – antígeno - anticorpo). Em seguida, com a adição do substrato ocorre a mudança de cor (amarelo), caracterizando uma amostra positiva, diferentemente do competitivo.

2.4.10 - Extração de DNA

Outra técnica acompanhada foi a extração de DNA com fenol-clorofórmio realizada com amostras de suabes, sangue total e tecidos. Em um primeiro momento, as amostras eram preparadas para a extração. Os tecidos eram macerados e ressuspensos em TE (Tampão de eluição). Este passo tem a finalidade de reduzir o tamanho do tecido facilitando o rompimento das células e exposição do material genético, diluir a amostras e manter o pH próximo do

fisiológico. Em seguida, adicionava-se RNaseA, que é uma enzima que degrada RNA, e SDS, que é um detergente, que rompe a camada lipídica externa da célula e libera o genoma.

Essa solução era incubada e, posteriormente, adicionava-se proteinase K, que age na clivagem de proteínas. Após isto, incubava-se novamente e depois adicionava-se fenol-clorofórmio e centrifugava. Este passo era com o intuito de separar a solução em fases. Feito isto, obtinham-se 3 fases: a aquosa, que continha o DNA, a intermediária, que continha as proteínas e, a fase orgânica, com todo o restante de debris celulares e resto de tecido.

Então coletava-se a fase aquosa superior, colocava-a em um novo microtubo e adicionava-se etanol 100% e acetato de sódio 3M O etanol retira os sais que possam estar aderidos e precipita o ácido nucleico, com a ajuda do acetato. Dessa forma, homogeneizava-se e deixava-se o microtubo a -20°C durante à noite para que ocorresse esta precipitação do DNA.

No dia seguinte, centrifugava, retirava-se o sobrenadante e lavava o pellet com etanol 75%. Depois este era removido e após a secagem do microtubo, ressuspensava-se o material em TE aquecido. Por fim, quantifica-se o DNA em um espectrofotômetro e armazenava a -20°C.

2.4.11 - Extração de RNA e síntese de cDNA

Uma das técnicas mais realizadas durante o ECSMV foi extração de RNA, seguido da síntese do cDNA (DNA complementar). As amostras testadas pertenciam à rotina de diagnóstico (amostras suspeitas de raiva e cinomose canina) e também de amostras do projeto de pesquisa intitulado “Caracterização antigênica e genética da porção terminal N da glicoproteína E2 a partir de isolados do vírus da diarreia viral bovina no Rio Grande do Sul”.

Todo procedimento de extração era realizado em capela de fluxo laminar. Para isto utilizou-se o reagente TRIzol™ Reagent (*Thermo Fisher Scientific*), que possui fenol, isotiocianato de guanidina, corante vermelho. Este reagente tem o intuito de lisar as células e manter a integridade do RNA. Após isso, adicionava-se clorofórmio, seguido de uma incubação, e centrifugação, para a separação de fases.

A fase aquosa era coletada e a transferida para um novo microtubo. A precipitação do RNA era realizada com a adição de álcool isopropílico, centrifugação e descarte do sobrenadante. O *pellet* era lavado com etanol a 75% e posteriormente seco. O RNA era

ressuspensão com água DEPC, livre de RNase, incubado durante 10 minutos a 65°C sob com agitação.

A síntese do cDNA era realizada imediatamente após solubilização do RNA. Para isso, utilizava-se o um *kit* comercial (Promega) que continha H₂O DEPC (tratada com dietil pirocarbonato) livre de RNase e DNase, uma solução tampão que continha *random primers* e a enzima transcriptase reversa, responsável pela transcrição do RNA em cDNA. O mix era composto por 4 µL de água, 4 µL de tampão e 2 µL de enzima por amostra extraída. Para então, adicionar-se 10 µL de amostra, mais 10 µL de *mix* em um novo microtubo, totalizando 20 µL (volume necessário para a reação de cDNA). Este era colocado no termociclador, com um ciclo de 1 hora e 20 minutos (anelamento: 25°C por 5 minutos; extensão: 42°C por 60 minutos; inativação: 70°C por 15 minutos; e 4°C até a retirada do material do termociclador). O RNA extraído era armazenado a -80 °C, enquanto o cDNA era armazenado a -20 °C e, ambos eram utilizados conforme necessidade do laboratorista.

2.4.12 - Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A PCR é uma técnica de amplificação de ácidos nucleicos que, quando utilizada com fins diagnósticos, permite a detecção e identificação de quantidades mínimas do material genético do agente suspeito (FLORES; CARGNELUTTI, 2017). Ela é precedida pelo processo de extração do material genético e, permite identificar os mais diversos agentes, mesmo que em pequenas quantidades, desde que se possua os *primers* específicos.

No SV, para o diagnóstico, geralmente chegavam amostras de animais com suspeita de cinomose. Estas amostras eram submetidas ao processo de extração de RNA, geralmente no período da manhã e a PCR e a eletroforese era realizada no período da tarde. Estas duas etapas ficavam sob responsabilidade de pessoas diferentes, para que não ocorresse a contaminação do material a ser amplificado.

