

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**PADRONIZAÇÃO DA COAGLUTINAÇÃO NA PREPARAÇÃO DE  
ÁCIDOS NUCLÉICOS DO PARVOVÍRUS CANINO E DO VÍRUS  
DA CINOMOSE PARA DIAGNÓSTICO MOLECULAR**

MARCELA CRISTINA MENDES RIBEIRO

BOTUCATU-SP

Junho 2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**PADRONIZAÇÃO DA COAGLUTINAÇÃO NA PREPARAÇÃO DE  
ÁCIDOS NUCLÉICOS DO PARVOVÍRUS CANINO E DO VÍRUS  
DA CINOMOSE PARA DIAGNÓSTICO MOLECULAR**

MARCELA CRISTINA MENDES RIBEIRO

Dissertação apresentada junto ao Programa de  
Pós-graduação em Medicina Veterinária para  
obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Adj. João Pessoa Araújo Jr.

## **COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA**

Nome do Autor: Marcela Cristina Mendes Ribeiro

Titulo: PADRONIZAÇÃO DA COAGLUTINAÇÃO NA PREPARAÇÃO DE  
ÁCIDOS NUCLÉICOS DO PARVOVÍRUS CANINO E DO VÍRUS DA CINOMOSE  
PARA DIAGNÓSTICO MOLECULAR

## **COMISSÃO EXAMINADORA**

### **Prof. Adj. João Pessoa Araújo Junior**

Departamento de Microbiologia e Imunologia  
Instituto de Biociências – UNESP-Botucatu-SP

### **Prof. Dr. Paulo Eduardo Brandão**

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - USP

### **Prof. Ass. Dr. Alexandre Secorun Borges**

Departamento de Clínica Veterinária  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP-Botucatu-SP

Data da Defesa: 25 de junho de 2008.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, que nos guia por caminhos tortuosos com toda a sua sabedoria e amor, propiciando sempre o que é melhor para o nosso crescimento espiritual.

Aos meus pais meus pais, Sonia e Marcelo, e ao meu irmão, Bruno pelo amor, paciência, confiança e apoio incondicionais.

Ao meu orientador, Prof. João Pessoa, pelos os ensinamentos de todos esses anos, pelo incentivo a busca do conhecimento, pelo rigor e pelos “tenha dós” de cada dia. Chefe, mais que um orientador você é um educador, pois seus ensinamentos são para a vida!

À Chica, minha Chicorinha, por me esperar ansiosamente todos os dias, por todo carinho e pelos milhares de miados.

Às eternas paioleras e população flutuante, Simone (Miss Gay), Danielle (P’ns), Elena (Creidi), Janaina (Cruz-Credo), Patricia (Marmota), Cíntia (Tchuka) e Rita (Ordinária), pela amizade sincera, pelo companheirismo, pelos conselhos e, principalmente, pelas Baladas!!!!

Aos meus amigos do coração Gustavo, Vitória, Juliana, Luciana, Camile, Pânico, Felipe, Audrey, Acácia, Vanessa, Ana Contente e Jennifer, pelos milhares de momentos de alegria, pela convivência intensa, almoços, jantares, baladas e por tudo mais.

Ao meu amigão Thiago e sua amada Keila, pelos “papos-cabeça”, pelos SUSTOS, pelo besteiro, por toda ajuda no projeto e, principalmente, por ter me levado à Pardinho. Vocês sabem como são especiais!

À Ticiania, por me acompanhar nas inúmeras idas a Pardinho.

Aos meus queridos companheiros do Laboratório de Virologia: Tais, Andreza, Micheli, Sueli, Flavio, Aline, Zé, Cris, Tati, Leticia e àqueles que já nos deixaram: Telma, Gyraia, Smurf, pelas risadas em tempo integral, pelo apoio, pela colaboração, pelo incentivo aos “records” e, principalmente, pelo ombro amigo quando só o NO funcionava!!!!

Aos meus tios Sueli, Amílcar, Paulo, Paula, Fátima, Elisa, Carminha, Helena e Dito, por se preocuparem e torcerem sempre pelo meu sucesso.

Aos primos Vinicius, Vitor e Julyane, pelas risadas.

À Priscila, Michele, Ana Paula, Luciane, Renata e ao Carlos, meus companheiros de almoço, muito obrigada pelas risadas, pelos conselhos e por tornar esse momento o mais prazeroso do dia.

À Márcia Furlan, por me “iniciar” no mundo da virologia, pelo apoio, pelos conselhos e pelas broncas que ajudaram, e muito, a chegar até aqui.

Aos meus amigos Guilherme, Fábio, Beto, Bruno e Tatiana que, mesmo a distancia, estão sempre presentes na minha vida.

Ao Prof. João Candeias, à Prof.<sup>a</sup> Vera e Prof.<sup>a</sup> Terue pela atenção, pela ajuda e pelas conversas agradáveis.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia, especialmente para o Lula, Luis, Sonia e Nice pela atenção, carinho, pelas longas conversas e, principalmente, pelas brincadeiras.

À Priscila Martins, pelos ensinamentos, bate-papos, fofocas e “méchantisses”, TODAS no mais correto francês!

À Sheila, “pelos momentos zens”, por ensinar o caminho para o equilíbrio e para a serenidade (ainda falta bastante!) e por ensinar a encarar os fatos, sem julgar fácil ou difícil.

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Paes por ter permitido a coleta das amostras no Ambulatório de Enfermidades Infecciosas dos Animais do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública/FMVZ/UNESP/Botucatu e aos ex-residentes Vitória, Gustavo, Camile, Camila e Marta e à residente Jennifer pela ajuda e pela atenção.

Agradecimentos mais que especiais às minhas irmãzinhas de espírito, Jana, Vi e Dani, não existe palavras pra dizer o quanto vocês são especiais pra mim.

Este projeto foi financiado pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo número. 06/54859-9.

## LISTA DE QUADROS

### CAPÍTULO 2

Quadro 1-	Concentração relativa das diluições da amostra negativa tratada com o vírus padrão e extraídas com kit comercial e com o COA para determinação da sensibilidade analítica dos métodos.....	40
Quadro 2-	Concentração relativa das diluições da amostra extraídas com kit comercial e com o COA para determinação da eficiência da extração.....	41
Quadro 3-	Concentração relativa das amostras P1 a P10 e suas respectivas diluições, extraídas com kit comercial e com o COA.....	43

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 2

- Figura 1- Representação gráfica da curva padrão da reação da PCR em tempo real para o Parvovírus, com os pontos  $10^{-1}$  a  $10^{-6}$  ..... 39
- Figura 2- Representação gráfica da concentração relativa das diluições da amostra negativa tratada com o vírus padrão e extraídas com kit comercial e com o COA para determinação da sensibilidade analítica dos métodos..... 39
- Figura 3- Representação Gráfica da concentração relativa das diluições da amostra extraídas com kit comercial e com o COA para determinação da eficiência da extração..... 40
- Figura 4- Representação Gráfica da concentração relativa das amostras P1 a P10 e suas respectivas diluições, extraídas com kit comercial e com o COA..... 42

### CAPÍTULO 3

- Figura 1- Esquema do genoma do CDV e do gene N com a localização dos primers utilizados para a PCR e nested-PCR..... 59
- Figura 2 - Eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídeo dos produtos da amplificação obtidos pela RT-PCR e pela nested-PCR das amostras 2, 4 e 6. P = PCR; N = Nested-PCR; M = Marcador molecular (50bp)..... 61



## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ml = mililitro

μl = microlitro

Ct = *threshold cycle*

CPV-2 = parvovirus canino tipo 2

FPV = arrovirus felino

SNC = sistema nervoso central

CDV = vírus da cinomose

RNA= ácido ribonucléico

DNA= ácido desoxirribonucléico

IC = imunocromatografia

HA = teste de hemaglutinação

ELISA= Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

Nested-PCR = reação em cadeia pela polimerase interna

PCR = reação em cadeia pela polimerase

pb = pares de base

MEM = *minimum essential médium*

ORF = *open reading frame*

BHI = *brain heart infusion*

CRFK= Células da linhagem Crandell oriundas de rim felino

MDCK= Células da linhagem Madin Darby oriundas de rim canino

DICT<sub>50</sub>= Dose infectante em cultura de tecido 50%

## SUMÁRIO

### CAPÍTULO 1

Introdução.....	14
Revisão de Literatura.....	17
1. Cinomose.....	17
2. Parvovirose Canina.....	20
3. Conjugado Coaglutinante.....	23
4. Extração de Ácidos Nucléicos.....	24
Objetivos.....	27

### CAPÍTULO 2

Padronização da Coaglutinação da Preparação de Ácidos Nucléicos do Parvovírus Canino Para Diagnóstico Molecular.....	30
--	----

### CAPÍTULO 3

Padronização da Coaglutinação na Preparação de Ácidos Nucléicos do Vírus da Cinomose para Diagnóstico Molecular.....	53
--	----

### CAPÍTULO 4

Discussão Geral.....	68
Conclusão Geral.....	71
Referências Bibliográficas.....	72
Anexo.....	83

RIBEIRO, M.C.M. “**Padronização da coaglutinação na preparação de ácidos nucléicos do parvovírus canino e vírus da cinomose para diagnóstico molecular**”. Botucatu, 2008. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.

A cinomose e a parvovirose canina são duas enfermidades infecto-contagiosas de grande importância para a clínica de pequenos animais onde a PCR vem sendo aplicada com ótimos resultados no diagnóstico. No entanto, para o sucesso da técnica, é necessário que o ácido nucléico esteja o mais puro possível e livre de inibidores das polimerases (Transcriptase reversa e/ou *Taq* DNA polimerase), desejando-se um método de extração simples e rápido. O teste de coaglutinação utilizando o *Staphylococcus aureus* (COA) é baseado na propriedade da proteína A de se ligar especificamente à porção Fc da imunoglobulina G de alguns mamíferos e algumas subclasses de IgG de camundongos. Assim, neste trabalho utilizou-se a coaglutinação para obtenção de DNA ou RNA livres de inibidores, com capacidade de concentração de partículas virais dispersas nas amostras biológicas e de forma simples, rápida e de baixo custo. Para tanto, 10 amostras de fezes positivas para o vírus da parvovirose canina e 17 amostras de urina positivas para o vírus da cinomose foram submetidas à extração de ácidos nucléicos utilizando o COA e kits comerciais para posteriormente serem analisadas pela PCR em tempo real e PCR convencional respectivamente. As amostras de fezes foram diluídas de 1: 10 a 1: 100 000 e as amostras de urina foram utilizadas puras. A metodologia desenvolvida foi eficiente na extração dos dois tipos de amostra. O método proposto demonstrou ser confiável e de baixo custo para a preparação de DNA e RNA viral para o diagnóstico molecular.

**Palavras-chave:** *Staphylococcus aureus*, coaglutinação, vírus da cinomose, vírus da parvovirose canina, diagnóstico molecular.

RIBEIRO, M.C.M. “**Standardization of Protein A Coagglutination for Preparing Canine Parvovirus and Canine Distemper Virus Nucleic Acids for Molecular Diagnosis**”. Botucatu, 2008. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.

PCR presents excellent results for the diagnosis of canine distemper and canine parvoviruses, two important infectious and contagious diseases for small animal internal medicine. However, success of technique depends on nucleic acid samples free of polymerase inhibitors (Reverse Transcriptase and / or Taq DNA polymerase). The coagglutination test using *Staphylococcus aureus* (COA) is based on the property of specific binding of protein A to the Fc portion of immunoglobulin G of some mammals and some of IgG subclasses of mice. This work was carried out the coagglutination procedure to obtain nucleic acid inhibitors free, with capacity for viral particle concentration dispersed in biological samples, simply, quickly and low cost. For this purpose, 10 canine parvovirus positive stool samples and 17 canine distemper virus positive urine samples were submitted to the preparation of nucleic acids using the COA and commercial kits in order to be analyzed by real-time PCR or conventional PCR respectively. Fecal specimens were diluted from 1: 10 to 1: 100 000 and urine samples were used pure. The developed methodology was efficient in extracting the two types of sample. The method proposed demonstrated to be reliable and cheap to prepare viral DNA or RNA for molecular diagnosis.

**Key words:** *Staphylococcus aureus*, coagglutination, canine distemper virus, canine parvovirus, molecular diagnosis.

---

# CAPÍTULO 1

## **Introdução**

O uso da PCR no diagnóstico molecular vem crescendo a ponto de hoje ser aceita como padrão ouro para a identificação de agentes etiológicos em diversas amostras, tornando-se uma ferramenta essencial nos laboratórios de pesquisa de diversas especialidades, incluindo a virologia (MACKAY et al., 2002). Entretanto, a utilidade da PCR na detecção de microorganismos em amostras biológicas complexas, como amostras clínicas, ambientais e alimentos é limitada em parte pela presença de substâncias inibidoras da PCR ou que reduzem a eficiência da amplificação. Os inibidores podem atuar interferindo na lise celular, degradando ou capturando os ácidos nucléicos e/ou interferindo na ação das polimerases (AL-SOUD e RÅDSTRÖM, 2000).

A cinomose e a parvovirose canina são duas enfermidades infecto-contagiosas de grande importância para a clínica de pequenos animais. Trata-se de doenças onde o diagnóstico laboratorial específico é imprescindível, uma vez que os sinais clínicos são inespecíficos e o hemograma nem sempre é característico. Sendo assim, em se tratando de duas enfermidades altamente contagiosas, o diagnóstico específico permite a prevenção da propagação da enfermidade entre os contactantes, principalmente em canis e abrigos, além da segregação destes animais em ambiente hospitalar, evitando assim a contaminação dos demais internados.

Desde 1995, a reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa (RT-PCR) é utilizada como ferramenta diagnóstica para cinomose (SHIN et al., 1995). Trata-se de uma técnica com alta sensibilidade analítica, porém, esta varia de acordo com o tipo de amostra, método de extração de RNA e escolha do primer (SAITO et al., 2006a). Porém, quando comparada com outras técnicas de detecção viral, as vantagens são muitas como, por exemplo, a realização do diagnóstico rápido e precoce (GEBARA et al., 2004) sendo, até o presente momento, o melhor método de diagnóstico ante mortem da enfermidade (SAITO et al., 2006b).

Diversos ensaios estão disponíveis para a detecção do CPV-2 em fezes de animais infectados. A hemaglutinação e o isolamento viral podem falhar na detecção de pequenas quantidades de vírus, ou se estes foram neutralizados pelos anticorpos secretados. Além disso, o efeito citopático, induzido pelo CPV-2 em culturas de células infectadas, freqüentemente não é evidenciado, necessitando de coloração para imunofluorescência, um trabalho adicional (DECARO et al, 2005a; ELIA et al, 2007). Por outro lado, métodos de baseados na detecção do DNA do CPV-2 mostram-se muito

sensíveis (UWATOKO et al, 1994; PEREIRA et al, 2000; STROTTMANN et al., 2008). Recentemente, foi desenvolvida uma técnica de PCR em tempo real, baseada na tecnologia TaqMan, que demonstrou-se específica, sensível e rápida, quando comparada com a PCR convencional (DECARO et al, 2005a; DESARIO et al., 2005).

A preparação adequada de uma amostra é formada pela obtenção eficiente do ácido nucléico alvo e sua integridade, remoção eficaz de inibidores da amplificação, eliminação dos componentes que afetam outros substratos enzimáticos e ausência de microorganismos potencialmente perigosos (TANG et al., 2005). Isso é particularmente importante no caso das amostras de fezes, utilizadas para diagnóstico do parvovírus, e de amostras de urina, utilizada para diagnóstico da cinomose. Há muitos estudos visando a eliminação ou a inibição destas substâncias, tais como a extração e purificação do DNA por separação imunomagnética, filtração em gel, aquecimento e diluição de amostras. Para o uso de rotina, é preferível um método de extração de ácido nucléico simples e rápido, que possa ser aplicado na identificação de patógenos diretamente das amostras de fezes, (UWATOKO et al., 1995) e, particularmente na medicina veterinária, barato.

O teste de coaglutinação utilizando o *Staphylococcus aureus* (COA) é baseado na propriedade da proteína A, presente em grande quantidade na cepa Cowan I do *S. aureus*, de se ligar especificamente à porção Fc da imunoglobulina G de alguns mamíferos (KRONVALL et al., 1970) incluindo o coelho, cobaio e algumas subclasses de IgG de camundongos. Assim sendo, quando anticorpos contra algum agente viral são adicionados, em condições ótimas de pH e temperatura, à suspensão de *S. aureus* previamente padronizada, forma-se um conjugado deixando a porção Fab da imunoglobulina livre para reagir com o antígeno (KRONVALL, 1973).

Este teste já foi utilizado com sucesso para a detecção de vários agentes virais como o rotavírus (PERET et al., 1995), vírus da febre aftosa (MONTASSIER et al., 1994), vírus da febre hemorrágica dos coelhos (PESHEV et al, 1996), parvovírus canino (SINGH et al., 1998) e o vírus da necrose hematopoiética infecciosa (BOOTLAND & LEONG, 1992). Nos trabalhos acima descritos, o teste mostrou-se específico, rápido, barato e com baixo limiar de detecção. Mesmo assim, observa-se que o mesmo não vem sendo utilizado na prática.

Diante do exposto, verificou-se a necessidade de técnicas de preparação de ácido nucléico com poder de eliminação de inibidores, presentes em grandes quantidades em alguns tipos de amostra biológicas, aliado a procedimentos que visem a concentração

específica do vírus da cinomose em urina e do parvovírus canino em suspensão de fezes.



## Revisão de Literatura

### 1. Cinomose

A cinomose canina é uma enfermidade viral sistêmica que frequentemente possui altos índices de letalidade em todo o mundo (BLIXENKRONE-MOLLER et al., 1991), sendo apenas menores que o da raiva canina (APPEL & SUMMERS, 1995).

O vírus da cinomose (CDV) pertence ao gênero *Morbilivirus* e à família *Paramyxoviridae*, onde também estão incluídos o vírus do sarampo, da peste bovina, da peste dos pequenos ruminantes e alguns vírus emergentes de mamíferos aquáticos (SEKI et al., 2003).

Os vírions são pleomórficos e apresentam cerca de 150nm de diâmetro. São constituídos por um nucleocapsídeo de simetria helicoidal, circundado por um envelope derivado da membrana celular do hospedeiro. O envelope é muito frágil, rendendo ao vírus vulnerabilidade à destruição por armazenamento, congelamento e até preparações para microscopia eletrônica (FENNER et al., 1993).

O genoma é composto por uma fita de RNA de fita simples negativa com aproximadamente 15 a 16 kilobases, contendo seis genes ligados por seqüências repetidas em tandem. Eles codificam cinco proteínas estruturais e duas proteínas não estruturais. A fosfoproteína (P) e a grande proteína (L) estão associadas a nucleoproteína (NP) e são necessárias para a replicação e transcrição. As glicoproteínas são a hemaglutinina (H) e a de fusão (F), esta última comanda a fusão do envelope viral com a membrana celular, auxilia a anexação viral e, além disso, é responsável pela fusão célula-célula que permite a propagação viral, sem a sua liberação, mesmo na presença de anticorpos. Devido a isso, a proteína F tem papel importante na patogenia da infecção dos paramyxovirus, incluindo a infecção persistente (FENNER et al., 1993). Já a proteína H é a que apresenta maior diversidade e, por isso, é a mais adequada para monitorização de mudanças genéticas no vírus (MURPHY et al, 1999).

O CDV é extremamente sensível ao calor e a dessecação e é inativado por temperaturas maiores que 50°C a 60°C por trinta minutos. Em tecidos e secreções, ele sobrevive por pelo menos uma hora a 37 °C e por três horas a 20°C. Em climas temperados, o vírus não persiste nos canis após a remoção dos animais infectados. O tempo de sobrevivência e armazenamento em temperaturas baixas é longo. A temperaturas de 4°C a 0°C ele permanece viável por semanas e a temperaturas menores que -65°C,

ele permanece estável por pelo menos sete anos. CDV permanece viável em pH entre 4,5 a 9,0. Procedimentos de desinfecção de rotina são eficazes para a destruição viral em canis e hospitais (GREENE & APPEL, 2006).

A cinomose é uma enfermidade comum em cães jovens, principalmente entre 3 e 6 meses de idade, período onde há queda do título de anticorpos maternos. Porém, ela pode ocorrer em qualquer faixa etária, principalmente em populações onde o vírus está amplamente disseminado. No Brasil, a cinomose é endêmica, podendo representar até 6% das ocorrências clínicas e até 11% das mortes em cães (HEADLEY & GRAÇA, 2000).

A eliminação do vírus inicia 7 dias pós-infecção. O CDV é mais abundante nos exsudatos respiratórios e é comumente disseminado por aerossóis. Entretanto, pode ser isolado de outros tecidos e secreções, incluindo a urina. O vírus pode ser secretado por 60 a 90 dias pós-infecção, porém, períodos menores de eliminação são mais comuns. Pode ocorrer também infecção transplacentária e dependendo do estágio da gestação, pode ocorrer aborto, natimortos ou nascimento de filhotes com ou sem sinais clínicos, que podem desenvolver sinais neurológicos durante as primeiras quatro a seis semanas de vida. Os filhotes sobreviventes vão apresentar imunossupressão permanente devido aos danos nos tecidos linfóides primordiais (GREENE & APPEL, 2006).

A manifestação clínica da cinomose varia na dependência da virulência da estirpe, da idade e do perfil imunológico do cão (AMUDE et al., 2007a). Mais de 50% das infecções são subclínicas ou apresentam sinais clínicos moderados (SILVA et al., 2007).

A infecção inicial ocorre nas células epiteliais e no tecido linfóide da nasofaringe, a primeira replicação acontece no tecido linfóide do trato respiratório. A febre é intermitente e seguida de linfopenia, que pode ser observada entre 3 e 6 dias pós-infecção e que coincide com a primeira viremia, resultando na infecção de todo tecido linfóide. A segunda viremia é precedida de hipertermia severa e se mantém por vários dias, permitindo a infecção de células epiteliais por todo o corpo do animal. Ela é acompanhada pelo início da fase sintomática, caracterizada por descarga nasal serosa, conjuntivite e anorexia. Sinais gastrointestinais e respiratórios podem ocorrer e frequentemente são agravados por infecções bacterianas secundárias. Pode ocorrer também encefalomielite em associação ou imediatamente após a fase sistêmica, dependendo da estirpe viral. A hiperqueratose de coxins e do epitélio nasal também são sinais clínicos frequentemente observados (VON MESSLING et al., 2003).

O animal pode apresentar diversos sinais neurológicos, estes dependem da área do SNC afetada. Mais de 30% dos cães manifestam sinais neurológicos durante ou após a infecção por CDV e a maioria dos animais selvagens infectados apresenta alguma evidência de sinais neurológicos (RUDD et al., 2006). Geralmente, a mioclonia é considerada a manifestação clássica da infecção (KOUTINAS et al., 2002, SAITO et al., 2006a).

A possibilidade da realização do diagnóstico laboratorial *ante-mortem* da cinomose canina é de fundamental importância para os clínicos. A confirmação e/ou exclusão do CDV como provável etiologia possibilita a realização do prognóstico de forma mais objetiva e de condutas terapêuticas mais adequadas, além de proporcionar a adoção de medidas de controle e profilaxia diferenciadas e específicas, mais apropriadas para cada caso (NEGRÃO et al., 2007).

Para realização do diagnóstico laboratorial *ante-mortem* da enfermidade, vários métodos já foram desenvolvidos, destacando-se a pesquisa de corpúsculos de inclusão, presentes em neutrófilos circulantes, a imunofluorescência direta, imuno-histoquímica e o isolamento do CDV em cultivo celular. Porém, todos os métodos apresentam desvantagens, como baixa sensibilidade e ou especificidade, etapas laboriosas de processamento do material biológico e tempo necessário para conclusão do resultado (FRISK et al., 1999).

A transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) é uma técnica molecular utilizada com o objetivo de identificação precoce do CDV em cães com sinais clínicos da infecção (FRISK et al., 1999; NEGRÃO et al., 2007). Trata-se de uma técnica muito sensível, porém sua sensibilidade varia com o tipo de amostra empregada, método de extração do ácido nucléico e com a escolha dos primers (SAITO et al., 2006a).

Na dependência exclusiva da forma de apresentação clínica e da evolução da cinomose, o vírus pode estar presente em uma gama de amostras biológicas. Nos diferentes estágios da infecção, urina, sangue total, leucócitos, fezes, saliva, secreção respiratória e líquido podem apresentar títulos variados do vírus (FRISK et al., 1999; SAITO et al., 2006a; KIM et al., 2006; AMUDE et al., 2006).

A detecção do CDV em amostra de urina vem recentemente ganhando importância no diagnóstico da cinomose. A coleta de urina é realizada com maior facilidade que o LCR e pode ser utilizada tanto para animais com ou sem sinais neurológicos. Em estudo realizado por Saito et al. (2006a), a sensibilidade da RT-PCR

em urina foi muito semelhante a obtida com LCR, sendo positiva em todos os casos de cinomose e apresentando uma sensibilidade maior que no soro e em leucócitos. Negrão et al. (2007) também obteve um percentual de positividade para o CDV em urina maior que a encontrada em leucócitos.

Elia et al. (2006) relataram pela primeira vez o uso da PCR em tempo real para detecção do CDV. Neste ensaio a detecção foi tanto qualitativa, quanto quantitativa, possibilitando o cálculo preciso da carga de RNA nas diversas amostras testadas. Foram incluídos tanto fragmentos de diversos tecidos, como também swabs e secreções, como LCR, urina e sangue, além de medula óssea e, mais uma vez, a urina foi considerada o material de escolha para o diagnóstico ante-mortem.

## **2. Parvovirose Canina**

O parvovirus canino tipo 2 (CPV-2) foi reconhecido pela primeira vez no verão de 1978. O primeiro relato da enfermidade foi feito nos Estados Unidos, porém, na Austrália e na Europa, cientistas o reconheceram simultaneamente (CARMICHAEL, 2005). O vírus pertence à família *Parvoviridae*, ao gênero *Parvovirus* e ao subgrupo do parvovírus felino, em conjunto com o vírus da panleucopenia felina, parvovírus da raposa azul, vírus da enterite dos minks e do parvovírus dos guaxinins (REED, 1988; TRUYEN, 1999). Acredita-se que o CPV tenha se originado como um variante do vírus da panleucopenia felina (FPV). Várias hipóteses foram formuladas como, a mutação direta do FPV, uma mutação proveniente do FPV vacinal e a adaptação aos cães de parvovírus provenientes de outros carnívoros (TRUYEN, 2006).

CPV-2 possui um genoma de DNA de fita simples contendo 5200 nucleotídeos. Este possui duas ORFs, uma presente na metade 3' do genoma, que codifica as proteínas não estruturais, e outra presente na porção 5', que codifica as proteínas estruturais. Os genes estruturais e não estruturais se iniciam em promotores separados. Os RNAs destas proteínas possuem sítios de adição de poli A coterminais e sofrem *splicing* alternativo para a síntese de proteínas (REED et al., 1988). Sessenta cópias de uma combinação de sobreposições de VP1 e VP2 circundam o DNA formando um capsídeo icosaédrico de 28 nm (HUEFFER et al, 2003). Substituições de aminoácidos na seqüência da proteína VP2 são conhecidas como a causa de alterações nas propriedades imunogênicas e antigênicas (DECARO et al, 2005a). FPV e CPV isolados diferem em cerca de 0,5% da seqüência de DNA e as propriedades características do

CPV-2 são observadas como pequenas alterações na superfície do capsídeo. As diferenças entre o FPV e o CPV estão localizadas na proteína VP2 nos resíduos K93N e no D323N. Estas mudanças permitiram a infecção de células caninas, o aparecimento de um epítipo antigênico CPV-específico e uma diferença pH dependente na hemaglutinação dentro do FPV (HUEFFER et al, 2003).

Após a sua descoberta, a estirpe original do CPV-2 foi substituída por uma nova que pode ser distinguida utilizando anticorpos monoclonais. Este novo tipo antigênico foi chamado de CPV-2a e ao longo do tempo, um novo vírus apresentando outra pequena mutação, denominado CPV-2b se disseminou rapidamente pelo mundo (HUEFFER et al, 2003; TRUYEN, 2006). No Brasil, a epizootia seguiu o mesmo padrão observado nos Estados Unidos, com o surgimento do CPV-2 acompanhado da sua substituição pela variante 2a, nos anos 80 e, na década seguinte, pela variante 2b (PEREIRA et al.,2000).

As variantes antigênicas do CPV substituíram completamente o tipo-2 original e hoje possuem distribuição variável na população canina mundial. Há pelo menos seis ou sete aminoácidos diferentes entre as variantes 2a/b e o tipo-2 original. Estas pequenas alterações nos aminoácidos na VP2 do FPV, CPV-2 e CPV-2a/b respondem pela importância das mudanças antigênicas e biológicas observadas, colocando o CPV como um modelo importante no estudo da evolução viral (MARTELLA et al., 2006).

Recentemente, uma variante antigênica foi relatada na Itália, com uma substituição de aminoácidos no resíduo D426E (BUONAVOGLIA et al., 2001), devido a uma alteração no nucleotídeo T4064A, em relação ao CPV 2b. Esta mutação afetou a maior região antigênica, localizada sobre o eixo de simetria 3 do capsídeo viral, possibilitando o desenvolvimento de um painel de anticorpos monoclonais capaz de diferenciar o tipo 2b do mutante 426E (NAKAMURA et al., 2004), denominado parvovirus 2c (DECARO et al, 2005b). Esta variante também foi detectada no Vietnã (NAKAMURA et al., 2004), em outros países da Europa (DECARO et al., 2007), nos Estados Unidos (HONG et al, 2007) e recentemente, na América do Sul (PÉREZ et al., 2007). Ainda não há um perfil clínico - epidemiológico para esta nova cepa, mas algumas diferenças no curso clínico já foram relatadas, como por exemplo, sinais clínicos brandos com ausência de diarreia e vômitos (DECARO et al., 2005b; BUONAVOGLIA et al., 2001). Porém, Pérez et al. (2007) relata enterite hemorrágica severa e óbitos frequentes em filhotes infectados com o CPV-2c no Uruguai.

O CPV-2 é altamente contagioso e a maioria das infecções ocorre como resultado do contato com fezes contaminadas no ambiente. Além disso, pessoas, instrumentos, insetos e ratos podem servir de vetores. Cães podem carrear o vírus no seu pêlo por longos períodos (MACCAW & HOSKINS, 2006).

Durante a infecção natural, o CPV parasita células do sistema linfopoiético que se dividem ativamente. A replicação inicial ocorre no tecido linfóide orofaríngeo e o vírus se dissemina por via hematogena para os outros órgãos linfóides e para o intestino (PARKER, 2001). A distribuição viral do CPV tem padrões similares em cães infectados com os tipos a, b e c, revelando que as variantes possuem o mesmo comportamento biológico (DECARO et al., 2006). Os parvovirus se multiplicam em células mitoticamente ativas, durante a fase S do ciclo celular (PARKER, 2001). Estas células expressam uma grande quantidade de receptores de transferrina onde o CPV se liga para que ocorra a penetração (TRUYEN, 2006). Cerca de 3 a 10 dias pós-infecção, os cães desenvolvem gastroenterite aguda, caracterizada pela perda de apetite, êmese, febre, leucopenia e diarreia (de mucóide a hemorrágica) (DECARO et al, 2006), induzindo a atrofia de vilosidades, dilatação e necrose das criptas intestinais (COOPER et al, 1979).

O diagnóstico da parvovirose é realizado em fezes de animais diarreicos, através do ELISA, imunocromatografia (IC) ou teste de hemaglutinação (HA), mas essas técnicas apresentam baixa sensibilidade analítica (DESARIO et al., 2005). A IC é um teste simples, rápido e não requer mão de obra especializada para a sua realização (ESFANDIARI & KLINGEBORN, 2000), entretanto é necessária uma grande quantidade de antígeno para produzir uma banda visível, o que torna a sua interpretação subjetiva. Já a reação de hemaglutinação (HA) necessita de hemácias frescas de suínos, portanto, requer animais sempre disponíveis para a coleta e mão de obra para manuseá-los. Além disso, para uma leitura clara, os eritrócitos devem ser de boa qualidade, uma vez que o teste é afetado pelo coeficiente de sedimentação das hemácias e este pode estar alterado se o suíno estiver enfermo ou for submetido a situações de estresse. Outro problema seria a existência de estirpes de CPV-2 que não possuem atividade hemaglutinante (PARRISH et al., 1988; CAVALLI et al, 2001) o que propicia resultados falso-negativos. O isolamento viral é um método mais sensível, porém, é laborioso e demorado para ser utilizado como um teste de rotina, além de ser oneroso e dependente de estrutura laboratorial adequada. Por outro lado, métodos baseados na detecção do DNA do CPV-2 por PCR mostram ser bastante sensível (DESARIO et al.,

2005; UWATOKO et al., 1995; PEREIRA et al., 2000; STROTTMANN et al., 2008). A PCR em tempo real é particularmente sensível, específica e reproduzível, permitindo a detecção e quantificação do ácido nucléico do CPV-2 em poucas horas (DECARO et al., 2005; DESARIO et al., 2005).

A sensibilidade da PCR pode ser útil para a detecção do CPV em amostras ambientais, como água, alimentos ou equipamentos hospitalares, permite assim a detecção de fontes de contaminação por CDV em hospitais, prevenindo assim infecções secundárias (UWATOKO, et al., 2005).

### 3. Conjugado Coagulante

O teste de coaglutinação utilizando o *Staphylococcus aureus* (COA) é baseado na propriedade da proteína A, presente em grande quantidade na cepa Cowan I, de se ligar especificamente à porção Fc da imunoglobulina G de alguns mamíferos (KRONVALL et al., 1970).

A proteína A é a maior proteína de superfície de algumas cepas de *S. aureus* (O'SEAGHDHA et al, 2006), possuindo peso molecular de 42 Kd (MOVITZ, 1974). O carboidrato e o ácido teicóico da parede celular do *Staphylococcus* são presos a cadeias de glicanos, enquanto que ligações covalentes na superfície das proteínas, como a proteína A, estão ligadas a pontes de pentaglicinas. A proteína A é sintetizada no citoplasma como um precursor, carregando um peptídeo sinal N-terminal para a iniciação dentro da via secretória e a um sinal na porção C-terminal para a incorporação no envelope. A sortase A cliva o sinal entre a treonina e a glicina no motivo LPXTG. O polipeptídeo clivado é capturado como um tioéster intermediário ligado ao sítio thiol ativo da sortase. A superfície da proteína ligada ao precursor do peptidoglicano é então incorporada ao envelope da parede celular via reação de transpeptidação e transglicosilação. Acredita-se que ela se apresenta em alguns locais da superfície bacteriana, com pelo menos dois, mas não mais que quatro focos em toda superfície esférica da bactéria (DEDENT et al., 2007).

A proteína contém cinco domínios homólogos, cada um possui três feixes de alfa-hélice formados por 57 a 60 resíduos. Esses domínios são estáveis como fragmentos e são denominados E, D, A, B, e C, dirigindo-se da terminação N para a C, seguida por uma região repetida, polimórfica e variável Xr e uma região conservada Xc, onde se ligam à parede celular (ALONSO & DAGGETT, 1999; O'SEAGHDHA et al, 2006). Os

resíduos das duas primeiras hélices são importantes para a ligação da porção Fc do anticorpo, mais precisamente no seu domínio B. Além disso, uma variante menor do domínio da proteína A, contendo apenas as duas primeiras hélices, indica que as espirais desta região não são apenas necessárias, mas também suficientes para a ligação da porção Fc do anticorpo (STAROVASNIK et al., 1997).

Sendo assim, quando anticorpos específicos são adicionados a uma suspensão de *S. aureus* estabilizada, os anticorpos se ligam à proteína A, orientando a porção Fab para o exterior da superfície celular e permitindo a interação com o antígeno e, conseqüentemente, a coaglutinação (KRONVALL et al., 1970).

Esta propriedade da proteína A já foi explorada para o diagnóstico de infecções bacterianas (VARSHNEY, B.C. et al, 2007; DEL RIO et al., 2003) e virais (PERET et al., 1995; MONTASSIER et al., 1994; PESHEV et al, 1996; BOOTLAND & LEONG, 1992; SINGH et al., 1998) e também para o diagnóstico de diversas enterotoxinas bacterianas. Nos trabalhos acima descritos, o teste mostrou-se específico, rápido, barato e com baixo limiar de detecção.

#### **4. Extração de Ácidos Nucléicos**

Diversos protocolos já foram descritos para o preparo de amostras visando a amplificação de ácidos nucleicos, no entanto, devido a presença de impurezas nesses materiais, a maioria dos métodos de preparo disponíveis focam na obtenção de ácidos nucleicos o mais purificados possível (QUINN, 1997).

Fatores inibitórios da amplificação de ácidos nucleicos pela PCR estão presentes na amostra, com o DNA-alvo, de diversas maneiras. Geralmente, os inibidores atuam em um ou mais dos três pontos essenciais da reação, através da interferência na lise celular, necessária para a liberação do ácido nucleico, degradação ou captura do alvo ou pela inibição da atividade das polimerases (WILSON, 1997). Na PCR em tempo real, tais substâncias podem interferir na geração e/ou na detecção do sinal fluorescente, influenciando na análise dos resultados (FLEKNA et al., 2007).