O *mix* da PCR para a reação era preparado em uma sala exclusiva para esta finalidade. O manipulador usava um jaleco reservado para isto (que não saia da sala) e todos os equipamentos utilizados eram restritos à sala de *mix*, como os pipetadores, estantes, canetas e até centrífuga para microtubos.

O volume total do *mix* era de 25 μL , sendo 23 μL o volume preparado na sala de *mix*. Nele continha água livre de RNA e DNA, solução tampão, DMSO (de acordo com a necessidade), dNTP, cloreto de magnésio (MgCl_2), primers (*forward* e *reverse*) e a enzima Taq.

A solução tampão (TRIS-HCl e KCl) é utilizada para garantir um ambiente químico adequado para a reação, impedindo a alteração de pH. Os dNTP's são desoxirribonucleotídeos trifosfatados que se incorporam na nova fita de DNA pela ação da Taq. A Taq DNA polimerase é uma enzima termoestável, que possui a função de adicionar os dNTP's na nova cadeia de DNA, a partir do primer. O cloreto de magnésio serve como cofator da Taq DNA polimerase. Por fim, o DMSO tem função de diminuir a formação de reações inespecíficas, que são resultado de estruturas secundárias; contudo, este só é utilizado quando há a formação destas estruturas.

Feito isto, havia uma janela que comunicava a sala de *mix* com a sala da biologia molecular e era nesta comunicação que se colocava a estante contendo os microtubos com o *mix*. Em seguida, o manipulador se direcionava a sala da biologia molecular, onde transferia os microtubos para uma segunda estante e adicionava (2 μL) o DNA ou cDNA extraído, para depois colocar o microtubo no termociclador.

O termociclador é um equipamento que permite o aumento e a redução da temperatura, de forma a realizar as três fases da PCR que dependem diretamente disto. A primeira delas é a desnaturação, que nada mais é que a separação das fitas de DNA, e ocorre a 94°C. A segunda é a fase de anelamento, onde os *primers* se ligam nas fitas de DNA, e a temperatura dependerá do primer utilizado; variando de 45 a 65°C. A última fase é a de extensão, onde ocorre a síntese das novas fitas de DNA. É nesta terceira fase que tem-se a ação da Taq DNA polimerase, que funciona a 72°C. A reação tem, em média, 35 ciclos e, amplifica o material genético exponencialmente, resultando na geração de bilhões de cópias em amostras positivas.

2.4.13 – Eletroforese

A eletroforese é a principal técnica utilizada em biologia molecular para a análise de DNA. Ela permite separar, identificar e purificar os fragmentos de DNA. A eletroforese é utilizada na separação de várias macromoléculas e consiste na migração das partículas – nesse caso, de fragmentos de DNA – através de um gel durante a aplicação de uma diferença de

potencial (ALVES; SOUZA, 2013). Ou seja, é uma técnica de separação de moléculas com base em sua carga elétrica e peso molecular. No caso do DNA, esta carga é negativa, logo, o material migra do pólo negativo para o pólo positivo.

Para isso, preparava-se um gel de agarose, sendo que a concentração deste depende diretamente do tamanho do fragmento em questão. Quanto maior o fragmento, menos concentrado deve ser o gel e quanto menor o fragmento, mais concentrado deve ser o gel. O gel é composto de Tris Acetato EDTA (TAE) e agarose, que é um polímero extraído de algas marinhas.

A observação do resultado no gel de agarose era realizado em um transiluminador, que é um equipamento que transmite luz ultravioleta (UV) e permite a visualização das bandas de amplificação (Figura 6), formadas a partir da colocação da amostra, um tampão de carregamento e o gel red (corante intercalante de DNA), e para a validação da mesma, colocavam-se os controles positivo (com amplicon do tamanho correto), negativo (sem amplificação) e o peso molecular.