Dentre os inibidores mais comuns, estão os fluidos biológicos, reagentes utilizados na clínica ou na medicina forense e componentes ambientais, além de componentes bacterianos, outros DNAs presentes na amostra, itens de laboratório, como pó de luvas de procedimento e resíduos de reagentes utilizados na própria extração (WILSON, 1997).



Diferentes técnicas são empregadas na tentativa de reduzir a ação dos inibidores da PCR e/ou separá-los do ácido nucléico alvo. Sistemas aquosos de duas fases, fervura, centrifugação em gradiente de densidade, diluição da amostra, filtração, utilização de meios de enriquecimento e técnicas imunológicas, já foram utilizadas para facilitar a PCR (AL-SOUD & RÅDSTRÖM, 1998).

Metodologias de extração tradicionais ainda são muito difundidas. O método utilizando fenol/clorofórmio seguido da precipitação com etanol é um dos mais comuns. Trata-se de uma técnica efetiva na remoção de inibidores e na concentração do ácido nucléico (QUINN, 1997), porém é laboriosa e possui desvantagens como consumir um longo período de tempo para a sua realização, possuir eficiência variável entre as extrações e necessitar de indivíduos treinados para a sua execução (KNEPP et al., 2003), além de gerar resíduos tóxicos que exigem tratamento e métodos adequados de descarte.

Atualmente existe um grande número de kits de extração disponíveis no mercado. Estes métodos utilizam detergentes e um sal caotrópico para a lise celular. Quando a solução, contendo o ácido nucléico livre, é adicionado à coluna de fibra de vidro, ele se liga à matriz da mesma e após lavagens seriadas visando a eliminação de contaminantes e inibidores, o ácido nucléico purificado é eluído em água livre de nucleases (Favorgen). Este tipo de metodologia tem a vantagem de ser rápida, de minimizar erros durante seu processamento e também reduzir a contaminação entre amostras, devido ao número reduzido de passos (RIEMANN et al., 2007).

Além da matriz de fibra de vidro, outras substâncias são utilizadas, como filtros de afinidade para ácidos nucléicos (Millipore), esferas magnéticas (Promega), membranas com sílica (QIAGEN). Entretanto, o custo destes kits é elevado, prejudicando o uso para rotina na medicina veterinária, principalmente quando relacionado a animais de produção.

Outro problema associado à extração de ácidos nucléicos de amostras biológicas por métodos tradicionais ou utilizando “kits” está relacionado ao volume de amostra utilizado. Normalmente se emprega pequena quantidade de amostra, que em determinados “kits” é de 250 µl ou menos para RNA (TRIZOL-LS - Invitrogen) e de, no máximo, 220 mg de fezes para DNA (QiAmp DNA stool Mini Kit- QIAGEN). Isto pode, mesmo utilizando a PCR, que tem altíssima sensibilidade analítica, apresentar resultados falsos negativos em decorrência da inexistência do alvo (vírus) na amostra selecionada para extração.

As técnicas moleculares, principalmente as baseadas no uso da PCR, possuem também alta especificidade analítica. Entretanto, existem várias situações onde a amplificação inespecífica de alvos de DNA da amostra resulta em bandas com tamanho próximo ao desejado, gerando resultados falso-positivos. Isso é importante em material fecal que pode conter DNAs bacterianos que diferem bastante de animal para animal. Assim, se houvesse uma forma de extração que já apresentasse especificidade, este problema seria em muito minimizado.

## **Objetivos**

O presente trabalho tem por objetivo principal padronizar a coaglutinação como auxílio na preparação específica de RNA de urina, para identificação do vírus da cinomose e de DNA de fezes, para identificação do parvovírus canino. Além disso, objetiva-se verificar a possibilidade de real eliminação dos inibidores da PCR nas amostras, principalmente de fezes, verificar a capacidade de concentração de partículas virais dispersas nas amostras biológicas e comparar a técnica proposta com kit comercial para extração de ácidos nucleicos.

---

## **CAPÍTULO 2**

Trabalho a ser enviado para a revista “Journal of Virological Methods”<sup>•</sup>.

**Padronização da Coaglutinação na Preparação de Ácidos Nucléicos do  
Parvovírus Canino Para Diagnóstico Molecular**

Marcela Cristina Mendes Ribeiro<sup>a</sup>, João Pessoa Araújo Jr<sup>a</sup>.

<sup>a</sup> Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, UNESP/Campus Botucatu, Distrito de Rubião Jr. s/n., cep. 18618-000, Botucatu, São Paulo, Brasil.

---

<sup>•</sup> As normas de publicação da revista encontram-se no Anexo 1.

## Padronização da Coaglutinação na Preparação de Ácidos Nucléicos do Parvovírus Canino Para Diagnóstico Molecular

Marcela Cristina Mendes Ribeiro<sup>a</sup>, João Pessoa Araújo Jr<sup>a,1</sup>.

<sup>a</sup> Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, UNESP/Campus Botucatu, Distrito de Rubião Jr. s/n., cep. 18618-000, Botucatu, São Paulo, Brasil.

### Resumo

A parvovirose canina é uma enfermidade infecto-contagiosa de grande importância para a clínica de pequenos animais onde a PCR vem sendo aplicada com ótimos resultados no diagnóstico. No entanto, para o sucesso da técnica, é necessário que o ácido nucléico esteja o mais puro possível e livre de inibidores, desejando-se um método de extração simples e rápido. O teste de coaglutinação utilizando o *Staphylococcus aureus* (COA) é baseado na propriedade da proteína A de se ligar especificamente à porção Fc da imunoglobulina G de alguns mamíferos e algumas subclasses de IgG de camundongos. Assim, neste trabalho utilizou-se a coaglutinação para obtenção de DNA livre de inibidores, com capacidade de concentração de partículas virais dispersas nas amostras biológicas e de forma simples. Para tanto, 10 amostras de fezes positivas para o vírus da parvovirose canina foram submetidas à extração de ácidos nucléicos utilizando o COA e com kit comercial para posteriormente serem analisadas pela PCR em tempo real. A metodologia desenvolvida foi eficiente na extração deste tipo de amostra. Com a utilização dessa técnica foi possível extrair uma maior quantidade de DNA viral em fezes em relação ao kit comercial (Illustra™ GFX™ Genomic Blood DNA Purification Kit/ G.E. Healthcare).

**Palavras-chave:** *Staphylococcus aureus*, coaglutinação, vírus da parvovirose canina, diagnóstico molecular.

---

<sup>1</sup> Autor para correspondência: (14) 3811-6240 ou (14) 3811-6058  
e-mail: [jpessoa@ibb.unesp.br](mailto:jpessoa@ibb.unesp.br)  
Apoio: FAPESP

## 1. Introdução

O parvovírus canino (CPV-2) é um agente infeccioso altamente contagioso, causador de gastroenterite em cães. Devido ao fato de a infecção se disseminar rapidamente entre os animais suscetíveis, um diagnóstico rápido é essencial para o controle da doença e para o tratamento correto. Como a carga viral eliminada pelas fezes do animal enfermo é elevada, este material é o mais utilizado para a identificação viral (TERAMOTO et al., 1984).

O diagnóstico laboratorial da parvovirose em fezes de animais diarréicos é realizado através do ELISA, imunocromatografia (IC) ou teste de hemaglutinação (HA), entretanto, tais técnicas apresentam baixa sensibilidade analítica (DESARIO et al., 2005a). A IC é um teste simples, rápido e não requer mão de obra especializada para a sua realização (ESFANDIARI & KLINGEBORN, 2000), porém é necessária uma grande quantidade de antígeno para produzir uma banda visível, o que torna a sua interpretação subjetiva. Já a reação de hemaglutinação necessita de hemácias frescas de suínos e, portanto, requer animais sempre disponíveis para a coleta e mão de obra para manuseá-los. Além disso, para uma leitura clara, os eritrócitos devem ser de boa qualidade, uma vez que o teste é afetado pelo coeficiente de sedimentação das hemácias, que pode estar alterado se o suíno estiver enfermo ou for submetido a situações de estresse. Outro problema seria a existência de estirpes de CPV-2 que não possuem atividade hemaglutinante (PARRISH et al., 1988; CAVALLI et al., 2001) o que propicia resultados falso-negativos. O isolamento viral é um método mais sensível, porém, é laborioso e demorado para ser utilizado como um teste de rotina, além de ser dependente de estrutura laboratorial adequada. Por outro lado, métodos baseados na detecção do DNA do CPV-2 por PCR mostram ser bastante sensíveis (DESARIO et al., 2005; UWATOKO et al., 1995; PEREIRA et al., 2000; STROTTMANN et al., 2008). A PCR em tempo real é particularmente sensível, específica e reproduzível, permitindo a detecção e quantificação do ácido nucléico do CPV-2 em poucas horas (DECARO et al., 2005a; DESARIO et al., 2005).

Diversos protocolos já foram descritos para o preparo de amostras visando a amplificação de ácidos nucléicos, no entanto, devido a presença de impurezas nesses materiais, a maioria dos métodos de preparo disponíveis focam na obtenção de ácidos nucléicos o mais purificado possível (QUINN, 1997).

Fatores inibitórios da amplificação de ácidos nucleicos pela PCR estão presentes na amostra, com o DNA-alvo, de diversas maneiras. Geralmente, os inibidores atuam em um ou mais dos três pontos essenciais da reação, através da interferência na lise celular, necessária para a liberação do ácido nucleico, degradação ou captura do alvo ou pela inibição da atividade das polimerases (WILSON, 1997). Na PCR em tempo real, tais substâncias podem interferir na geração e/ou na detecção do sinal fluorescente, influenciando na análise dos resultados (FLEKNA et al., 2007).

Diferentes técnicas são empregadas na tentativa de reduzir a ação dos inibidores da PCR e/ou separá-los do ácido nucleico alvo. Sistemas aquosos de duas fases, fervura, centrifugação em gradiente de densidade, diluição da amostra, filtração, utilização de meios de enriquecimento e técnicas imunológicas, já foram utilizadas para otimizar a PCR (AL-SOUD e RÅDSTRÖM, 1998).

O teste de coaglutinação utilizando o *Staphylococcus aureus* (COA) é baseado na propriedade da proteína A, presente em grande quantidade na cepa Cowan I do *S. aureus*, de se ligar especificamente à porção Fc da imunoglobulina G de alguns mamíferos (KRONVALL et al., 1970) incluindo o coelho, cobaio e algumas subclasses de IgG de camundongos. Assim sendo, quando anticorpos contra algum agente viral são adicionados, em condições ótimas de pH e temperatura, à suspensão de *S. aureus* previamente padronizada, forma-se um conjugado deixando a porção Fab da imunoglobulina livre para reagir com o antígeno (KRONVALL, 1973). Dessa forma, quando uma suspensão contendo o agente viral é colocada para reagir com esse conjugado, forma-se um complexo que pode ser facilmente separado por centrifugação.

Esta propriedade da proteína A já foi explorada para o diagnóstico de infecções bacterianas (DEL RIO et al., 2003; VARSHNEY, B.C. et al, 2007) e virais (BOOTLAND & LEONG, 1992; MONTASSIER et al., 1994; PERET et al., 1995; PESHEV et al, 1996; SINGH et al., 1998) e também para o diagnóstico de diversas enterotoxinas bacterianas. Nos trabalhos acima descritos, o teste mostrou-se específico, rápido, barato e com baixo limiar de detecção.

No presente trabalho, objetiva-se empregar a coaglutinação como ferramenta para o preparo de amostras para serem utilizadas diretamente na amplificação do DNA.



## **2. Material e Métodos**

### **2.1 Obtenção e Purificação do Vírus Padrão**

A suspensão do parvovírus canino tipo 2b<sup>2</sup> foi inoculada em monocamada de células CRFK apresentando aproximadamente 60% de confluência em meio MEM acrescido de 1% de soro fetal bovino. O material foi armazenado a temperatura de -70°C até o momento do uso.

A suspensão viral foi purificada em gradiente de cloreto de céσιο (TERAMOTO et al., 1984). A amostra foi fracionada e de cada fração, foi realizada leitura em comprimento de onda 260 nm e 280 nm. As frações correspondentes à densidade de 1,39 g/cm<sup>3</sup> a 1,42g/cm<sup>3</sup> foram separadas e armazenadas a temperatura de -70°C para posterior quantificação protéica, realizada através do método de BCA, segundo Smith et al. (1985).

### **2.2. Produção do Conjugado Coaglutinante**

#### **2.2.1. Obtenção do Anti-soro**

Anti-soro contra o CPV-2 foi obtido através da inoculação, por via subcutânea, de uma suspensão de vírus purificado contendo 50µg/ml de proteína, em cobaio. As preparações dos antígenos foram emulsificadas com adjuvante completo de Freund (v/v), 500ul da preparação foram inoculados e o procedimento repetido após 20 dias. Decorridos 30 dias da primeira inoculação, os animais foram sangrados e os soros inativados a 56°C por trinta minutos, distribuídos em frações de 2ml e armazenados a -20°C até o momento do uso.

Para a quantificação dos títulos de anticorpos, utilizou-se a técnica de inibição da hemaglutinação descrita por Carmichael, 1980.

---

<sup>2</sup> Gentilmente cedida pela Profa. Dra. Alice Fernandes Alfieri do Depto de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina

### **2.2.2. Suspensão de *Staphylococcus aureus***

Uma alíquota de *S. aureus* cepa Cowan I foi semeada em meio ágar sangue, para verificação de possíveis contaminantes e, após 24 horas a 37°C, cerca de 4 colônias foram repicadas em caldo BHI e incubadas sob as mesmas condições anteriores. Meio mililitro desta suspensão foi adicionado a erhlenmeyers contendo Muller-Hinton acrescido de 0,5% de extrato de levedura e mantidos por 18 horas a 37°C, sob agitação a 140 rpm. A bactéria então foi centrifugada a 5000 x g por 10 minutos a 4°C e o pellet foi lavado 3 vezes em PBS pH 7,4 (0.14 M NaCl, 0.01 M PO<sub>4</sub>) , sob as mesmas condições. A suspensão foi inativada com 0,5% de formaldeído em PBS a 4°C por 18 horas. Novamente o material foi lavado por três vezes e então a bactéria foi aquecida a 80°C por 20 minutos e o procedimento de lavagem repetido. Por fim, o pellet foi ressuspensionado em PBS contendo 0,5% de tween 20 e 0,05% de azida sódica. A concentração da suspensão bacteriana diluída vinte vezes foi monitorada por espectrofotometria a 525nm, onde a absorvância de 0,69 corresponde a aproximadamente  $2,3 \times 10^{10}$  cels/ml (GODING, 1978). A suspensão foi armazenada a 4°C por, no máximo, 3 meses.

### **2.2.3 Preparo do Conjugado Coaglutinante (COA)**

O COA anti-CPV-2 foi preparado através da mistura de 2ml da suspensão padronizada de *S. aureus*, previamente lavada com PBS, com 20µl, 30µl, 40µl ou 80 µl de anti-soro. Após trinta minutos de incubação a temperatura ambiente, a mistura foi centrifugada por 4000 x g por 10 minutos, lavada três vezes com PBS e ressuspensionada em PBS contendo 0,5% de tween 20 e 0,05% de azida sódica (MONTASSIER et al.,1994). Um COA controle foi preparado com soro de cobaio normal inativado.

## **2.3 Obtenção das Amostras Biológicas**

Foram selecionadas dez amostras de fezes de animais atendidos no Ambulatório de Enfermidades Infecciosas dos Animais do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Campus de Botucatu que apresentaram histórico e sinais sugestivos de parvovirose canina e que apresentaram resultado positivo na PCR tradicional (item 2.7).

Selecionou-se também uma amostra negativa para posterior tratamento com o vírus padrão e que também foi preparada com o conjugado anti-CPV-2. As amostras foram coletadas através de sondagem retal e armazenadas a temperatura de a -20°C.

## **2.4 Preparo do Ácido Nucléico**

### **2.4.1. Tratamento das Amostras**

As amostras foram diluídas 1:10 com PBS pH 7,4, homogeneizadas e centrifugadas a 291 x g, por 15 minutos a temperatura ambiente. Coletou-se o sobrenadante e, para cada 100 µl, 10 µl de clorofórmio foram adicionados. A amostra foi homogeneizada, incubada por 10 minutos a 8°C, centrifugada nas mesmas condições anteriores (CARMICHAEL, 1980). O sobrenadante obtido foi aquecido a 37°C para a eliminação de possíveis resíduos de clorofórmio os quais poderiam interferir no preparo da amostra e na PCR.

### **2.4.2. Preparo da Amostra Utilizando COA anti-CPV-2.**

Para o preparo de DNA, a 1ml de cada amostra tratada e diluída, de  $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ , foi adicionada 20µl, 30 µl, 40 µl ou 50 µl do COA anti-CPV-2. Estas foram incubadas por trinta minutos com agitação ocasional e então centrifugadas por 12000 x g por 10 minutos a 4°C. O pellet formado foi lavado com PBS por duas vezes e, por último, foi ressuspenso em 50 µl tampão para proteinase K (50 mM TRIS-HCl pH 8,0, 1mM CaCl<sub>2</sub>, 3mM DTT). Em seguida, foi adicionada a suspensão final 10ul de Proteinase K a 20ng/ml, incubado por 2 horas a 56 °C e então aquecido a 99°C por 10 minutos, para inativação da proteinase K. Este procedimento também foi realizado com uma amostra negativa. Uma amostra positiva foi preparada com o COA controle. As amostras foram centrifugadas e o sobrenadante utilizado para o diagnóstico molecular por PCR em tempo real.

### **2.4.3. Método de Extração Utilizando Kits Comerciais.**

Todas as amostras previamente diluídas, como descrito anteriormente, tiveram seu DNA extraído com o Illustra™ GFX™ Genomic Blood DNA Purification Kit (G.E.

Healthcare), no mesmo momento do preparo da amostra com o conjugado. Conforme recomendação do fabricante partiu-se de 100µl de amostra previamente tratada como descrito no item 2.4.1.

## **2.5. Determinação da Eficiência da Extração**

A 1ml de uma amostra previamente tratada e sabidamente positiva foram adicionados 1ml, 3ml, 7ml, 15ml e 31ml de PBS, com o objetivo de diluir a amostra sem modificar o número de partículas virais existentes. Foram adicionados 20 µl de conjugado (item 2.4.2), independentemente do volume da amostra. Uma alíquota de 100ul de cada diluição foi retirada, antes da adição do COA, para extração com o kit e posterior comparação.

## **2.6. Determinação da Sensibilidade Analítica da Preparação**

Uma amostra de vírus padrão, apresentando DICT 10<sup>6,87</sup>/ml, foi diluída de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-5</sup> em uma amostra negativa para CPV-2, previamente tratada e seu DNA foi extraído utilizando ambas as técnicas para posterior quantificação por PCR em tempo real.

## **2.7. PCR**

O protocolo utilizado foi adaptado do sugerido por Decaro et al (2005a). A reação foi realizada em um volume final de 25µl contendo 12.5 µl de 2X GoTaq<sup>®</sup> Green Master Mix, 10 pmoles de cada primer (CPV-For: 5'-AAA CAG GAA TTA ACT ATA CTA ATA TAT TTA-3') e CPV-Rev: (5'-AAA TTT GAC CAT TTG GAT AAA CT-3'), 5,5 µl de água livre de nucleases e 5 ul da amostra de DNA. A amplificação foi realizada em termociclador automático (Eppendorf<sup>®</sup>). Numa etapa inicial, as amostras foram incubadas a 94° C por 5 minutos, para as desnaturações, seguida de uma seqüência de 34 ciclos repetidos, compostos de três temperaturas para cada ciclo: 94°C/30 segundos para desnaturação da fita de DNA, 55°C/2 minutos para a hibridização dos primers e 72°C/2 minutos para a extensão das fitas. Ao final, foi realizada uma incubação a 72°C/5 minutos para garantir a presença dos DNAs amplificados em fita dupla. O controle-negativo da reação consistiu de água ultrapura

estéril. Como controle-positivo, foi utilizado o DNA extraído de uma alíquota de lisado de célula CRFK infectada com o vírus padrão.

Os produtos obtidos na amplificação pela técnica de PCR foram analisados em gel de agarose a 1,5% (p/v), corado com brometo de etídeo (0,5µg/ml) e examinados comparativamente com marcadores de DNA de 100pb (Promega), com auxílio de transiluminador UV. Foram considerados positivos as amostras cujos DNAs, após a reação de PCR, resultaram em fragmentos de 93pb.

## 2.6. PCR em Tempo Real.

A reação foi desenvolvida com o uso do kit TaqMan<sup>®</sup> Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). A solução para uma amostra continha 10ul do reagente do kit, 600nM do primer CPV-For (5'-AAA CAG GAA TTA ACT ATA CTA ATA TAT TTA-3') e CPV-Rev (5'-AAA TTT GAC CAT TTG GAT AAA CT-3'), 200nM da sonda CPV-Pb (5- TGG TCC TTT AAC TGC ATT AAA TAA TGT ACC-3), previamente descritos por Decaro et al. (2005a), 4ul da amostra e água livre de nucleases totalizando 20ul. A amplificação foi realizada no aparelho 7300 Real Time PCR System - Applied Biosystems e as condições da reação foram 95°C por 10 minutos para ativação da *Taq* DNA polimerase e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos para desnaturação, 52°C por 30 segundos para anelamento dos primers e 60°C por 1 minuto para extensão da fita de DNA. O controle-negativo da reação consistiu de água ultrapura estéril. A sonda Taqman foi marcada com o fluoróforo 6 - carboxifluoresceína (FAM) na terminação 5' e com o quencher 6- carboxitetrametilrodamina (TAMRA) na terminação 3'.

O DNA de referência para o CPV-2 foi extraído de uma amostra de fezes encaminhada ao Laboratório de Diagnóstico Molecular do Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências/ UNESP campus Botucatu. Essa amostra foi diluída de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-10</sup> com PBS, extraída como descrito no item 2.4.3 e testada, em duplicata, como citado acima. Pela determinação do “baseline”, “threshold”, análise dos Ct (“threshold cycle”) produzidos por cada diluição e da curva padrão fornecida pelo programa SDS versão 1.2.3. (“Sequence Detection Systems” 1.2.3 - 7300 Real Time PCR System - Applied Biosystems), as seis diluições que apresentaram amplificação entre os ciclos 11 a 30 foram escolhidas para serem utilizadas na

quantificação relativa da carga viral do CPV-2. A menor diluição do DNA de referência recebeu o valor relativo igual a 1000 e as outras diluições foram determinadas 100, 10, 1, 0,1 e 0,01. A diluição correspondente ao quarto ponto da curva foi utilizada em todas as placas, para servir como referência na quantificação relativa.

A concentração de cada amostra foi fornecida diretamente pelo programa SDS 1.2.3, calculada em relação à curva padrão e o valor corrigido através do método  $2^{-\Delta CT}$  (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001), em relação à amostra de referência colocada em todas as placas analisadas. Foram consideradas na análise apenas as amostras com quantificação relativa maior ou igual a 0,1.

### **3. Resultados**

#### **3.1 Obtenção do Anti-soro**

O título de anticorpos no soro anti-CPV-2 foi de 32 768.

#### **3.1 Conjugado COA-anti-CPV-2**

Os melhores resultados, ou seja, menores valores de Ct foram obtidos com o conjugado preparado com 80ul de anti-soro e quando o preparo das amostras foi realizado com 20ul de COA anti-CPV-2.

#### **3.2 Identificação das Amostras Positivas**

Fragmentos de 93bp do DNA do CPV-2 foram identificados em todas as dez amostras provenientes de animais com sintomatologia sugestiva de parvovirose canina.

#### **3.3. PCR em Tempo Real**

##### **3.3.1 Curva Padrão**

A curva padrão do CPV-2 apresentou eficiência de 97,41% e o coeficiente de correlação (R) igual a 0,9974 (fig 1).

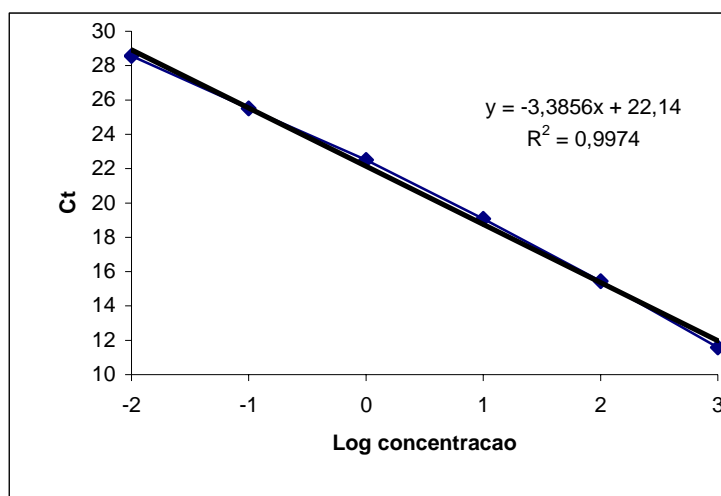


Figura 1. Representação gráfica da curva padrão da reação da PCR em tempo real para o parvovirus, com os pontos  $10^{-1}$  a  $10^{-6}$ .

### 3.3.2. Determinação da Sensibilidade da Preparação

O protocolo de extração com o COA permitiu a quantificação de, no mínimo,  $10^{1,87}$  DICT<sub>50</sub>. Já com a utilização do kit, esse limiar foi de  $10^{2,87}$  DICT<sub>50</sub>, como observado na figura 2 e no quadro 1.

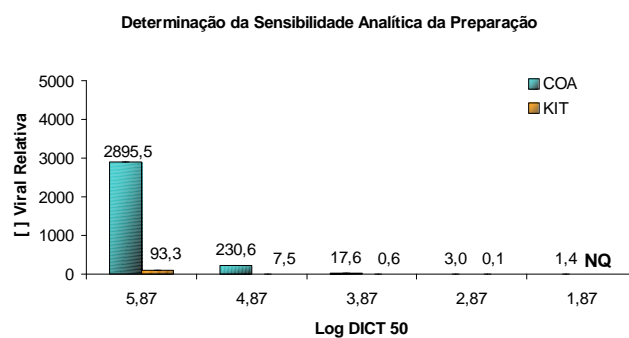


Figura 2: Representação gráfica da concentração relativa das diluições da amostra negativa tratada com o vírus padrão e extraídas com kit comercial e com o COA para determinação da sensibilidade analítica dos métodos; NQ = não quantificável.

Quadro 1: Concentração relativa das diluições da amostra negativa tratada com o vírus padrão e extraídas com kit comercial e com o COA para determinação da sensibilidade analítica dos métodos; NQ = não quantificável.

DICT <sub>50</sub>	COA	KIT
$10^{5,87}$	2895	93,307
$10^{4,87}$	230	7,458
$10^{3,87}$	17,638	0,590
$10^{2,87}$	2,969	0,115
$10^{1,87}$	1,358	NQ

### 3.3.3. Determinação da Eficiência da Preparação

Na figura 3 e quadro 2, observa-se o valor da quantificação relativo de cada uma das análises realizadas alterando-se o volume da reação e mantendo a quantidade de vírus constante na amostra.

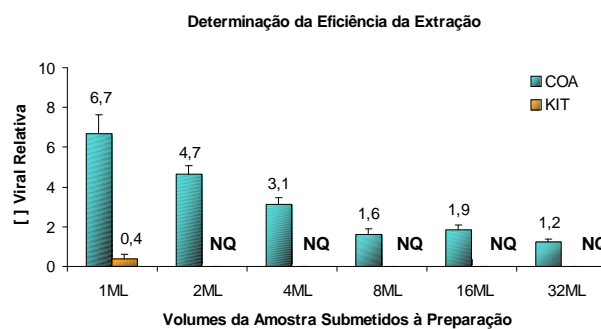


Figura 3: Representação Gráfica da concentração relativa das diluições da amostra extraídas com kit comercial e com o COA para determinação da eficiência da extração; NQ = não quantificável.



Quadro 2: Concentração relativa das diluições da amostra extraídas com kit comercial e com o COA para determinação da eficiência da extração, NQ = não quantificável.

<b>DILUIÇÃO</b>	<b>COA</b>	<b>KIT</b>
<b>1ml</b>	6,662	0,399
<b>2ml</b>	4,662	NQ
<b>4ml</b>	3,142	NQ
<b>8ml</b>	1,619	NQ
<b>16ml</b>	1,861	NQ
<b>32ml</b>	1,225	NQ

#### **3.3.4. Quantificação Viral Relativa das Amostras Clínicas**

Os valores de quantificação relativa de cada amostra e de cada método de extração estão demonstrados na figura abaixo..

A amostra negativa para CPV-2, preparada com o COA anti CPV-2 e a amostra positiva, preparada com o COA controle, não apresentaram sinais de amplificação.

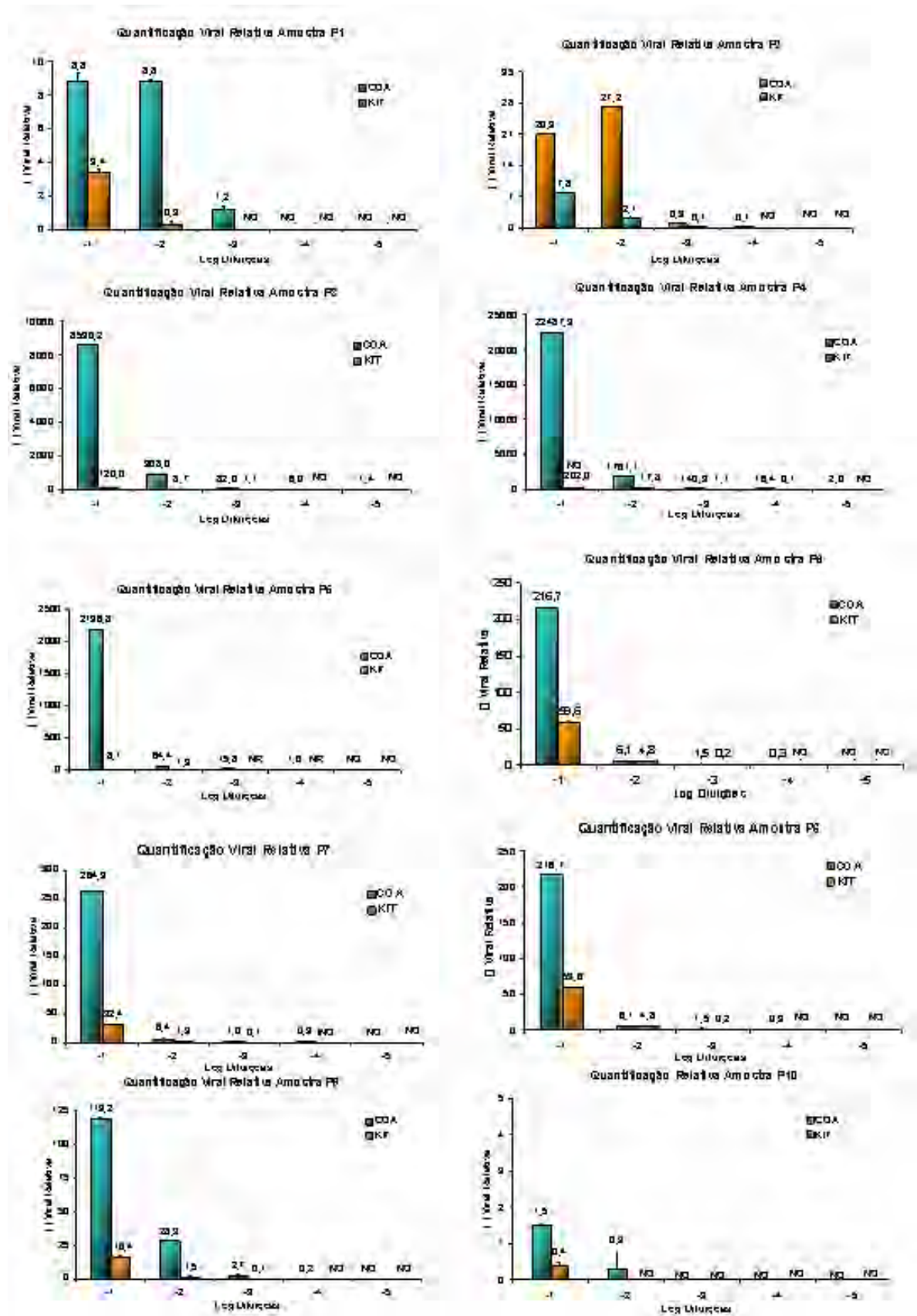


Fig. 4: Representação Gráfica da concentração relativa das amostras P1 a P10 e suas respectivas diluições, extraídas com kit comercial e com o COA.

Quadro 3: Concentração relativa das amostras P1 a P10 e suas respectivas diluições, extraídas com kit comercial e com o COA.

AMOSTRA	MÉTODO	DILUIÇÃO				
		$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$
P1	COA	8,784	8,838	1,172	0,151	NQ <sup>1</sup>
	KIT	3,353	0,295	NQ	NQ	NQ
P2	COA	20,902	27,158	0,861	NQ	NQ
	KIT	7,824	2,118	0,119	NQ	NQ
P3	COA	8590	908	81	5,977	1,362
	KIT	120	8,694	1,085	NQ	NQ
P4	COA	22487	1761	140	16,355	2,000
	KIT	201	17,826	1,063	0,130	NQ
P5	COA	2196	64,435	15,808	1,603	NQ
	KIT	8,122	1,317	NQ	NR <sup>2</sup>	NR
P6	COA	212	6,105	1,540	0,336	NQ
	KIT	59,589	4,795	0,244	NQ	NQ
P7	COA	264	6,359	1,042	0,918	NQ
	KIT	32,420	1,291	0,105	NQ	NQ
P8	COA	58,385	6,761	0,552	NQ	NQ
	KIT	3,555	0,931	0,275	NQ	NQ
P9	COA	119	28,297	2,727	0,213	NQ
	KIT	16,423	1,484	0,140	NQ	NQ
P10	COA	1,499	0,308	NQ	NQ	NQ
	KIT	0,394	NQ	NQ	NQ	NQ

1 = não quantificável

2 = não realizado

#### 4. Discussão

A PCR é uma técnica molecular que possui sensibilidade e especificidade elevadas. Entretanto, resultados falso-negativos constituem um problema em potencial quando a técnica é aplicada em amostras de fezes. Este fenômeno pode ser causado pela pequena taxa de recuperação na preparação da amostra e/ou pela presença de vários fatores inibidores da PCR nas fezes (JACOBSON et al., 2003; WILSON, 1997; LANTZ et al., 1997), como bactérias e diferentes subprodutos da digestão, como sais biliares e complexos de polissacarídeos de origem vegetal (MONTEIRO et al., 1997; AL-SOUD e RÅDSTRÖM, 1998; JACOBSON et al., 2003).

Pelo fato de amostras como fezes serem extremamente heterogêneas quanto a presença de agentes que poderiam confundir o resultado da PCR, a possibilidade de

selecionar previamente o CPV, através dos anticorpos, traria grande contribuição, principalmente relacionado à especificidade analítica da técnica.

A utilização de soro policlonal foi importante pelo fato do CPV apresentar alta variabilidade genética (MARTELLA et al., 2006). Assim, mesmo que ocorra diferenças nos epítomos neutralizantes, os anticorpos presentes no soro policlonal podem se ligar e capturar o CPV através de outros epítomos na superfície viral.

A dificuldade de eliminar os inibidores de amostras de fezes já foi exaustivamente relatada. Geralmente, há a necessidade da aplicação de procedimentos complexos, o que dificulta seu uso na rotina diagnóstica (LANTZ et al., 1997; MONTEIRO et al., 2001; AL-SOUD et al., 1998). Neste estudo optou-se pela realização de procedimentos rápidos de tratamento da amostra, como a diluição e o tratamento com clorofórmio, para posterior preparação, através do uso do COA. Para a avaliação desta metodologia, utilizou-se a PCR em tempo real que amplifica uma seqüência-alvo específica em uma amostra através do monitoramento da emissão de fluorescência (VASALEK e REPA, 2005). Em um estudo realizado por Decaro et al.(2005a), a técnica demonstrou ser mais sensível que o HA e a PCR convencional, baseada na detecção por gel de agarose corado com brometo de etídeo, permitindo a detecção de  $10^2$  cópias do DNA de CPV-2. Conforme pode ser observado no item 3.3.1, a curva padrão apresentou eficiência de 97,41%. Por se tratar de uma reação com uma boa eficiência, foi possível fazer uso de apenas uma amostra padrão em cada placa e assim realizar a correção da concentração através do método  $2^{-\Delta CT}$  (LIVAK e SCHIMITTGEN, 2001).

A PCR em tempo real foi utilizada neste trabalho para que os resultados pudessem ser comparados quanto a sua eficiência. Entretanto, em todas as amostras foi possível quantificar o DNA do CPV. Também se obteve resultados positivos na PCR tradicional analisada em gel de agarose (dado não demonstrado).

No presente trabalho não foi realizado a quantificação absoluta, mas foi possível detectar o mínimo de  $10^{1,87}$  DICT<sub>50</sub> pela metodologia do COA. Mesmo se tratando de uma quantidade razoável de vírus, o kit comercial não foi capaz de extrair o DNA viral em quantidades quantificáveis. Deve-se ressaltar que a suspensão viral foi diluída em uma amostra de fezes negativa para parvovirus, tratada e diluída 1:10, portanto, em todas as diluições, manteve-se o mesmo padrão de inibidores. Broemelling et al. (2008) citam que muitos contaminantes podem ser co-extraídos com o DNA-alvo ou ainda

saturar as matrizes ou membranas, reduzindo ou impedindo a ligação do alvo, principalmente quando este se encontra em pequenas quantidades.