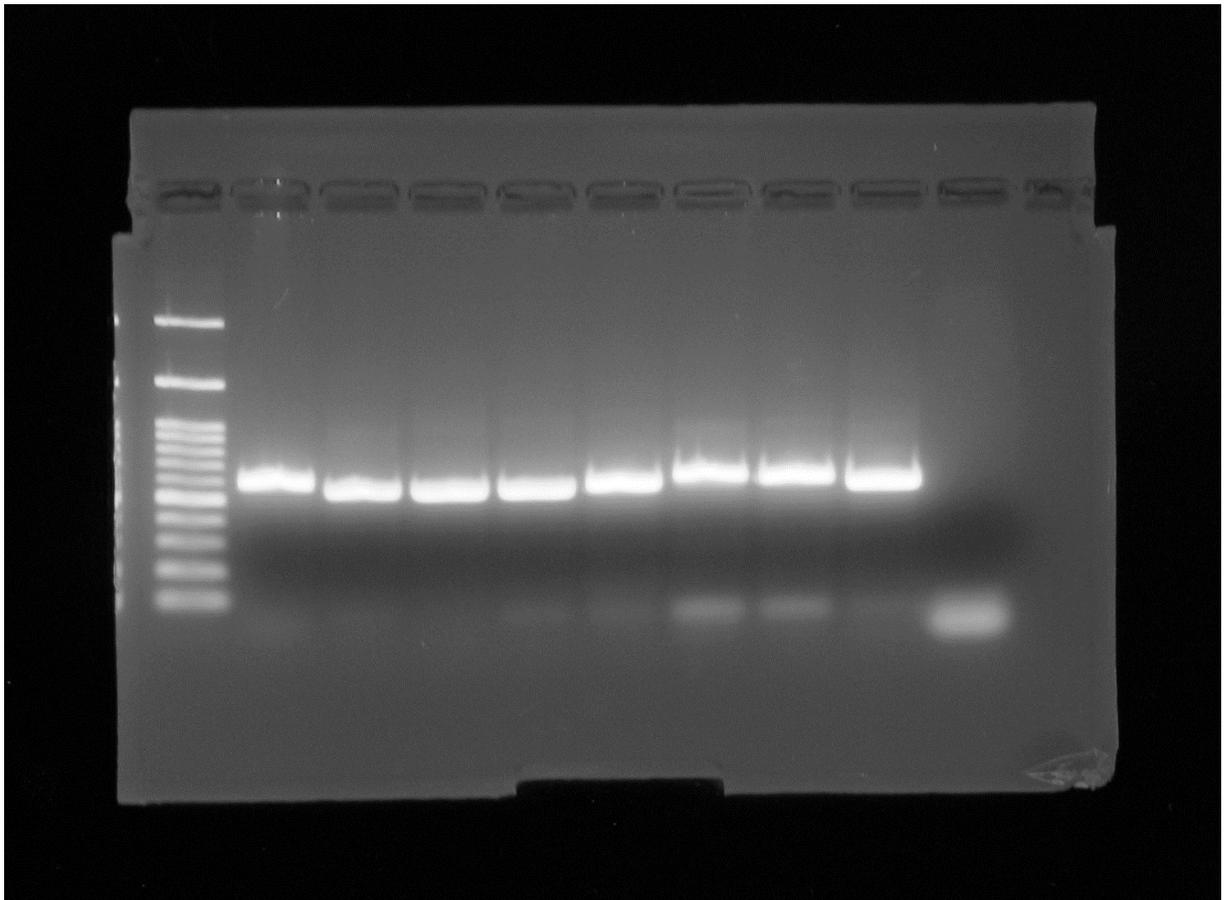


FIGURA 6. Visualização das bancas de amplificação no gel de agarose.

3 – DISCUSSÃO

3.1 – ELISA

Durante o estágio, foi possível acompanhar o teste de ELISA diversas vezes com o intuito diagnóstico de bovinos com suspeita de infecção pelo vírus da Leucose Enzoótica Bovina (BLV). Até pouco tempo atrás, este diagnóstico era realizado por imunodifusão em gel de àgar (IDGA), contudo, a técnica de ELISA além de ser mais sensível e específica, também é mais rápida e mais prática, uma vez que é passível de automação (RESENDE, 2017).

Enquanto uma placa de IDGA, de acordo com o protocolo, consegue testar 28 amostras e o resultado é obtido em 72 horas, no ELISA testa-se 92 amostras por placa e o resultado é obtido em até cinco horas (RESENDE, 2017). Vale ressaltar ainda que, no caso do IDGA, a leitura é feita pelo laboratorista a partir da observação da insolubilização e precipitação de complexos formados pela reação antígeno-anticorpo (FLORES; CARGNELUTTI, 2017), podendo ser subjetiva, de acordo com a experiência da pessoa que a realiza (RESENDE, 2017).

No geral, as amostras que chegavam ao setor eram soro das mais variadas propriedades, muitas dessas não dispunham de histórico dos animais e quando este era disponibilizado, a maioria vinha para monitoramento.

3.1.1 – Vírus da Leucose Enzoótica Bovina (BLV)

O BLV (*bovine leukemia virus*), agente etiológico da leucose enzoótica bovina, é classificado como um *Deltaretrovírus* e família *Retroviridae* (RAVAZZOLO; COSTA, 2017). Os retrovírus possuem vírions envelopados e contêm duas moléculas idênticas de RNA de fita simples linear como genoma. Os membros dessa família são assim denominados por possuírem uma enzima capaz de sintetizar uma molécula de DNA pela transcrição do seu genoma RNA, mecanismo chamado de transcrição reversa (RAVAZZOLO; COSTA, 2017). Posterior a isto, os retrovírus introduzem a cópia do seu DNA no genoma da célula hospedeira, fazendo que a infecção seja persistente e, conseqüentemente, o animal se torne portador para o resto da vida.

A infecção está difundida em todas as regiões do Brasil, sendo mais frequente em animais de raças leiteiras. Existe uma associação entre nível tecnificação (palpação retal, vacinação periódica e introdução de animais sem teste) e aumento da prevalência da infecção. A prevalência da enfermidade aumenta à medida que aumenta a idade dos animais (BRAGA; LAAN, 2001).

A transmissão deste agente se dá, basicamente, de maneira iatrogênica, através do contato de fluídos biológicos (principalmente sangue) contaminados (MACLACHLAN; DUBOVI, 2017). Nesse caso, o manejo é de extrema importância, pois ele é um fator de disseminação da infecção. Outras formas de transmissão, como por picada de insetos, através do colostro/leite, sêmen ou, ainda, transmissão vertical da fêmea para o filhote, são documentadas na literatura, contudo, a iatrogênica é a que mais se destaca (MACLACHLAN; DUBOVI, 2017).

A infecção pelo BLV acontece, predominantemente, em linfócitos B (MACLACHLAN; DUBOVI, 2017). Entre os animais infectados aproximadamente 30% desenvolvem linfocitose persistente sem manifestação de quaisquer sinais clínicos. Estima-se que entre 1 e 5% dos animais infectados persistentemente irão desenvolver a forma clínica (linfomas malignos) da doença em algum momento de suas vidas (RAVAZZOLO; COSTA, 2017).

A enfermidade (denominada leucose) caracteriza-se pela produção de tumores de origem linfoide, como linfomas malignos, em diversos órgãos (RAVAZZOLO; COSTA, 2017). Os sinais clínicos estão diretamente relacionados à localização destes tumores, fazendo com que o animal acometido possa ter sinais desde respiratórios, digestivo, até sinais reprodutivos (PEREIRA *et al.*, 2013).

A viremia dos animais infectados é detectável somente nas duas primeiras semanas após a infecção (RAVAZZOLO; COSTA, 2017). Para o diagnóstico dessa enfermidade, o mais indicado é a realização da sorologia, uma vez que este se torna portador e possui anticorpos persistentes. Mesmo assim, vale ressaltar que sorologia positiva em animais com idade inferior a seis meses pode ocorrer em razão da infecção ou dos anticorpos maternos adquiridos passivamente pelo colostro (RAVAZZOLO; COSTA, 2017).

Quanto à profilaxia e controle, a leucose ainda não possui vacina ou tratamento efetivo, sendo o descarte do animal a melhor alternativa para casos de sorologia positiva (BRAGA *et al.*, 1998). Caso o animal positivo possua grande valor genético e zootécnico para a propriedade, existe a possibilidade de mantê-lo, uma vez que se adote um manejo

diferenciado e controlado (SPADETTO; DIAS, 2013). No caso de uma propriedade negativa, é importante que se controle a entrada de animais novos, sendo estes sabidamente negativos, para evitar a introdução do agente na propriedade.

3.1.2 – Diagnóstico do vírus da Leucose Enzoótica Bovina (BLV) pela técnica de ELISA

No período de estágio, foi possível acompanhar e/ou realizar o teste de 350 amostras destinadas para o diagnóstico de leucose por ELISA. Dentre essas amostras, 260 eram de animais que seriam destinados à exportação. Segundo a OIE (2018), o teste de ELISA é aceito internacionalmente para o trânsito de animais entre países. As outras 90 amostras eram testes de propriedades que faziam a sorologia de BoHV-1 e BVDV, por problemas reprodutivos e, para detectar a condição de portador dos animais da propriedade, também se solicitava o exame de leucose. O teste e o protocolo foram anteriormente descritos.

As amostras para monitoramento (90) eram originárias de 16 propriedades de diferentes municípios dos estados do Rio Grande do Sul, Paraná e Santa Catarina. Já as amostras (260) dos animais para exportação foram enviadas por uma empresa de reprodução localizada no estado do Mato Grosso. Os resultados dos testes estão apresentados na Tabela 2.

TABELA 2. Resultados obtidos pelo teste ELISA para BLV das amostras de monitoramento e das amostras de exportação.

| | Amostras de monitoramento (n = 90) | Amostras para exportação (n = 260) |
|-------------|---|---|
| Positivo | 58 | 1 |
| Porcentagem | 64,4% | 0,4% |
| Negativo | 32 | 258 |
| Porcentagem | 35,5% | 99,2% |
| Suspeito | 0 | 1 |
| Porcentagem | 0% | 0,4% |

A soropositividade dos animais de monitoramento indica a presença de infecção nos rebanhos destas propriedades, uma vez que por ser um retrovírus, há a inserção do genoma

viral no genoma da célula hospedeira (RAVAZZOLO; COSTA, 2017). Além disso, podemos perceber que este vírus está disseminado em diferentes estados.

O alto índice de animais positivos nos faz refletir sobre o tipo de propriedade em questão, uma vez que a presença da leucose está diretamente correlacionada com animais que possuem um manejo mais tecnificado, já que esta possui uma transmissão iatrogênica, o que nos sugere uma prática frequente de procedimentos como toque retal ou administração de medicamentos.

A medida a ser adotada é de escolha do médico veterinário, em conjunto com o proprietário, podendo ser tanto o descarte, quanto um manejo especificado para estes (SPADETTO; DIAS, 2013). Isto pode incluir uma diferenciação e separação dos negativos, assim como acompanhamento sorológico periódico. Outra providência que pode ser tomada é o controle do material utilizado nestes animais, dando-se predileção ao uso de agulhas estéreis e descartáveis, por exemplo, assim como evitar o compartilhamento de luvas de palpação (RAVAZZOLO; COSTA, 2017). Pequenas medidas de manejo como estas já são de grande valia na atenuação da disseminação da infecção (RAVAZZOLO; COSTA, 2017). No caso da exportação, o animal que foi considerado positivo pelo teste diagnóstico realizado, deve ser descartado.