O método de preparo proposto demonstrou ser eficiente, uma vez que foi capaz de capturar partículas virais mesmo quando estas se encontravam extremamente dispersas, como no caso da amostra diluída em 31ml de PBS, esta apresentou concentração relativa de 1,225 enquanto que pelo kit, só foi possível quantificar a amostra “pura”. A capacidade de capturar partículas também pode ser comprovada observando-se o padrão das diluições. Como a quantificação da amostra pura foi de 6,662, esperava-se para as próximas diluições, valores de 3,33, 1,66, 0,8, 0,4 e 0,2 respectivamente. Todavia, na última diluição, por exemplo, a quantificação foi de 1,225, ou seja, seis vezes maior que esperado. Durante a realização deste procedimento, desejou-se estender a diluição a níveis não quantificáveis, infelizmente isso não foi possível devido às dificuldades de centrifugação de volumes maiores. Para a última diluição, utilizou-se um tubo de centrifuga de 50ml e mesmo assim, acredita-se que os resultados da quantificação não foram maiores devido a impossibilidade de se aplicar uma força g maior em toda a extensão do tubo.

Ao se comparar a concentração viral obtida em ambas as técnicas utilizadas, observa-se que o COA foi superior em todas as amostras, principalmente na 3, 4, 5 e 8. O preparo das amostras com o COA resultou em uma quantificação em média 40 vezes maior que na utilização do kit. Apesar de, para ambos os procedimentos, ser realizado um tratamento inicial das amostras, alguns inibidores provavelmente estavam presentes e como já citado por Broemelling et al. (2008), podem ser co-extraídos e ainda impedir ou dificultar a extração o DNA por matrizes ou colunas. Outro problema é o volume empregado na extração com o kit, que é 10 vezes menor que o utilizado com o COA.

Dentre as amostras utilizadas, houve uma grande variação na concentração viral, independentemente da técnica utilizada, isso provavelmente ocorreu devido ao intervalo de tempo entre o início dos sinais clínicos da parvovirose, a entrada do animal no hospital e a coleta da amostra, pois a eliminação do CPV nas fezes é maior nos primeiros dias pós – infecção, decaindo rapidamente entre o décimo e décimo primeiro dia. Além disso, em estágios mais tardios da enfermidade, os anticorpos presentes no lúmen intestinal podem ter seqüestrado a maioria das partículas virais (DECARO et al., 2005a; ELIA et al., 2007).

As amostras 1 e 2 apresentaram padrões diferentes das demais, nas duas primeiras diluições. A amostra 1 apresentou resultados praticamente iguais para ambas

as diluições, enquanto que a amostra 2 apresentou uma quantificação maior na segunda diluição. Tais padrões podem ser resultado da presença de anticorpos contra outros agentes entéricos, uma vez que o soro do cobaio não foi submetido a nenhum procedimento de purificação. Estes anticorpos, ao se ligarem a outros microorganismos, poderiam impedir ou dificultar a ligação do vírus ao anticorpo, por se tratar de uma partícula menor. Em contrapartida, esperava-se que, na próxima diluição, valores de quantificação fossem maiores que o obtido, uma vez que outros microorganismos estariam presentes em menores quantidades na amostra, demonstrando assim que o conjugado também possui falhas na captura das partículas virais.

A amostra 5 não apresentou amplificação nas diluições  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$  extraídas com o kit, isso pode ter ocorrido devido à presença de inibidores, ou por uma quantidade muito pequena de vírus na amostra, já que na terceira diluição a concentração foi considerada não quantificável. Entratanto, não se pode descartar falhas nas colunas utilizadas ou ainda interferências na PCR em tempo real.

Concluindo, a técnica de preparo de DNA utilizando o COA é eficiente e apresenta reprodutibilidade, sendo também capaz, em conjunto com a Proteinase K e o tratamento prévio das amostras, de eliminar os inibidores da PCR de maneira desejável. O conjugado, mesmo sendo preparado com anticorpos policlonais, foi capaz de concentrar as partículas virais presentes na amostra e, a associação da especificidade dos anticorpos com a especificidade dos primers utilizados na PCR em tempo real, geraram uma maior confiabilidade nos resultados.

## 5. Referências

Al-Soud, W.A.; Rådström, P., 1998. Capacity of nine thermostable DNA polymerases to mediate DNA amplification in the presence of PCR-inhibiting simples. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (10), 3748-3753.

Bootland, L. M.; Leong, C.J., 1992. Staphylococcal coagglutination, a rapid method of identifying infectious hematopoietic necrosis virus. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 (1), 6-13.

Broemeling, D. J.; Pel, J.; Gunn, D. C.; Mai, L. Thompson, J. D.; Poon, H.; Marziali, A., 2008. An instrument for automated purification of nucleic acids from contaminated forensic samples. *JALA Charlottesville Va.* 13 (1), 40-48.

Cavalli, A., Bozzo, G., Decaro, N., Tinelli, A., Aliberti, A., Buonavoglia, D., 2001. Characterization of a canine parvovirus strain isolated from an adult dog. *New Microbiol.* 24, 239–242.

Decaro, N., Elia, G., Martella, V., Desario, C., Campolo, M., Di Trani, L., Tarsitano, E., Tempesta, M., Buonavoglia, C., 2005a. A real time PCR assay for rapid detection and quantitation of canine parvovirus type 2 in the feces of dogs. *Vet. Microbiol.* 105, 19-28.

Del Río, M. L.; Gutierrez, C. B.; Ferri, E. F. R., 2003. Value of indirect hemagglutination and coagglutination tests for serotyping *Haemophilus parasuis*. *J. Clin. Microbiol.* 41 (2), 880-882.

Desario, C., Decaro, N., Campolo, M., Cavalli, A., Cirone, F., Elia, G., Martella, V., Lorusso, E., Camero, M., Buonavoglia, C., 2005. Canine parvovirus infection: Which diagnostic test for virus? *J. Virol. Methods.* 126, 179-185.

Elia, G.; Cavalli, A.; Desario, C.; Lorusso, E.; Lucente, M. S.; Decaro, N.; Martella, V.; Buonavoglia, C., 2007. Detection of infectious canine parvovirus type 2 by mRNA real time RT-PCR. *J. Virol. Methods.* 146, 202-208.

Esfandiari, J. Klingeborn, B., 2000. A comparative study of a new rapid and one-step test for the detection of parvovirus in faeces from dogs, cats and mink. *J. Vet. Med. B.* 47, 145–153.

Flekna, G.; Schneeweiss, W.; Smulders, F.J.M.; Wagner, M.; Hein, I., 2007. Real-time PCR method with statistical analysis to compare the potential of DNA isolation methods to remove PCR inhibitors from samples for diagnostic PCR. *Mol. Cell Probes.* 21, 282-287.

Goding, J.W., 1978. Use of staphylococcal protein A as an immunological reagent. *J. Immun. Methods.* 20, 241-253.

Jacobson, M.; Englund, S.; Ballagi-Pordány., 2003. The use of a mimic to detect polymerase chain reaction-inhibitory factors in feces examined for the presence of *Lawsonia intracellularis*. *J. Vet. Diag. Invest.* 15, 268-273.

Kronval, G., 1973. A rapid slide-agglutination method for typing pneumococci by means of specific antibody adsorbed to protein A containing staphylococci. *J. Med. Microbiol.* 6, 187- 190.

Kronvall, G.; Seal, U.S.; Finstad, J.; Williams, R.C., 1970. Phylogenetic insight into evolution evolution of mammalian Fc fragment of  $\gamma$ G globulin using staphylococcal protein A. *J. Immun.* 104 (1), 140-146.

Lantz, P.G.; Matsson, M.; Wadström, T.; Rådström, P., 1997. Removal of PCR inhibitors from human faecal samples through the use of an aqueous two-phase system for sample preparation prior to PCR. *J. Virol. Methods.* 28, 159-167.

Livak, K. J.; Schmittgen, T. D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods.* 25, 402-408.

Martella, V.; Decaro, N.; Buonavoglia, C., 2006. Evolution of CPV-2 and implicance for antigenic/genetic characterization. *Virus Genes.* 33, 11-13.

Montassier, H.J.; Araújo, J.P.; Pinto, A.A., 1994. Rapid coagglutination test for the detection and typing of foot and mouth disease virus. *J. Virol. Methods.* 50, 29-42.

Monteiro, L.; Bonnemaïson, D.; Vekris, A.; Petry, K.G.; Bonnet, J.; Vidal, R.; Cabrita, J.; Me'graud, F., 1997. Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: *Helicobacter pylori* model. *J. Clin. Microbiol.* 35 (4), 995-998.

Parrish, C.R.; Burtonboy, G.; Carmichael, C.E., 1988. Characterization of nonhemagglutinating mutant of canine parvovirus. *Virol.* 163 (1), 230-232.



- Pereira, C.A.D.; Monezi, T.A.; Mehnert, D.U.; D'angelo, M.; Durigon, E.L., 2000. Molecular characterization of canine parvovirus in Brazil by polymerase chain reaction assay. *Vet. Microbiol.* 75, 127-133.
- Peret, T.C.T.; Durigon, E.L.; Candeias, J.M.G.; Stewien, K.E.; Candeias, J.A.N., 1995. A combined staphylococcal coagglutination assay for rapid identification of rotavirus and adenovirus (COARA). *J. Virol. Methods.* 52, 265-272.
- Peshev, R.; Alexandrov, M.; Ivanov, Y.; Gogov, Y., 1996. Demonstration of rabbit haemorrhagic disease virus antigen by *Staphylococcus* protein A coagglutination test. *J. Virol. Methods.* 57, 15-18.
- Quinn, F.D. Sample preparation for nucleic acid amplification. In: Lee, H.; Morse, S. Olsvik, Ø. *Nucleic acid amplification technologies.* Massachusetts: Eaton, 1997. chap.4, 49-60.
- Singh, B.R.; Yadav, R.C.; Singh S.P.; Sharma, V.D., 1998. Coagglutination test: a simple and rapid immunodiagnostic test for parvovirus infection in dogs. *Indian J. Exp. Biol.* 36, 622-624.
- Smith, P.K.; Krohn, R.I.; Hermanson, G.T.; Mallia, A.K.; Gartner, F.H.; Provenzano, M.D.; Fujimoto, E.K.; Goeke, N.M.; Olson, B.J.; Klenk, D.C., 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150 (1), 76-85.
- Strottmann, D. M.; Scortegagna, G.; Kreutz, L. C.; Barcellos, L. J. G.; Frandoloso, R.; Anziliero, D., 2008. Diagnóstico e estudo sorológico da infecção pelo parvovirus canino em cães de Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciê. Rur.* 38 (2), 400-405.
- Teramoto, Y.A.; Mildbrand, M.M.; Jonathan, C.; Collins, J.K.; Winston, S., 1984. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay, DNA hybridization, hemagglutination and electron microscopy for detection of canine parvovirus infections. *J. Clin. Microbiol.* 20 (3), 373-378.

Uwatoko, K., Sunairi, M., Nakajima, M., Yamaura, K., 1995. Rapid method utilizing the polymerase chain reaction for detection of canine parvovirus in feces of diarrheic dogs. *Vet. Microbiol.* 43, 315–323.

Valasek, M.A.; Repa, J.J., 2005. The power of real-time PCR. *Adv. Physiol. Educ.*, 29, 151-159.

Varshney, B. C.; Ponnanna, N. M.; Sarkar, P. A.; Rehman, P.; Shah, H., 2007. Development of a monoclonal antibody-based co-agglutination test to detect enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from diarrheic neonatal calves. *J. Vet. Sci.* 8 (1), 57-64.

Wilson, I.G., 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (10), 3741-375.

---

## **CAPÍTULO 3**

Trabalho a ser enviado para a revista “Journal of Virological Methods”.

**PADRONIZAÇÃO DA COAGLUTINAÇÃO NA PREPARAÇÃO DE  
ÁCIDOS NUCLÉICOS DO VÍRUS DA CINOMOSE PARA  
DIAGNÓSTICO MOLECULAR**

Marcela Cristina Mendes Ribeiro<sup>a</sup>, João Pessoa Araújo Jr.<sup>a</sup>.

<sup>a</sup> Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, UNESP/Campus Botucatu, Distrito de Rubião Jr. s/n., cep. 18618-000, Botucatu, São Paulo, Brasil.

# PADRONIZAÇÃO DA COAGLUTINAÇÃO NA PREPARAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS DO VÍRUS DA CINOMOSE PARA DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Marcela Cristina Mendes Ribeiro<sup>a</sup>, João Pessoa Araújo Jr.<sup>a, \*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, UNESP/Campus Botucatu, Distrito de Rubião Jr. s/n., cep. 18618-000, Botucatu, São Paulo, Brasil.

## Resumo

A cinomose é uma enfermidade infecto-contagiosa de grande importância para a clínica de pequenos animais onde a PCR vem sendo aplicada com ótimos resultados no diagnóstico. No entanto, para o sucesso da técnica, é necessário que o ácido nucléico esteja o mais puro possível e livre de inibidores das polimerases, desejando-se um método de extração simples e rápido. O teste de coaglutinação utilizando o *Staphylococcus aureus* (COA) é baseado na propriedade da proteína A de se ligar especificamente à porção Fc da imunoglobulina G de alguns mamíferos e algumas subclasses de IgG de camundongos. Assim, neste trabalho utilizou-se a coaglutinação para obtenção de RNA livre de inibidores, com capacidade de concentração de partículas virais dispersas nas amostras biológicas e de forma simples e rápida. Para tanto, 17 amostras de urina positivas para o vírus da cinomose foram submetidas à extração de ácidos nucléicos utilizando o COA e o kit comercial RNA Spin Mini (GE Healthcare) para posteriormente serem analisadas pela RT-PCR e nested-PCR. A metodologia desenvolvida foi eficiente na extração deste tipo de amostra.

**Palavras-chave:** *Staphylococcus aureus*, coaglutinação, vírus da cinomose, diagnóstico molecular.

---

\* Autor para correspondência: (14) 3811-6240 ou (14) 3811-6058  
e-mail: [jpessoa@ibb.unesp.br](mailto:jpessoa@ibb.unesp.br)  
Apoio: FAPESP

## 1.Introdução

A cinomose canina é uma enfermidade viral sistêmica que frequentemente possui altos índices de letalidade em todo o mundo (BLIXENKRONE-MOLLER et al., 1991), sendo apenas menores que o da raiva canina (APPEL & SUMMERS, 1995).

A possibilidade da realização do diagnóstico laboratorial *ante-mortem* é de fundamental importância para os clínicos. A confirmação ou exclusão do CDV como provável etiologia possibilita a realização do prognóstico de forma mais objetiva e de condutas terapêuticas mais adequadas, além de proporcionar a adoção de medidas de controle e profilaxia diferenciadas e específicas, mais apropriadas para cada caso (NEGRÃO et al., 2007).

Para realização do diagnóstico laboratorial *ante-mortem* da enfermidade, vários métodos já foram desenvolvidos, destacando-se a pesquisa de corpúsculos de inclusão, presentes em neutrófilos circulantes, a imunofluorescência direta, imuno-histoquímica e o isolamento do CDV em cultivo celular. Porém, todos os métodos apresentam desvantagens, como baixa sensibilidade e ou especificidade, etapas laboriosas de processamento do material biológico e tempo necessário para conclusão do resultado (FRISK et al., 1999).

A transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) é uma técnica molecular utilizada com o objetivo de identificação precoce do CDV em cães com sinais clínicos da infecção (FRISK et al., 1999; NEGRÃO et al., 2007). Trata-se de uma técnica muito sensível, porém sua sensibilidade varia com o tipo de amostra empregada, método de extração do ácido nucléico e com a escolha dos primers (SAITO et al., 2006).

Diversos protocolos já foram descritos para o preparo de amostras visando a amplificação de ácidos nucléicos, no entanto, devido a presença de impurezas nesses materiais, a maioria dos métodos de preparo disponíveis focam na obtenção de ácidos nucléicos o mais purificado possível (QUINN, 1997).

Fatores inibitórios da amplificação de ácidos nucléicos pela PCR estão presentes na amostra, com o DNA-alvo, de diversas maneiras. Geralmente, os inibidores atuam em um ou mais dos três pontos essenciais da reação, através da interferência na lise celular, necessária para a liberação do ácido nucléico, degradação ou captura do alvo ou pela inibição da atividade das polimerases (WILSON, 1997). Na PCR em tempo real,

tais substâncias podem interferir na geração e/ou na detecção do sinal fluorescente, influenciando na análise dos resultados (FLEKNA et al., 2007).

Diferentes técnicas são empregadas na tentativa de reduzir a ação dos inibidores da PCR e/ou separá-los do ácido nucléico alvo. Sistemas aquosos de duas fases, fervura, centrifugação em gradiente de densidade, diluição da amostra, filtração, utilização de meios de enriquecimento e técnicas imunológicas, já foram utilizadas para facilitar a PCR (AL-SOUD & RÅDSTRÖM, 1998).

O teste de coaglutinação utilizando o *Staphylococcus aureus* (COA) é baseado na propriedade da proteína A, presente em grande quantidade na cepa Cowan I do *S. aureus*, de se ligar especificamente à porção Fc da imunoglobulina G de alguns mamíferos (KRONVALL et al., 1970) incluindo o coelho, cobaio e algumas subclasses de IgG de camundongos. Assim sendo, quando anticorpos contra algum agente viral são adicionados, em condições ótimas de pH e temperatura, à suspensão de *S. aureus* previamente padronizada, forma-se um conjugado deixando a porção Fab da imunoglobulina livre para reagir com o antígeno (KRONVALL, 1973). Dessa forma, quando uma suspensão contendo o agente viral é colocada para reagir com esse conjugado, forma-se um complexo que pode ser facilmente separado por centrifugação.

Esta propriedade da proteína A já foi explorada para o diagnóstico de infecções bacterianas (VARSHNEY. et al, 2007; DEL RIO et al., 2003) e virais (PERET et al., 1995; MONTASSIER et al., 1994; PESHEV et al, 1996; BOOTLAND e LEONG, 1992; SINGH et al., 1998) e também para o diagnóstico de diversas enterotoxinas bacterianas. Nos trabalhos acima descritos, o teste mostrou-se específico, rápido, barato e com baixo limiar de detecção.

No presente trabalho, objetiva-se empregar a coaglutinação como ferramenta para o preparo de amostras para serem utilizadas diretamente na amplificação do RNA pela RT-PCR.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1. Vírus Padrão e Purificação Viral**

O CDV padrão foi obtido através do isolamento viral de amostras de urina provenientes de animais com histórico e sinais clínicos compatíveis com a cinomose<sup>3</sup>. As amostras foram extraídas com o kit RNA Spin Mini (GE Healthcare) e a Nested PCR foi realizada conforme o item 2.6, além disso, realizou-se a genotipagem por semi-nested multiplex (MARTELLA et al, 2007).