Outra questão interessante é que houve uma amostra considerada duvidosa na leitura no ELISA, que foi gerada por ficar entre as médias dos controles positivo e negativo. Neste caso, como havia pressa do solicitante para a obtenção do resultado, não se repetiu o teste para esta amostra, ficando a critério do médico veterinário responsável, a conduta a se seguir.

As amostras testadas para exportação obtiveram apenas 0,4% de positividade e foram oriundas de uma propriedade de gado de corte, enquanto as amostras testadas para monitoramento obtiveram 64,4% de positividade e não possuíam no histórico a aptidão dos animais. Entretanto, comparando os resultados apresentados pelo ELISA, é discrepante a diferença de soropositividade, e sugerem que estas amostras eram advindas de gado leiteiro. Segundo Barroso (2015), a probabilidade de um bovino com aptidão leiteira ser soropositivo para leucose é 3,45 vezes maior do que um bovino com aptidão para corte, da mesma forma que animais mais velhos possuem maior probabilidade de se infectar quando comparados com animais jovens (BRAGA; LAAN, 2001). Isso é justificado pelo fato de que os animais com aptidão leiteira permanecem mais tempo nas propriedades (BARROSO, 2015).

3.2 – Projeto “Caracterização antigênica e genética da porção terminal N da glicoproteína E2 a partir de isolados do vírus da diarreia viral bovina no Rio Grande do Sul”

No período de estágio também foi possível acompanhar o projeto de mestrado intitulado “*Caracterização antigênica e genética da porção terminal N da glicoproteína E2 a partir de isolados do vírus da diarreia viral bovina no Rio Grande do Sul*”. A seguir, será discutido sobre o vírus da diarreia viral bovina e sobre o que foi realizado no projeto, assim como a sua relevância para a pesquisa e o diagnóstico.

3.2.1 – Vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV)

De acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV, 2018), o gênero *Pestivirus* é pertencente à família *Flaviviridae* que é subdividida em 4 gêneros e em cada gênero estão classificados diversas espécies. Recentemente, houve uma reformulação da taxonomia viral e as espécies virais BVDV 1, BVDV 2 e o BVDV HoBi-like foram reclassificados para *Pestivirus A*, *Pestivirus B* e *Pestivirus H*. No entanto, ao longo do texto será mantido a nomenclatura antiga por uma questão de facilidade, evitando possíveis confundimentos.

Os membros da família são vírions esféricos (40-60nm de diâmetro) que contêm um nucleocapsídeo icosaédrico revestido externamente por um envelope derivado das membranas da célula hospedeira (RIDPATH; BAUERMANN; FLORES, 2017), o que os torna mais sensíveis à inativação por detergentes. Conforme o seu comportamento *in vitro*, o BVDV pode ser considerado citopático ou não citopático (RIDPATH; BAUERMANN; FLORES, 2017).

O genoma consiste de uma fita simples de RNA de polaridade positiva, com 9 a 12,3 kb. Esta molécula apresenta duas regiões não traduzidas (UTRs) próximas às extremidades 5' e 3' e possui uma única fase de leitura (ORF) (RIDPATH; BAUERMANN; FLORES, 2017). Os pestivirus possuem quatro proteínas estruturais, sendo elas a C (proteína do nucleocapsídeo) e as glicoproteínas do envelope Erns, E1 e E2 (MACLACHLAN; DUBOVI, 2017).

Os diferentes isolados do BVDV apresentam uma grande variabilidade antigênica, devido à presença de regiões hipervariáveis na glicoproteína E2, que é a glicoproteína mais

abundante no envelope viral e é alvo de anticorpos neutralizantes (RIDPATH; BAUERMANN; FLORES, 2017; BIANCHI, 2011).

Existem três critérios que diferenciam os pestivírus dos demais membros da família *Flaviviridae*, sendo eles o hospedeiro natural, as características antigênicas e a homologia entre as sequências de nucleotídeos (RIDPATH; BAUERMANN; FLORES, 2017). Todos os pestivírus são antigenicamente relacionados e existe sorologia cruzada entre as diferentes espécies e isolados. Contudo, a reatividade sorológica entre as espécies é baixa e pode variar de um isolado para outro de uma mesma espécie (BVDV-1, BVDV-2 e Hobi-Like). Devido a estas características, os anticorpos monoclonais (AcMs) podem ser utilizados para diferenciar as espécies de pestivírus e caracterizar diferentes isolados (RIDPATH; BAUERMANN; FLORES, 2017). A comparação entre as sequências de nucleotídeos da região 5'UTR é o critério mais seguro na diferenciação entre as espécies de pestivírus. Esta é considerada a região mais conservada do genoma viral (RIDPATH; BAUERMANN; FLORES, 2017).

O BVDV apresenta distribuição mundial e praticamente todos os países que possuem bovinocultura importante já relataram a sua presença (SCHUCH, 2001). Os bovinos são considerados os seus hospedeiros naturais do BVDV, porém outros ruminantes (domésticos e silvestres) e suínos também podem ser infectados (RIDPATH; BAUERMANN; FLORES, 2017). A transmissão do vírus pode ocorrer tanto verticalmente (durante a gestação), levando a uma infecção congênita do feto, ou horizontalmente depois do nascimento (MACLACHLAN; DUBOVI, 2017). A transmissão vertical para o embrião ou feto bovino é um aspecto crítico da infecção que, dependendo da amostra viral e do estágio gestacional, pode resultar em morte embrionária/fetal, teratogênese, infecção persistente ou infecção inaparente com resposta imune (MACLACHLAN; DUBOVI, 2017).

Os sinais clínicos dependem diretamente da imunocompetência do animal, assim como se este está gestando ou não. A maioria das infecções dos animais imunocompetentes é assintomática (subclínica), mas pode cursar com quadros febris leves, muitas vezes imperceptíveis ou, ainda, com quadros gastrentéricos, respiratórios ou hemorrágicos (RIDPATH; BAUERMANN; FLORES, 2017).

Animais persistentemente infectados (PI) com BVDV representam o maior reservatório do vírus na natureza e, por isso, são considerados mantenedores do vírus nos rebanhos (RIDPATH; BAUERMANN; FLORES, 2017). De acordo com Flores (2017), os PI também estão sujeitos a desenvolver a forma mais grave da doença, conhecida como doença

das mucosas (DM), que ocorre através da expressão da proteína NS3 como um polipeptídeo individual.

O diagnóstico da infecção pode ser realizado pela identificação do agente, utilizando-se de isolamento em cultivo celular, ELISA ou PCR, quanto pela sorologia, que pode ser realizada por ELISA ou SN (RIDPATH; BAUERMANN; FLORES, 2017).

Para o controle e profilaxia do BVDV em rebanhos, o foco deve ser a identificação e remoção do PI e impedir a infectar fetal. Para isso, o emprego de vacinas é uma opção utilizada por técnicos e produtores (MACLACHLAN; DUBOVI, 2017). O controle com vacinação é indicado para rebanhos com alta rotatividade de animais, rebanhos com sorologia positiva, com histórico de doença clínica ou reprodutiva e com confirmação virológica de BVDV (RIDPATH; BAUERMANN; FLORES, 2017).

3.2.2 – “Caracterização antigênica e genética da porção terminal N da glicoproteína E2 a partir de isolados do vírus da diarreia viral bovina no Rio Grande do Sul”

O monitoramento da variabilidade do BVDV circulante nos rebanhos é de extrema importância para o conhecimento das amostras circulantes, avaliação dos testes de diagnóstico e da capacidade protetora das vacinas (RIDPATH, 2003). Portanto, o objetivo do projeto foi a identificação da presença de anticorpos pestivírus em amostras de soro bovino e a caracterização do destes vírus isolados. Para a caracterização utilizou-se a reatividade da proteína E2 frente a um painel de anticorpos monoclonais (AcMs), tornando possível a percepção dos isolados circulantes no Brasil.

A E2 é a proteína mais imunogênica do BVDV, sendo o principal alvo de anticorpos neutralizantes do hospedeiro (RIDPATH; BAUERMANN; FLORES, 2017; BIANCHI, 2011). Esta metodologia é amplamente utilizada para a caracterização de isolados de BVDV (LIMA, 2004; BIANCHI, 2011), pois possibilita um reconhecimento das amostras circulantes e a comparação direta dos epítomos entre os isolados e amostras presentes em vacinas.

Como fonte de pesquisa viral utilizaram-se 15.894 amostras de soro de bovinos jovens que foram testadas para antígeno do BVDV por ELISA. Entre todas as amostras testadas, 431 foram consideradas positivas (2,7%). A presença do vírus no soro dos animais indica infecção aguda ou infecção persistente (animais PI). A diferenciação entre as duas situações deve ser feita pela repetição do teste em intervalos de 20 dias, porém devido a origem das amostras isso não foi realizado (RIDPATH; BAUERMANN; FLORES, 2017).

As amostras de soro positivas foram submetidas ao isolamento em cultivo celular com o intuito de se amplificar o vírus. Entre as 431 amostras positivas no ELISA foi possível isolar e amplificar 62 vírus. Esta diferença entre os resultados poder ser resultado diferença de sensibilidade entre as técnicas, onde no ELISA é possível detectar partículas inativadas. Já o isolamento viral tem a capacidade de detectar somente partículas viáveis (PILZ; ALFIERI; ALFIERI, 2005).

Os 62 isolados foram testados por imunofluorescência indireta com um painel de 18 ACMS como anticorpo primário. Segundo Troiano (2009), anticorpos monoclonais são anticorpos produzidos por um único clone de um linfócito B e respondem a apenas um epítipo de um antígeno. Sendo assim, a caracterização por anticorpos monoclonais é uma maneira eficaz e específica para identificar e diferenciar as espécies de *Pestivirus*, sendo que esta metodologia já foi utilizada em diversos estudos (LIMA, 2004; BIANCHI, 2011).