O material foi inoculado em monocamada de células MDCK apresentando 80% de confluência, em meio MEM acrescido de 1% de soro fetal bovino. O material foi armazenado a temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso.

A suspensão viral foi purificada em gradiente de densidade contínua em sacarose de 20% a 60% (BERNARD et al., 1982). O material foi alíquotado e de cada fração foi realizada leitura em comprimento de onda 260 nm e 280 nm. As frações correspondentes à densidade de  $1,18\text{g}/\text{cm}^3$  a  $1,2\text{g}/\text{cm}^3$  foram separadas e armazenadas a temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$  para posterior quantificação protéica, realizada através do método de BCA, segundo Smith et al.(1985).

### **2.2. Produção do Conjugado Coaglutinante**

#### **2.2.1. Obtenção do Anti-soro**

Anti-soro contra o CDV foi obtido através da inoculação, por via subcutânea, de uma suspensão de vírus purificado contendo  $50\mu\text{g}/\text{ml}$  de proteína, em cobaio. As preparações dos antígenos foram emulsificadas com adjuvante completo de Freund (v/v), 500ul da preparação foram inoculados e o procedimento repetido após 20 dias. Decorridos 30 dias da primeira inoculação, os animais foram sangrados e os soros inativados a  $56^{\circ}\text{C}$  por trinta minutos, distribuídos em frações de 2ml e armazenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso.

---

<sup>3</sup> Gentilmente cedidas pelo Ambulatório de Enfermidades Infecciosas dos Animais do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Campus de Botucatu.



### **2.2.2. Suspensão de *Staphylococcus aureus***

Uma alíquota de *S. aureus* cepa Cowan I foi semeada em meio ágar sangue, para verificação de possíveis contaminantes e, após 24 horas a 37°C, cerca de 4 colônias foram repicadas em caldo BHI e incubadas sob as mesmas condições anteriores. Meio mililitro desta suspensão foi adicionado a Erhlenmeyers contendo Muller-Hinton acrescido de 0,5% de extrato de levedura e mantidos por 18 horas a 37°C sob agitação. A bactéria então foi centrifugada a 5000 X g por 10 minutos a 4°C e o pellet foi lavado três vezes em PBS pH 7,4 (0.14 M NaCl, 0.01 M PO<sub>4</sub>), sob as mesmas condições. A suspensão foi inativada com 0,5% de formaldeído em PBS a 4°C por 18 horas. Novamente o material foi lavado por 3 vezes e então a bactéria foi aquecida a 80°C por 20 minutos e o procedimento de lavagem repetido. Por fim, o pellet foi ressuscitado em PBS contendo 0,5% de tween 20 e 0,05% de azida sódica. A concentração da suspensão bacteriana diluída vinte vezes foi monitorada por espectrofotometria a 525nm, onde a absorvância de 0,69 corresponde a aproximadamente 2,3 x 10<sup>10</sup> cels/ml (Goding, 1978). A suspensão foi armazenada a 4°C por, no máximo, 3 meses.

### **2.2.3 Preparo do Conjugado Coaglutinante (COA)**

O COA anti-CDV foi preparado através da mistura de 2ml da suspensão padronizada de *S. aureus*, previamente lavada com PBS, com 20µl, 30µl, 40µl ou 80 µ de anti-soro. Após trinta minutos de incubação a temperatura ambiente, a mistura foi centrifugada por 4000 x g por 10 minutos, lavada três vezes com PBS e ressuscitada em PBS contendo 0,5% de tween 20 e 0,05% de azida sódica (MONTASSIER et al.,1994). Um COA controle foi preparado com soro de cobaio normal inativado.

### **2.3 Obtenção das Amostras Biológicas**

Foram selecionadas 17 amostras de urina enviadas ao Laboratório de Diagnóstico Molecular do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Campus de Botucatu que apresentaram resultado positivo na PCR tradicional (itens 2.4.2, 2.5 e 2.6).

As amostras foram identificadas com números (1 a 17) e armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso.

## **2.4 Preparação do Ácido Nucléico**

### **2.4.1. Método de Preparação Utilizando COA-anti-CDV.**

Para a preparação do RNA, a 1ml de cada amostra de urina, foi adicionado 20  $\mu\text{l}$ , 30  $\mu\text{l}$ , 40  $\mu\text{l}$  ou 50 $\mu\text{l}$  do conjugado coaglutinante anti-CDV. Estas foram incubadas por trinta minutos sob agitação constante e então centrifugadas por 12000 X g por 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . O pellet formado foi lavado com PBS por duas vezes e, por último, foi ressuspendido em 50  $\mu\text{l}$  tampão para proteinase K (50mM TRIS-HCl pH 8,0, 1mM  $\text{CaCl}_2$ , 3mM DTT). Em seguida, foi adicionada à suspensão final 10 $\mu\text{l}$  de Proteinase K a 20ng/ml, incubado por 2 horas a  $56^{\circ}\text{C}$  e então aquecido a  $75^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos, para inativação da proteinase K. As amostras foram centrifugadas e o sobrenadante utilizado para a obtenção do cDNA.

### **2.4.2. Método de Extração Utilizando Kits Comerciais.**

A extração de RNA das amostras foi realizada com o kit RNA Spin Mini (GE Healthcare), no mesmo dia que a extração utilizando o COA.

## **2.5. Obtenção do cDNA**

Para obtenção do cDNA foi utilizada a enzima Improm RT II (Promega), conforme protocolo recomendado pelo fabricante. Como iniciador da reação de transcrição reversa foi utilizado o “Random Primer” (hexâmeros ao acaso), na concentração de 250 ng por reação de 20  $\mu\text{l}$ .

## **2.6 Reação de Nested – PCR**

Quatro primers foram utilizados: CDV1 (5'-ACA GGA TTG CTG AGG ACC TAT-3') e CDV2 (5'-CAA GAT AAC CAT GTA CGG TGC-3'), descritos por Frisk et al. (1999) para a reação de PCR; CDV-For (5'-AGC TAG TTT CAT CTT AAC TAT

CAA ATT-3') e CDV-Rev (5'-TTA ACT CTC CAG AAA ACT CAT GC-3') descritos por Elia et al. (2006), para a reação de nested-PCR (fig 1).

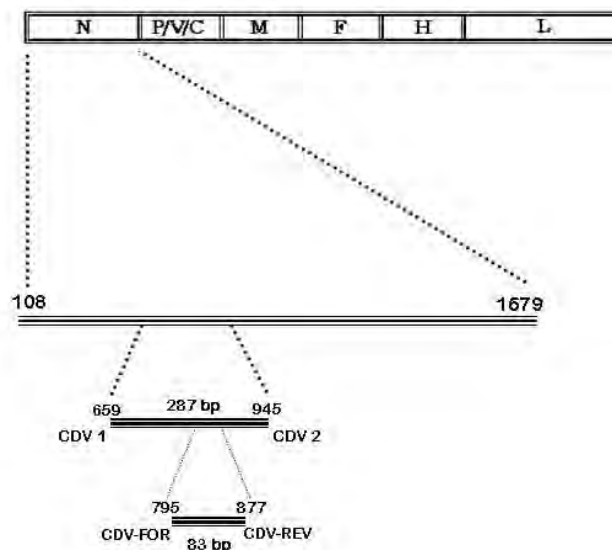


Fig 1: Esquema do genoma do CDV e do gene N com a localização dos primers utilizados para a PCR e nested-PCR.

Para a RT-PCR, utilizou-se 12,5 µl de GoTaq<sup>®</sup> Green Master Mix (Promega), 10 pmol de cada um dos primers CDV 1 e CDV 2, 5,5 µl de água livre de nucleases e 5µl do cDNA obtido. Numa etapa inicial, as amostras foram incubadas a 94° C por 1 min, para as desnaturações, seguida de uma seqüência de 40 ciclos repetidos, compostos de três temperaturas para cada ciclo: 94° C/1min para desnaturação da fita de DNA, 59° C/1min para a hibridização dos primers e 72° C/1min para a extensão das fitas. Ao final, foi realizada uma incubação a 72° C/7 min para garantir a presença dos DNAs amplificados em fita dupla.

Para a Nested-PCR utilizou-se 12,5 µl de GoTaq<sup>®</sup> Green Master Mix (Promega), 10 pmol de cada um dos primers CDV-For e CDV-Rev, 9,5 µl de água livre de nucleases e 1µl do produto da PCR. As amostras foram incubadas a 95° C por 1 min, seguida de uma seqüência de 40 ciclos repetidos, compostos de três temperaturas para cada ciclo: 95° C/30segundos, 48° C/30 segundos, 72° C/30 segundos e 72° C/5 min. O

controle-negativo da reação constitui de água ultrapura estéril e como controle-positivo utilizou-se o cDNA de uma amostra de urina utilizada para o isolamento viral.

Os produtos obtidos na amplificação pela técnica de RT-PCR e Nested-PCR foram analisados em gel de agarose a 1,5% (p/v), corado com brometo de etídio (0,5µg/ml) e examinados comparativamente com marcadores de DNA de 50 pb (Promega), com auxílio de transiluminador UV. Foram considerados positivas as amostras que, após realização da técnica de Nested-PCR, resultaram em amplicons de 287 pb na PCR e/ou 83 pb na nested-PCR

### **3. Resultados**

#### **3.1. Vírus Padrão**

Fragmentos de 83 bp de DNA, correspondente a nested-PCR, foram identificados, tanto nas amostras de urina utilizadas no isolamento, quanto nas amostras de lisado de células MDCK infectadas.

O vírus isolado foi identificado como pertencente ao genótipo Europa.

#### **3.2 Conjugado COA anti-CDV**

Os melhores resultados foram obtidos com o conjugado preparado com 80ul de anti-soro e quando o preparo das amostras foi realizado com 50ul de COA anti-CDV.

#### **3.3 Preparo das Amostras com o COA-Anti-CDV e com o Kit Comercial e PCR**

Todas as amostras foram positivas pois apresentaram “amplicons” de 287 na PCR e/ou de 83bp pelas duas metodologias de preparo de RNA utilizadas. As amostras negativas não apresentaram amplificação. Não houve amplificação na amostra positiva preparada com o COA controle (preparado com soro normal de cobaio). Na figura 2 encontra-se demonstrado o resultado das amostras 2, 4 e 6 que refletem todas as possibilidades encontradas nos testes. As amostras 2, 3, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 e 16 foram negativas na PCR e positivas na nested-PCR utilizando o COA. Com o kit isso ocorreu com as amostras 4, 12, 13, 14 e 17. O restante das amostras obteve resultados

positivos tanto na PCR quanto na nested-PCR. Bandas espúrias foram verificadas na nested-PCR principalmente quando foi utilizado o kit para extração do RNA.

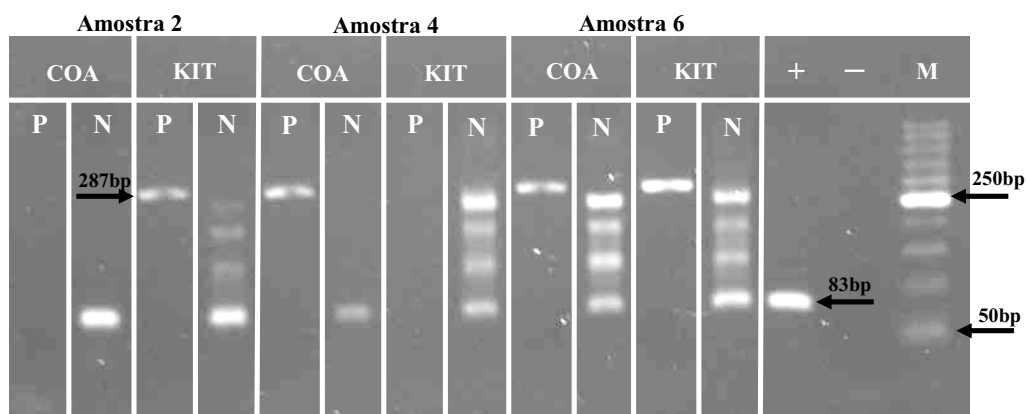


Fig 2: Eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídeo dos produtos da amplificação obtidos pela RT-PCR e pela nested-PCR das amostras 2, 4 e 6. P = PCR; N = Nested-PCR; M = Marcador molecular (50bp).

#### 4. Discussão

A transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) é um método molecular de diagnóstico que, se adequadamente padronizado, apresenta alta sensibilidade e especificidade para o diagnóstico da cinomose. (NEGRÃO et al., 2007) Entretanto, na dependência do material biológico a ser empregado e do método de extração utilizado a RT-PCR pode apresentar resultados falso-negativos. (FRISK et al., 1999; GEBARA et al., 2004; NEGRÃO et al., 2007; AMUDE et al., 2007). Há diversos inibidores em potencial nas amostras de urina, muitos ainda não foram identificados, mas sabe-se que, cristais, o pH da urina, a presença de uréia, de algumas proteínas e de sangue já demonstraram ter atuação como inibidores (TOYE et al., 1998; BRINKMAN et al., 2004). Pelo fato de amostras de urina serem extremamente heterogêneas quanto a presença de cristais ou contaminantes que poderiam confundir o resultado da PCR, a possibilidade de selecionar previamente o CDV, através dos anticorpos, traria grande contribuição, principalmente relacionado à especificidade analítica da técnica.

Dez amostras foram negativas na PCR e positivas na nested-PCR utilizando o COA. Com o kit isso ocorreu com 5 amostras. Entretanto em apenas 2 amostras esse

resultado foi observado para ambas as técnicas de preparo do RNA. Assim, em 3 amostras o COA demonstrou ter mais sensibilidade analítica e em 8 amostras isso ocorreu com o kit. Entretanto, pela necessidade de realizar sempre o nested-PCR para o caso da cinomose, como observado por (KIM et al., 2001; RZEŻUTKA e MIZAK, 2002; JÓŻWIK e FRYMUS, 2005), essa menor sensibilidade analítica do COA não atrapalharia o resultado final do diagnóstico, pois todas as amostras foram positivas na nested-PCR. Ademais, bandas espúrias foram mais freqüentes quando do uso do kit o que pode comprometer a especificidade analítica do teste. A utilização de soro policlonal foi importante pelo fato do CDV apresentar alta variabilidade genética. (MARTELLA et al., 2007). Assim, mesmo que ocorram diferenças nos epítomos, os anticorpos presentes no soro policlonal podem se ligar e capturar o CPV através de outros epítomos na superfície viral.

Concluindo, observou-se que a técnica de preparação utilizando o COA anti-CDV pode ser utilizada como auxílio a ferramenta diagnóstica molecular, principalmente pelo fato de associar a especificidade dos anticorpos com a especificidade dos primers aliado a uma relação custo-benefício bastante favorável para o COA.

## **5. Referência Bibliográfica**

Al-Soud, W.A.; Rådström, P., 1998. Capacity of nine thermostable DNA polymerases to mediate DNA amplification in the presence of PCR-inhibiting simples. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (10), 3748-3753.

Amude, A.M.; Carvalho, G.A.; Alfieri, A.A.; Alfieri, A.F., 2007. Vírus isolation and molecular characterization of canine distemper virus by RT-PCR from a mature dog with multifocal encephalomyelitis. *Bras. J. Microbiol.* 38, 354-356.

Bernard, S.L., Shen, D.T., Gorham, J.R., 1982. Antigen requirements and specificity of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of canine IgG against canine distemper viral antigens. *Am. J. Vet. Res.* 43 (12), 2266-2269.

Blixenkroner-Møller, M.; Pedersen, I.R.; Appel, M.J.; Griot, C., 1991. Detection of IgM antibodies against canine distemper virus in dog and mink sera employing enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *J. Vet. Diag. Invest.* 3, 3-9.

Bootland, L. M.; Leong, C.J., 1992. Staphylococcal coagglutination, a rapid method of identifying infectious hematopoietic necrosis virus. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 (1), 6-13.

Brinkman, J. A.; Rahmani, M.Z.; Jones, W. E.; Chaturvedi, A.K.; Hagensee, M. E., 2004. Optimization of PCR based detection of human papillomavirus DNA from urine specimens. *J. Clin. Virol.* 29, 230-240.

Del Río, M. L.; Gutierrez, C. B.; Ferri, E. F. R., 2003. Value of indirect hemagglutination and coagglutination tests for serotyping *Haemophilus parasuis*. *J. Clin. Microbiol.* 41 (2), 880-882.

Elia, G.; Decaro, N.; Martella, V.; Cirone, F.; Lucente, M.S.; Lorusso, E.; Di Trani, L.; Buonavoglia, C., 2006. Detection of canine distemper virus in dogs by real-time RT-PCR. *J. Virol. Methods* 136, 171-176.

Flekna, G.; Schneeweiss, W.; Smulders, F.J.M.; Wagner, M.; Hein, I., 2007. Real-time PCR method with statistical analysis to compare the potential of DNA isolation methods to remove PCR inhibitors from samples for diagnostic PCR. *Mol. Cell Probes.* 21, 282-287.

Frisk, A.L.; König, M.; Moritz, A.; Baumgärtner, W., 1999. Detection of Canine Distemper Virus Nucleoprotein RNA by Reverse Transcription-PCR Using Serum, Whole Blood, and Cerebrospinal Fluid from Dogs with Distemper. *J. Clin. Microbiol.* 37 (11), 3634-3643.

Gebara, C. M.S.; Wosiacki, S. R.; Negrão, F. J.; Oliveira, D. B.; Beloni, S. N. E.; Alfieri, A. A.; Alfieri, A. F., 2004. Detecção do gene da nucleoproteína do vírus da cinomose canina por RT-PCR em urina de cães com sinais clínicos de cinomose. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 56 (4), 480-487.

Goding, J.W., 1978. Use of staphylococcal protein A as an immunological reagent. *J. Immun. Methods.* 20, 241-253.

Jóźwik, A.; Frymus, T., 2005. Comparison of the immunofluorescence assay with RT-PCR and nested PCR in the diagnosis of canine distemper. *Vet Res Commun.* 29, 347-359.

Kim, Y.H.; Cho, K.W.; Youn, H.Y.; Yoo, H.S.; Han, H.R., 2001. Detection of canine distemper virus (CDV) through one step RT-PCR combined with nested PCR. *J. Vet. Sci.*, 2 (1), 59-63.

Kronvall, G.; Seal, U.S.; Finstad, J.; Williams, R.C., 1970. Phylogenetic insight into evolution evolution of mammalian Fc fragment of  $\gamma$ G globulin using staphylococcal protein A. *J. Immun.* 104 (1), 140-146.

Kronval, G., 1973. A rapid slide-agglutination method for typing pneumococci by means of specific antibody adsorbed to protein A containing staphylococci. *J. Med. Microbiol.* 6, 187- 190.