Após a avaliação dos isolados na IFA, fez-se a extração do genoma viral a partir da técnica já relatada anteriormente (extração de RNA com TRIzol), seguido da síntese do DNA complementar a partir do uso do *kit* contendo a enzima transcriptase reversa. O cDNA era utilizado para a realização da amplificação da região N terminal da glicoproteína E2. Posteriormente, os produtos positivos na eletroforese foram purificados com a utilização do *kit QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen), para sequenciamento de nucleotídeos, possibilitando, por fim a análise filogenética dos isolados. Esta metodologia para caracterização de isolados já foi descrita anteriormente (BOTTON, 1998; LIMA *et al.*, 2004, BIANCHI *et al.*, 2011) e possibilita a identificação de possíveis variabilidades nesta região extremamente imunogênicas do BVDV.

Durante o estágio, pode-se acompanhar parte das IFAs, das inoculações em cultivos celulares e extrações de RNA, síntese de cDNA, PCR, a purificação e preparação de amostras para sequenciamento, assim como o acompanhamento da avaliação dos resultados preliminares. A execução das técnicas e participação na interpretação dos resultados possibilitou o contato e aprendizado com novas metodologias aplicadas a virologia. Com isso, foi possível perceber, a importância da caracterização de isolados circulantes no país, principalmente no que diz respeito a produção de vacinas mais efetivas e atualização das técnicas e métodos de diagnósticos. Os resultados não serão apresentados por se tratar de uma dissertação de mestrado.

Um marco no trabalho em questão é a quantidade de isolados utilizados no estudo, em diversas publicações da literatura (BOTTON, 1998; BIANCHI, 2011), a caracterização de

isolados de BVDV não ultrapassavam de 20 amostras, que é três vezes menos do que o utilizado neste, o que caracteriza um número significativo.

A metodologia (isolamento, IFA com anticorpos monoclonais, extração de RNA, PCR, sequenciamento e análise filogenética) escolhida já é encontrado na literatura (LIMA *et al.*, 2004, BIANCHI *et al.*, 2011), e é o suficiente para alcançar o objetivo pretendido com o estudo. Contudo, o teste de soroneutralização poderia fornecer maiores esclarecimentos a respeito da reatividade sorológica cruzada entre os isolados. Esta metodologia já foi empregada em estudo de Botton *et al.* (1998) e Bianchi, *et al.* (2011).

4 – CONCLUSÃO

A realização do Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária além de ser o último passo a ser cumprido na graduação, também é uma maneira de agregar tanto no crescimento profissional, quanto pessoal. E pode-se concluir que ambos os objetivos foram alcançados na efetuação deste.

Nele, houve a oportunidade de presenciar situações do dia-a-dia de um laboratório referência no tema de interesse, além da participação ativa na área de diagnóstico e pesquisa. Isto possibilitou a realização de diversas técnicas, tanto da virologia clássica, quanto de virologia molecular, que são de extrema relevância na sanidade animal.

A realização das mais variadas técnicas não só reforçaram o conhecimento já adquirido na graduação, como agregaram em novas habilidades. Já a aproximação com a realidade vivida em laboratório de diagnóstico aprimorou a capacidade de trabalho em grupo, a percepção e resolução de problemas. A oportunidade de participação em projeto de pesquisa colaborou para o aperfeiçoamento do pensamento científico e a conduta a se ter na elaboração e execução de um trabalho.

Vale salientar que, além da participação das aulas da disciplina de Diagnóstico Viroológico Aplicado e do curso de Técnicas Básicas de Diagnóstico Viroológico, o próprio convívio com a equipe laboratorial contribuiu para a obtenção de novos conhecimentos acerca da área, o que estimulou ainda mais o interesse pela pesquisa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, E.A.; SOUZA, D. S. **Biologia Molecular**. In. ALVES, E. A.; GUIMARÃES A.C.R. Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde. Rio de Janeiro: Escola Politécnica de Ensino Joaquim Venâncio, Instituto Oswaldo Cruz, 2013, p. 133 - 185.
- ALVES, E. A.; GUIMARÃES A.C.R. **Cultivo celular**. In. MOLINARO, E. M. et al. Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde. Rio de Janeiro: Escola Politécnica de Ensino Joaquim Venâncio, Instituto Oswaldo Cruz, 2010, p. 215 – 253.
- AOKI, V. *et al.* **Imunofluorescência direta e indireta**. Anais Brasileiros de Dermatologia, v. 85, n. 4, p. 490-500, 2010.
- BARROSO, M. C. M. **Inquérito soropidemiológico de leucose enzoótica bovina nos bovinos de corte e de leite no município de Catalão, Goiás e correlação com os fatores predisponentes**. 2015. 48 f. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2015.
- BIANCHI, E. *et al.* **Perfil genotípico e antigênico de amostras do vírus da diarreia viral bovina isoladas no Rio Grande do Sul (2000 – 2010)**. Pesquisa Veterinária Brasileira, v. 31, n. 8, 2011.
- BOTTON, S. A. *et al.* **Caracterização preliminar de amostras do vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) isoladas no Brasil**. Pesquisa Veterinária Brasileira, v. 18, n. 2, p.83-90, 1998.
- BRAGA, F. M. *et al.* **Infeção pelo vírus da leucose enzoótica bovina (BLV)**. Ciência Rural. v.28, n.1, p.163-172, 1998.
- BRAGA, F. M.; LAAN, C. W. **Leucose Enzoótica Bovina**. In. Doenças de ruminantes e eqüinos/ Franklin Riet-Correa, Ana Lucia Schild, Maria del Carmen Méndez, Ricardo A. A. Lemos [et al]. – São Paulo: Livraria. Varela, 2001. Vol. I, p. 45 – 162.
- BRUM, M. C.; WEIBLEN, R. **Detecção, identificação e quantificação de vírus**. In. Virologia veterinária: virologia geral e doenças víricas / Eduardo Furtado Flores (org). – 3. ed. ver. e amp. – Santa Maria: Ed. da UFSM, 2017, p. 41 - 70.
- FLORES, E. F. **Estrutura, classificação e nomenclatura dos vírus**. In. Virologia veterinária: virologia geral e doenças víricas / Eduardo Furtado Flores (org). – 3. ed. ver. e amp. – Santa Maria: Ed. da UFSM, 2017, p. 21 - 39.
- FLORES, E. F.; CARGNELUTTI, J. F. **Diagnóstico laboratorial de infecções víricas**. In. Virologia veterinária: virologia geral e doenças víricas / Eduardo Furtado Flores (org). – 3. ed. ver. e amp. – Santa Maria: Ed. da UFSM, 2017, p. 319 - 359.