Martella, V.; Elia,G.; Lucente, M.S.; Decaro, N.; Lorusso, E.; Banyai, K.; Blixenkronemoller, M.; Lan, N.T.; Yamaguchi, R.; Cirone, F.; Carmichael, L.E.; Buonavoglia, C., 2007. Genotyping canine distemper virus (CDV) by a hemi-nested multiplex PCR provides a rapid approach for investigation of CDV outbreaks. *Vet. Microbiol.* 122, 32-42.

Montassier, H.J.; Araújo, J.P.; Pinto, A.A., 1994. Rapid coagglutination test for the detection and typing of foot and mouth disease virus. *J. Virol. Methods.* 50, 29-42.

Negrão, F.J.; Alfieri, A.A.; Alfieri, A.F., 2007. Avaliação da urina e de leucócitos como amostras biológicas para a detecção ante mortem do vírus da cinomose canina por RT-PCR em cães naturalmente infectados. **Arq. Brás. Med. Vet. Zootec.** 59 (1), 253-257.



Peret, T.C.T.; Durigon, E.L.; Candeias, J.M.G.; Stewien, K.E.; Candeias, J.A.N., 1995. A combined staphylococcal coagglutination assay for rapid identification of rotavirus and adenovirus (COARA). *J. Virol. Methods.* 52, 265-272.

Peshev, R.; Alexandrov, M.; Ivanov, Y.; Gogov, Y., 1996. Demonstration of rabbit haemorrhagic disease virus antigen by *Staphylococcus* protein A coagglutination test. *J. Virol. Methods.* 57, 15-18.

Quinn, F.D. Sample preparation for nucleic acid amplification. In: LEE, H.; MORSE, S. OLSVIK, Ø. *Nucleic acid amplification technologies.* Massachusetts: Eaton, 1997. chap.4, 49-60.

Rzeżutka, A.; Mizak, B., 2002. Application of N-PCR for diagnosis of distemper in dogs and fur animals. *Vet. Microbiol.* 88, 95-103.

Saito, T.B.; Alfieri, A.A.; Wosiacki, S.R.; Negrão, F.J.; Morais, H.S.A.; Alfieri, A. F., 2006. Detection of canine distemper virus by reverse transcriptase-polymerase chain reaction in the urine of dogs with clinical signs of distemper encephalitis. *Res. Vet. Sci.* 80, 116-119.

Singh, B.R.; Yadav, R.C.; Singh S.P.; Sharma, V.D., 1998. Coagglutination test: a simple and rapid immunodiagnostic test for parvovirus infection in dogs. *Indian J. Exp. Biol.* 36, 622-624.

Smith, P.K.; Krohn, R.I.; Hermanson, G.T.; Mallia, A.K.; Gartner, F.H.; Provenzano, M.D.; Fujimoto, E.K.; Goeke, N.M.; Olson, B.J.; Klenk, D.C., 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150 (1), 76-85.

Toye, B.; Woods, W.; Bobrowska, M.; Ramotar, K., 1998. Inhibition of PCR in genital and urine specimens submitted for *Chlamydia trachomatis* testing. *J. Clin. Microbiol.* 36 (8), 2356-2358.

Varshney, B. C.; Ponnanna, N. M.; Sarkar, P. A.; Rehman, P.; Shah, H., 2007. Development of a monoclonal antibody-based co-agglutination test to detect enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from diarrheic neonatal calves. *J. Vet. Sci.* 8 (1), 57-64.

Wilson, I.G., 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (10), 3741-3751.

---

## CAPÍTULO 4

## Discussão Geral

A necessidade de métodos de preparação mais eficientes, rápidos e principalmente mais baratos foram os motivos que nos levaram a realizar o presente trabalho. Pela experiência prévia de nossa equipe em trabalhar com a técnica de coaglutinação e técnicas sorológicas aliada a vários projetos em desenvolvimento no Laboratório de Virologia e Diagnóstico Molecular que utilizam rotineiramente a PCR formulou-se a hipótese de conciliar técnicas sorológicas com as de PCR.

Como já sabido, teste de coaglutinação utilizando o *Staphylococcus aureus* (COA) é baseado na propriedade da proteína A, de se ligar especificamente à porção Fc da imunoglobulina G de alguns mamíferos (KRONVALL et al., 1970). Esta propriedade da proteína A já foi explorada para o diagnóstico de diversas enfermidades (BOOTLAND & LEONG, 1992; MONTASSIER et al., 1994; PERET et al., 1995; PESHEV et al., 1996; SINGH et al., 1998; DEL RIO et al., 2003; VARSHNEY, et al., 2007), onde o teste mostrou-se específico, rápido, barato e com baixo limiar de detecção. Entretanto, mesmo apresentando muitas vantagens, não há muitos relatos do seu emprego na rotina diagnóstica. Neste trabalho inédito, tentou-se associar a especificidade do teste de coaglutinação com a especificidade da PCR, obtendo-se resultados favoráveis ao uso desta nova técnica de preparo do ácido nucléico.

A escolha do parvovírus canino e do vírus da cinomose foram motivados pelo fato de serem bastante diferentes estruturalmente sendo o parvovírus um vírus nu com ácido nucléico constituído de DNA e o da cinomose um vírus envelopado contendo RNA como ácido nucléico. Isso aliado também à importância dessas duas doenças para a clínica veterinária. Nossa escolha se baseou no princípio de que, caso essa técnica funcionasse para esses dois vírus, principalmente pelo material biológico de onde se faz a preparação para a PCR, ou seja, fezes e urina, a mesma poderia funcionar em outras amostras biológicas com outros vírus de maneira similar ou até mesmo melhor.

Inicialmente, optou-se por trabalhar com a PCR convencional para a padronização da técnica, uma vez a PCR em tempo real ainda tem como uma das suas desvantagens o seu custo.

As primeiras tentativas de padronização foram realizadas com o parvovírus canino, devido à facilidade de obtenção da amostra, pelo padrão de eliminação viral e por necessitar apenas uma reação de PCR. Porém, devido a presença de uma elevada quantidade de vírus na maioria das amostras, houve dificuldades na definição dos melhores resultados, pois as diferenças observadas na eletroforese em gel de agarose, na

intensidade de fluorescência nas diferentes reações e diluições da amostra, eram muito pequenas chegando-se ao ponto de não conseguir definir o “end point” da reação.

A PCR em tempo real foi a opção encontrada, por permitir a quantificação da carga viral nas amostras. Infelizmente, ainda não há muitos relatos desta técnica no Diagnóstico de enfermidades virais em pequenos animais. A maioria dos relatos são feitos por um grupo pertencente à Faculdade de Medicina Veterinária de Bari, Itália e foi nestes trabalhos que nos baseamos para a aplicação da técnica (DECARO et al, 2005a; ELIA et al.,2006).

A tecnologia inicialmente utilizada foi a do SYBR Green, mas os resultados não foram satisfatórios, pois a intensidade de fluorescência obtida era muito pequena, impedindo a comparação. Numa segunda tentativa, optou-se por utilizar a tecnologia Taqman e assim conseguiu-se finalmente uma reação com resultados satisfatórios, que permitiram analisar detalhadamente o método proposto. Devendo-se ressaltar que as amostras utilizadas no estudo, quando preparadas com o conjugado, também foram positivas na PCR convencional, demonstrando assim que técnica pode ser utilizada na rotina diagnóstica.

A padronização da metodologia para vírus RNA foi problemática. Inicialmente, problemas com a detecção do vírus padrão demonstrou a necessidade do isolamento viral. A cepa inicialmente utilizada como padrão, causava efeito citopático na cultura de células, não havia problemas com o controle negativo, mas não era possível realizar a amplificação do alvo, mesmo testando-se diferentes pares de primers, temperaturas de anelamento, concentração de magnésio e ainda diferentes genes alvo e concentrações virais. (FRISK et al., 1999; MARTELLA et al, 2007; ELIA et al., 2006).

Os problemas inicialmente encontrados levaram a um atraso considerável na padronização da técnica. Inicialmente, foi proposto a realização do experimento nos mesmos padrões que o anterior, entretanto, devido a fragilidade do CDV, encontrou-se dificuldade de obtenção e manutenção das amostras viáveis. Outra dificuldade encontrada foi a quantificação do CDV pela RT-PCR em tempo real. Os resultados obtidos tanto pela tecnologia do SYBR Green, quanto pela Taqman não foram satisfatórios. Esta segunda técnica conta com uma maior especificidade devido à utilização de sondas marcadas, portanto, acredita-se que a presença de uma pequena mutação no local de anelamento desta poderia interferir na sua anexação, prejudicando a emissão de fluorescência. A saída encontrada foi realizar a análise do experimento pela PCR tradicional. Futuramente realizar-se-á o sequenciamento do produto da RT-PCR

para a verificação de possíveis mutações e, havendo necessidade, será desenhada uma nova sonda objetivando a realização de novos testes aplicando a quantificação relativa.

## **Conclusão**

- A técnica de preparação utilizando o COA anti-CDV pode ser utilizada como auxílio a ferramenta diagnóstica molecular, principalmente pelo fato de associar a especificidade dos anticorpos com a especificidade dos primers aliado a uma relação custo-benefício bastante favorável para o COA;
- a técnica de preparo de DNA utilizando o COA é eficiente e apresenta reprodutibilidade, sendo também capaz, em conjunto com a Proteinase K e o tratamento prévio das amostras, de eliminar os inibidores da PCR de maneira desejável;
- O conjugado, mesmo sendo preparado com anticorpos policlonais, foi capaz de concentrar as partículas virais presentes nos dois tipos de amostra;

## Referências Bibliográficas

ALONSO, D.O.A.; DAGGETT, V. Staphylococcal protein A: unfolding pathways, unfolded states, and differences between the B e E domains. *PNAS*, v. 97, n.1, p.133-138, 2000.

AL-SOUD, W.A.; RÅDSTRÖM, P. Capacity of nine thermostable DNA polymerases to mediate DNA amplification in the presence of PCR-inhibiting simples. *Appl. Environ. Microbiol.* v.64, n.10, p.3748-3753, 1998.

AL-SOUD, W.A.; RÅDSTRÖM, P. Effects of amplification facilitators on diagnostic PCR in the presence of blood, feces and meat. *J. Clin. Microbiol.*, v.38, n.12, p. 4463-4470, 2000.

AMUDE, A. M.; ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F. Clinicopathological findings in dogs with distemper encephalomyelitis presented without characteristic signs of disease. . *Res. Vet. Sci.*, v.82, p.416-422, 2007a.

AMUDE, A.M.; CARVALHO, G.A.; ALFIERI, A.A.; ALFIERI, A.F. Vírus isolation and molecular characterization of canine distemper virus by RT-PCR from a mature dog with multifocal encephalomyelitis. *Bras. J. Microbiol.*, v.38, p.354-356, 2007b.

APPEL, M.J.G.; SUMMERS, B.A., Pathogenicity of morbilliviruses for terrestrial carnivores. *Vet. Microbiol.*, v.44, p. 187-191, 1995.

BERNARD, S.L., SHEN, D.T., GORHAM, J.R. Antigen requirements and specificity of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of canine IgG against canine distemper viral antigens. *Am. J. Vet. Res.*, v.43, n.12, p. 2266-2269, 1982

BLIXENKRONE-MOLLER, M.; PEDERSEN, I.R.; APPEL, M.J.; GRIOT, C. Detection of IgM antibodies against canine distemper virus in dog and mink sera employing enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *J. Vet. Diag. Invest.*, v.3, p.3-9, 1991.



BOOTLAND, L. M.; LEONG, C.J. Staphylococcal coagglutination, a rapid method of identifying infectious hematopoietic necrosis virus. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.58, n.1, p.6-13, 1992.

BRINKMAN, J. A.; RAHMANI, M.Z.; JONES, W. E.; CHATURVEDI, A.K.; HAGENSEE, M. E. Optimization of PCR based detection of human papillomavirus DNA from urine specimens. *J. Clin. Virol.*, v.29, p. 230-240, 2004.

BROEMELING, D. J.; PEL, J.; GUNN, D. C.; MAI, L. THOMPSON, J. D.; POON, H.; MARZIALI, A. An instrument for automated purification of nucleic acids from contaminated forensic samples. *JALA Charlottesville Va.*, v.13, n.1, p.40-48, 2008.

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

CARMICHAEL, L.E.; An annotated historical account of canine parvovirus. *J. Vet. Med. B.* v.52, p. 303-311, 2005.

CARMICHAEL, L.E.; Hemagglutination by canine parvovirus: serologic studies and diagnostic applications. *Am. J. Vet. Res.*, v.41, n.5, p. 784-791, 1980.

CAVALLI, A., BOZZO, G., DECARO, N., TINELLI, A., ALIBERTI, A., BUONAVOGLIA, D. Characterization of a canine parvovirus strain isolated from an adult dog. *New Microbiol.* v.24, p.239–242, 2001.

COOPER, B. J.; L. E. CARMICHAEL; M. J. APPEL; H. GREISEN. Canine viral enteritis. II. Morphologic lesions in naturally occurring parvovirus infection. *Cornell Vet.* v.69, p.134–144, 1979.

DECARO, N.; ELIA, G.; MARTELLA, V.; DESARIO, C.; CAMPOLO, M.; DI TRANI, L.; TARSITANO, E.; TEMPESTA, M.; BUONAVOGLIA, C. A real time

PCR assay for rapid detection and quantitation of canine parvovirus type 2 in the feces of dogs. *Vet. Microbiol.*, v.105, p. 19-28, 2005a.

DECARO, N.; DESARIO, C.; CAMPOLO, M.; ELIA, G.; MARTELLA, V.; RICCI, D.; LORUSSO, E.; BUONAVOGLIA, C. Clinical and virological findings in pups naturally infected by canine parvovirus type 2 glu-426 mutant. *J. Vet. Diag. Invest.*, v.17, p.133-138, 2005b.

DECARO, N.; MARTELLA, V.; ELIA, G.; DESARIO, C.; CAMPOLO, M.; LORUSSO, E.; COLAIANNI, M. L.; LORUSSO, A.; BUONAVOGLIA, C. Tissue distribution of the antigenic variants of canine parvovirus type 2 in dogs. *Vet. Microbiol.*, v.212, p. 39-44, 2006.

DECARO, N.; DESARIO, C.; ADDIE, D.D.; MARTELLA, V.; VIEIRA, M.J.; ELIA, G.; ZICOLA, A.; DAVIS, C.; THOMPSON, G.; THIRY, E.; TRUYEN, U.; BUONAVOGLIA, C. Molecular Epidemiology of canine parvovirus, Europe. *Emerg. Infect. Dis.* v.13, n.8, p.1222-1224, 2007.

DEDENT, A.C.; MCADOW, M.; SCHNEEWIND, O. Distribution of protein A on the surface of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.*, v.189, n.12, p.4473-4484, 2007.

Del Río, M. L.; Gutierrez, C. B.; Ferri, E. F. R. Value of indirect hemagglutination and coagglutination tests for serotyping *Haemophilus parasuis*. *J. Clin. Microbiol.*, v.41, n.2, p. 880-882, 2003.

DESARIO, C., DECARO, N., CAMPOLO, M., CAVALLI, A., CIRONE, F., ELLIA, G., MARTELLA, V., LORUSSO, E., CAMERO, M., BUONAVOGLIA, C. Canine parvovirus infection: Which diagnostic test for virus? *J. Virol. Methods.*, v.126, p.179-185, 2005.

ELIA, G.; DECARO, N.; MARTELLA, V.; CIRONE, F.; LUCENTE, M.F.; LORUSSO, E.; DESARIO, C.; CAMERO, M.; DI TRANI, L.; BUONAVOGLIA, C. Detection of canine distemper virus in dogs by real time RT-PCR. *J. Virol. Methods.*, v.136, p.171-176, 2006.

ELIA, G.; CAVALLI, A.; DESARIO, C.; LORUSSO, E.; LUCENTE, M. S.; DECARO, N.; MARTELLA, V.; BUONAVOGLIA, C. Detection of infectious canine parvovirus type 2 by mRNA real time RT-PCR. *J. Virol. Methods.*, v.146, p.202-208, 2007.

ESFANDIARI, J. KLINGEBORN, B. A comparative study of a new rapid and one-step test for the detection of parvovirus in faeces from dogs, cats and mink. *J. Vet. Med. B*, n.47, p.145–153, 2000.

FAVORPREP®: Viral nucleic acid extraction kit. Taiwan, 2008. Disponível em: <<http://www.favorgen.com>>. Acesso em: 01 mai. 2008.

FENNER, F.J.; GIBBS, E.P.J.; MURPHY, F.A. *Veterinary Virology*. 2ed. California: Academic, 1993. 666p.

FLEKNA, G.; SCHNEEWEISS, W.; SMULDERS, F.J.M.; WAGNER, M.; HEIN, I. Real-time PCR method with statistical analysis to compare the potential of DNA isolation methods to remove PCR inhibitors from samples for diagnostic PCR. *Mol. Cell Probes*, v. 21, p. 282-287, 2007.

FRISK, A.L., KÖNIG, M., MORITIZ, A., BAUMGÄRTNER, W. Detection of Canine Distemper Virus Nucleoprotein RNA by Reverse Transcription-PCR Using Serum, Whole Blood, and Cerebrospinal Fluid from Dogs with Distemper. *J. Clin. Microbiol.*, v.37, n.11, p. 3634-3643, 1999.

GEBARA, C. M.S.; WOSIACKI, S. R.; NEGRÃO, F. J.; OLIVEIRA, D. B.; BELONI, S. N. E.; ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F. Detecção do gene da nucleoproteína do vírus da cinomose canina por RT-PCR em urina de cães com sinais clínicos de cinomose. *Arq. Brás. Med. Vet. Zootec.*, v.56, n.4, p.480-487, 2004.

GODING, J.W. Use of staphylococcal protein A as an immunological reagent. *J. Immun. Methods.*, v.20, p. 241-253, 1978.

GREENE, C.E.; APPEL, M.J. Canine distemper. In: GREENE, C.E. (Ed.). *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. Philadelphia: Saunders, 2006. p.25-41.

HEADLEY, S.A.; GRAÇA, D.L. Canine distemper: epidemiological findings of 250 cases. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* v.37, n.2, p. 136- 140, 2000.

HONG, C.; DECARO, N.; DESARIO, C.; TANNER, P.; PARDO, M. C.; SANCHEZ, S.; BUONAVOGLIA, C.; SALIKI, J. T. Occurrence of canine parvovirus type 2c in the United States. *J. Vet. Diag. Invest.*, v.19, p.535-539, 2007.

HUEFFER, K.; PARKER, J.S.L.; WEICHERT, W.S.; GEISEL, R.E.; SGRO, J.Y.; PARRISH, C. The natural host range shift and subsequent evolution of canine parvovirus resulted from virus-specific binding to the canine transferrin receptor. *J. Virol.*, v.77, n.3, p.1718-1726, 2003.

JACOBSON, M.; ENGLUND, S.; BALLAGI-PORDÁNY. The use of a mimic to detect polymerase chain reaction-inhibitory factors in feces examined for the presence of *Lawsonia intracellularis*. *J. Vet. Diag. Invest.*, v.15, p.268-273, 2003.