ICTV (INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES), 2018. Disponível em: < <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>>. Acesso em: 25 set. 2018.

LIMA, M. *et al.* **Caracterização de amostras atenuadas do vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV) tipos 1 e 2 para uso em vacinas.** Pesquisa Veterinária Brasileira, v. 24, n.1, 2004.

MACLACHLAN, N.; DUBOVI, E.J. **Fenner's Veterinary Virology.** 5.ed. London: Academic Press, 2017, 581p.

OIE. Organização Mundial de Sanidade Animal. Terrestrial manual – on line. Disponível em: < <http://www.oie.int/standard-setting/terrestrial-manual/>>. Acesso em: 17 out. 2018.

OLIVEIRA, V. M.; MORAIS, R. J. S.; NETO, E. P. B. **Papilomatose ou verruga dos bovinos.** In. TORRES, R. A.; SILVA, A. A.; DIAS, E. R. G. D. Anais do 4º Rio Leite Serrano: Tecnologias para o desenvolvimento da pecuária de leite familiar da Região Serrana do Rio de Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2007, p. 39 – 47.

PEREIRA, A. L. M. *et al.* **Soroprevalência da Leucose Enzoótica Bovina – Revisão de Literatura.** Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária. Ano XI. Número 21. Julho, 2013. Periódicos Semestral. Disponível em < http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/XivYV78xSxgLb1J_2013-8-13-18-30-0.pdf>. Acesso em: 15 out. 2018.

PILZ, D.; ALFIERI A. F.; ALFIERI A. A. **Comparação de diferentes protocolos para a detecção do vírus da diarréia viral bovina por RT-PCR em grupos de sangue total e de soro sanguíneo, artificialmente contaminados.** Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 26, n. 2, p. 219 – 228, abr./jun. 2005.

RAVAZZOLO, A. P.; COSTA, U. M. **Retroviridae.** In. Virologia veterinária: virologia geral e doenças víricas / Eduardo Furtado Flores (org). – 3. ed. ver. e amp. – Santa Maria: Ed. da UFSM, 2017, p. 1021 – 1053.

RESENDE, C. F. **Padronização de ELISA indireto para diagnóstico da Leucose Enzoótica Bovina.** 2017. 35 p. Título de Mestre – Escola de Veterinária Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2017.

RIDPATH J.F. **BVDV genotypes and biotypes: practical implications for diagnosis and control.** Biol. v.31. p 127-131. 2003.

RIDPATH, J. F.; BAUERMAN, F. V.; FLORES, E. F. **Flaviviridae.** In. Virologia veterinária: virologia geral e doenças víricas / Eduardo Furtado Flores (org). – 3. ed. ver. e amp. – Santa Maria: Ed. da UFSM, 2017, p. 675 - 708.

SCHUCH, L. F. D. **Diarréia Viral Bovina.** In. Doenças de ruminantes e eqüinos/ Franklin Riet-Correa, Ana Lucia Schild, Maria del Carmen Méndez, Ricardo A. A. Lemos [et al]. – São Paulo: Livraria. Varela, 2001. Vol. I, p. 45 – 162.

SPADETTO, R. M; DIAS, A. S. **Leucose Enzoótica Bovina – Revisão de Literatura.** Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária. Ano XI. Número 20. Janeiro, 2013. Periódicos Semestral. Disponível em <
http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/FZN4O9naIXUHivt_2013-6-21-15-46-4.pdf>. Acesso em: 15 out. 2018.

TROIANO, L. D. C. **Caracterização de anticorpos monoclonais anti-gp51 do vírus leucose bovina (VLB).** 2009. 101 p. Título de Mestre – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

ANEXO A – Certificado de Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E DO DESPORTO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA
SETOR DE VIROLOGIA

ATESTADO

Atesto para os devidos fins que **Lais Miranda Feio** realizou estágio no Setor de Virologia da Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil de 6 de agosto de 2018 – 1 de novembro do mesmo ano – perfazendo 450 horas.

Santa Maria, 01 de novembro 2018.


Rudi Weiblen
Médico Veterinário
CRMV/RS 1574