JÓZWIK, A.; FRYMUS, T. Comparison of the immunofluorescence assay with RT-PCR and nested PCR in the diagnosis of canine distemper. *Vet Res Commun.*, v.29, p.347-359, 2005.

KIM, D.; JEOUNG, S.Y.; AHN, S.J.; LEE, J.H.; PAK, S.I.; KWON, H.M. Comparison of tissue and fluid samples for the early detection of canine distemper virus in experimentally infected dogs. *J. Vet. Med. Sci.*, v.68, n.8, p.877-879, 2006

KIM, Y.H.; CHO, K.W.; YOUN, H.Y.; YOO, H.S.; HAN, H.R. Detection of canine distemper virus (CDV) through one step RT-PCR combined with nested PCR. *J. Vet. Sci.*, v.2, n.1, p.59-63, 2001.

KNEPP, J.H.; GERHR, M.A.; FORMAN, M.S., VALSAMAKIS, A. Comparison of automated and manual nucleic acid extraction methods for detection of enterovirus RNA. *J. Clin. Microbiol.*, v.41, n.8, p.3532-3536, 2003.

KOUTINAS, A.F.; POLIZOPOULOU, Z.; BAUMGÄRTNER, W.; LEKKAS, S.; KONTOS, V. Relation of clinical signs to pathological changes in 19 cases of canine distemper encephalomyelitis. *J. Comp. Path.*, v.126, p.47-56, 2002.

KRONVAL, G. A rapid slide-agglutination method for typing pneumococci by means of specific antibody adsorbed to protein A containing staphylococci. *J. Med. Microbiol.* v.6, p. 187- 190, 1973.

KRONVALL, G.; SEAL, U.S.; FINSTAD, J.; WILLIAMS, R.C. Phylogenetic insight into evolution evolution of mammalian Fc fragment of  $\gamma$ G globulin using staphylococcal protein A. *J. Immun.*, v.104, n.1, p. 140-146, 1970.

LANTZ, P.G.; MATSSON, M.; WADSTRÖM, T.; RÅDSTRÖM, P. Removal of PCR inhibitors from human faecal samples through the use of an aqueous two-phase system for sample preparation prior to PCR. *J. Virol. Methods.*, v.28, p.159-167, 1997.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods.*, v.25, p.402-408, 2001.

MACKAY, I.M.; ARDEN, K.E.; NITSCHKE, A. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res.*, v.30, n.6, p. 1292-1305, 2002.

MARTELLA, V.; DECARO, N.; BUONAVOGLIA, C. Evolution of CPV-2 and implicance for antigenic/genetic characterization. *Virus Genes*, v.33, p. 11-13, 2006.

MARTELLA, V.; ELIA,G.; LUCENTE, M.S.; DECARO, N.; LORUSSO, E.; BANYAI, K.; BLIXENKRONE-MOLLER, M.; LAN, N.T.; YAMAGUCHI, R.; CIRONE, F.; CARMICHAEL, L.E.; BUONAVOGLIA, C. Genotyping canine distemper virus (CDV) by a hemi-nested multiplex PCR provides a rapid approach for investigation of CDV outbreaks. *Vet. Microbiol.*, v.122, p. 32-42, 2007.

MCCAWE, D.L.; HOSKINS, J. Canine viral enteritis. In: GREENE, G.E. *Infectious diseases of the dog and cat*. 2 ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2006. chap. 8, p. 63-73.

MONTASSIER, H.J.; ARAÚJO, J.P.; PINTO, A.A. Rapid coagglutination test for the detection and typing of foot and mouth disease virus. *J. Virol. Methods.*, v.50, p.29-42, 1994.

MONTEIRO, L.; BONNEMAISON, D.; VEKRIS, A.; PETRY, K.G.; BONNET, J.; VIDAL, R.; CABRITA, J.; ME'GRAUD, F. Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: *Helicobacter pylori* model. *J. Clin. Microbiol.*, v.35, n.4, p.995-998, 1997.

MOVITZ, J. A study on the biosynthesis of protein A in *Staphylococcus aureus*. *Eur. J. Biochem.*, v. 48, p.131 – 136, 1974.

MURPHY, F.A.; GIBBS, E.P.J.; HORZINEK, M.C.; STUDDERT, M.J., *Veterinary Virology*. 3.ed. San Diego:Academic Press, 1999.629p.

NAKAMURA, M.; TOHYA, Y.; MIYAZAWA, T.; MOCHIZUKI, M.; PHUG, H. T.; NGUYEN, N. H.; HUYNH, L. M.; NGUYEN, L. T.; NGUYEN, P. N.; NGUYEN, P. V.; NGUYEN, N.P.; AKASHI, H. A novel antigenic variant of canine parvovirus from a vietnamese dog. *Arch Virol.*, v.149, p.2261-2269, 2004.

NEGRÃO, F.J.; ALFIERI, A.A.; ALFIERI, A.F. Avaliação da urina e de leucócitos como amostras biológicas para a detecção *ante mortem* do vírus da cinomose canina por RT-PCR em cães naturalmente infectados. *Arq. Brás. Med. Vet. Zootec.*, v.59, n.1, p.253-257, 2007.

O'SEAGHDHA, M.; VAN SCHOOTEN, C. J.; KERRIGAN, S. W.; EMSLEY, J.; SILVERMAN, G. J.; COX, D.; LENTING, P. J.; FOSTER, T. J. *Staphylococcus aureus* protein A binding to von Willebrand factor A1 domain is mediated by conserved IgG binding regions. *FEBS J.*, v. 273, p. 4831-4841, 2006.

PARKER, J.S.; MURPHY, W.J.; WANG, D.; O'BRIEN, S.J.; PARRISH, C.R. Canine and feline parvoviruses can use human or feline transferrin receptors to bind, enter and infect cells. *J. Virol.*, v.75, n.8, p.3896-3902, 2001.

PARRISH, C.R.; BURTONBOY, G.; CARMICHAEL, C.E. Characterization of nonhemagglutinating mutant of canine parvovirus. *Viol.*, v.163, n.1, p. 230-232, 1988.

PEREIRA, C.A.D.; MONEZI, T.A.; MEHNERT, D.U.; D'ANGELO, M.; DURIGON, E.L. Molecular characterization of canine parvovirus in Brazil by polymerase chain reaction assay. *Vet. Microbiol.*, v.75, p. 127-133, 2000.

PERET, T.C.T.; DURIGON, E.L.; CANDEIAS, J.M.G.; STEWIEN, K.E.; CANDEIAS, J.A.N. A combined staphylococcal coagglutination assay for rapid identification of rotavirus and adenovirus (COARA). *J. Virol. Methods.*, v.52, p.265-272, 1995.

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

PESHEV, R.; ALEXANDROV, M.; IVANOV, Y.; GOGOV, Y. Demonstration of rabbit haemorrhagic disease virus antigen by Staphylococcus protein A coagglutination test. *J. Virol. Methods.*, v.57, p.15-18, 1996.

QUINN, F.D. Sample preparation for nucleic acid amplification. In: LEE, H.; MORSE, S. OLSVIK, Ø. *Nucleic acid amplification technologies*. Massachusetts: Eaton, 1997. chap.4, p.49-60.

REED, A. P.; E. V. JONES; T. J. MILLER. Nucleotide sequence and genome organization of canine parvovirus. *J. Virol.*, v.62, p.266–276, 1988.

RIEMANN, K.; ADAMZIK, M.; FRAUENRATH, S.; EGENSBERGER, R.; SCHIMID, K.W.; BROCKMEYER, N.H.; SIFFERT, W. Comparison of manual and automated nucleic acid extraction from whole-blood samples. *J. Clin. Lab. Anal.*, v.21, p.244-248, 2007.

RUDD, P.A.; CATTANEO, R.; VON MESSLING, V. Canine distemper virus uses both anterograde and hematogenous pathway for neuroinvasion., *J. Virol.*, v.80, n.19, p.9361-9370, 2006.

RZEŻUTKA, A.; MIZAK, B. Application of N-PCR for diagnosis of distemper in dogs and fur animals. *Vet. Microbiol.*, v.88, p. 95-103, 2002.

SAITO, T.B.; ALFIERI, A.A.; WOSIACKI, S.R.; NEGRÃO, F.J.; MORAIS, H.S.A.; ALFIERI, A. F. Detection of canine distemper virus by reverse transcriptase-polymerase chain reaction in the urine of dogs with clinical signs of distemper encephalitis. *Res. Vet. Sci.*, v.80, p.116-119, 2006a.

SAITO, T.B.; ALFIERI, A.A.; NEGRÃO, F.J.; MORAIS, H.S.A.; ALFIERI, A. F. Optimization and evaluation of the RT-PCR assay for *ante* and *post mortem* detection of canine distemper virus infection. *Vet. e Zootec.*, v.13, n.1, p.63-72, 2006b.

SEKI, F.; ONO, N.; YAMAGUCHI, R.; YANAGI, Y. Efficient isolation of wild strains of canine distemper virus in VERO cells expressing canine SLAM (CD150) and their adaptability to marmoset B95a cells. *J. Virol.*, v.77, n.18, p.9943-9950, 2003.

SHIN, Y.; MORI, T.; OKITA, M.; GEMMA, T.; KAI, C.; MIKAMI, T. Detection of canine distemper virus nucleocapsid protein gene in canine peripheral blood mononuclear cells by RT-PCR. *J. Vet. Med. Sci.*, v.57, n.3, p.439-445, 1995.

SILVA, M.C.; FIGHERA, R.A.; BRUM, J.S.; GRAÇA, D.L.; KOMMERS, G.D.; IRIGOYEN, L.F.; BARROS, C.S.L. Aspectos clinico patológicos de 620 casos neurológicos de cinomose em cães. *Pesq. Vet. Brás.*, v.27, n.5, p.215-220, 2007.

SINGH, B.R.; YADAV, R.C.; SINGH S.P.; SHARMA, V.D. Coagglutination test: a simple and rapid immunodiagnostic test for parvovirus infection in dogs. *Indian J. Exp. Biol.*, v. 36, p. 622-624, 1998.



SMITH, P.K.; KROHN, R.I.; HERMANSON, G.T.; MALLIA, A.K.; GARTNER, F.H.; PROVENZANO, M.D.; FUJIMOTO, E.K.; GOEKE, N.M.; OLSON, B.J.; KLENK, D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.*, v.150, n.1, p.76-85, 1985.

STAROVASNIK, M. A.; BRAISTED, A. C.; WELLS, J. A. Structural mimicry of a native protein by a minimized binding domain. *Proc Natl Acad Sci.* V.94, p.10080-10085, 1997.

STROTTMANN, D. M.; SCORTEGAGNA, G.; KREUTZ, L. C.; BARCELLOS, L. J. G.; FRANDOLOSO, R.; ANZILIERO, D. Diagnóstico e estudo sorológico da infecção pelo parvovirus canino em cães de Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciên. Rur.*, v.38, n.2, p.400-405, 2008.

TANG, Y.W.; SEFERS, S.E.; LI, H.; KOHN, D.J.; PROCOP, G.W. Comparative evaluation of three commercial systems for nucleic acid extraction from urine specimens. *J. Clin. Microbiol.*, v.43, n.9, p. 4830-4833, 2005.

TERAMOTO, Y.A.; MILDBRAND, M.M.; JONATHAN, C.; COLLINS, J.K.; WINSTON, S. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay, DNA hybridization, hemagglutination and electron microscopy for detection of canine parvovirus infections. *J. Clin. Microbiol.*, v.20, n.3, p. 373-378, 1984.

TOYE, B.; WOODS, W.; BOBROWSKA, M.; RAMOTAR, K. Inhibition of PCR in genital and urine specimens submitted for *Chlamydia trachomatis* testing. *J. Clin. Microbiol.*, v.36, n.8, p.2356-2358, 1998.

TRUYEN, U. Evolution of canine parvovirus – A need for new vaccines? *Vet. Microbiol.*, v.117, p. 9-13, 2006.

TRUYEN, U. Recent advances in canine infectious diseases. International Veterinary Information Service, 2000. Disponível em: <<http://www.ivis.org>> Acessado em 23 abr. 2006.

UWATOKO, K.; SUNAIRI, M.; NAKAJIMA, M.; YAMAURA, K. Rapid method utilizing the polymerase chain reaction for detection of canine parvovirus in feces of diarrheic dogs. *Vet. Microbiol.*, v.43, p. 315-323, 1995.

VALASEK, M.A.; REPA, J.J. The power of real-time PCR. *Adv. Physiol. Educ.*, v.29, p.151-159, 2005.

VARSHNEY, B. C.; PONNANNA, N. M.; SARKAR, P. A.; REHMAN, P.; SHAH, H. Development of a monoclonal antibody-based co-agglutination test to detect enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from diarrheic neonatal calves. *J. Vet. Sci.*, v.8, n.1, p.57-64, 2007.

VON MESSLING, V.; HARDER, T.C.; MOENNIG, V.; RAUTENBERG, P.; NOLTE, I.; HAAS, L. Rapid and sensitive detection of immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies against canine distemper virus by a new recombinant nucleocapsid protein-based enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.*, v.37, n.4, p. 1049-1056, 1999.

WILSON, I.G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.63, n.10, p.3741-3751, 1997.

## **Anexo 1**

### **O anexo um refere-se às normas de publicação da revista “Journal Of Virological Methods” ·**

#### Guide for Authors

Research articles should generally not exceed 25 typewritten pages and should be divided into Summary (on a separate sheet and not exceeding 200 words, followed by 3-6 keywords). Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements and References.

#### Presentation of manuscript

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Italics are not to be used for expressions of Latin origin, for example, *in vivo*, *et al.*, *per se*. Use decimal points (not commas); use a space for thousands (10 000 and above).

Language Editing: International Science Editing and Asia Science Editing can provide English language and copyediting services to authors who want to publish in scientific, technical and medical journals and need assistance before they submit their article or, before it is accepted for publication. Authors can contact these services directly: International Science Editing ( <http://www.internationalscienceediting.com>) and Asia Science Editing ( <http://www.asiascienceediting.com>) or, for more information about language editing services, please contact [authorsupport@elsevier.com](mailto:authorsupport@elsevier.com) who will be happy to deal with any questions.

Please note Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our terms & conditions ( [http://www.elsevier.com/wps/find/termsconditions.cws\\_home/termsconditions](http://www.elsevier.com/wps/find/termsconditions.cws_home/termsconditions))).

Provide the following data on the title page (in the order given).

#### Title.

Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

#### Author names and affiliations.

Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the Authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the Author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name, and, if available, the e-mail address of each Author.

### Corresponding Author.

Clearly indicate who is willing to handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.

### Present/permanent address.

If an Author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a "Present address" (or "Permanent address") may be indicated as a footnote to that Author's name. The address at which the Author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

### Abstract

A concise and factual abstract is required (maximum length 200 words). The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separate from the article, so it must be able to stand alone.

References should therefore be avoided, but if essential, they must be cited in full, without reference to the reference list.

The use of abbreviations is discouraged and only a minimum number of acronyms may be included if they are necessary. Non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

### Keywords.

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

### Abbreviations.

Define abbreviations that are not standard in this field at their first occurrence in the article: in the abstract but also in the main text after it. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

### Arrangement of the article

#### Subdivision of the article.

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ?), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to "the text". Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

#### Introduction.

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

#### Experimental/Materials and methods.

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

#### Results.

Results should be clear and concise.

#### Discussion.

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them.

#### Conclusions.

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

#### Acknowledgements.

Place acknowledgements, including information on grants received, before the references, in a separate section, and not as a footnote on the title page.

#### References.

See separate section, below

#### Figure captions, tables, figures, schemes.

Present these, in this order, at the end of the article. They are described in more detail below. High-resolution graphics files must always be provided separate from the main text file (see Preparation of illustrations).

#### Footnotes.

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves on a separate sheet at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

#### Table footnotes.

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

#### Tables.

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

#### Nomenclature and units.

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI.

## Virus nomenclature.

Each virus should be identified at least once, preferably in the 'Introduction' or 'Materials and Methods' section, using formal family, genus, and species terms and where possible by using a precise strain designation term as developed by an internationally recognized specialty group or culture collection. Please note that the word type is not used before species designations that include a number. Formal terms used for virus families, genera, and species should be those approved by the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV): Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., and Ball, L.A. (2005) *Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses*. Eighth ICTV Report, Academic Press, an imprint of Elsevier. This volume also includes standard abbreviations for species. Once formal taxonomic names have been given in a paper, vernacular terms may be used.

### Formal taxonomic nomenclature

In formal taxonomic usage, the first letters of virus order, family, subfamily, genus and species names are capitalized and the terms are printed in italics. Other words in the species names are not capitalized unless they are proper nouns or parts of nouns, for example West Nile virus. In formal usage, the name of the taxon should precede the term for the taxonomic unit; for example; "the family Paramyxoviridae," "the genus Morbillivirus." The following represent examples of full formal taxonomic terminology:

1. Order Mononegavirales, family Rhabdoviridae, genus Lyssavirus, species Rabies virus.
2. Family Poxviridae, subfamily Chordopoxvirinae, genus Orthopoxvirus, species Vaccinia virus.
3. Family Picornaviridae, genus Enterovirus, species Poliovirus.
4. Family Bunyaviridae, genus Tospovirus, species Tomato spotted wilt virus.

### Vernacular Taxonomic Nomenclature

In formal vernacular usage, virus order, family, subfamily, genus and species names are written in lower case Roman script: they are not capitalized, nor are they printed in italics or underlined. In informal usage, the name of the taxon should not include the formal suffix, and the name of the taxon should follow the term for the taxonomic unit; for example "the picornavirus family, the enterovirus genus." One particular source of ambiguity in vernacular nomenclature lies in the common use of the same root terms in formal family, genus or species names. Imprecision stems from not being able to easily identify in vernacular usage which hierarchical level is being cited. For example, the vernacular name "paramyxovirus" might refer to the family Paramyxoviridae, or one species in the genus Respirovirus, such as Human parainfluenza virus 1. The solution in vernacular usage is to avoid "jumping" hierarchical levels and to add taxon identification wherever needed. For example, when citing the taxonomic placement of Human parainfluenza virus 1, taxon identification should always be added: Human Parainfluenza virus 1 is a species in the genus Respirovirus, family Paramyxoviridae. In this example, as is usually the case, adding the information that this virus is also a

member of the subfamily Paramyxovirinae and the order Mononegavirales is unnecessary.

It should be stressed that italics and capital initial letters need be used only if the species name refers to the taxonomic category. When the name refers to viral objects such as virions present in a preparation or seen in an electron micrograph, italics and capital initial letters are not needed and the names are written in lower case Roman script. This also applies when the names are used in adjectival form, for instance tobacco mosaic virus polymerase. The use of italics when referring to the name of a species as a taxonomic entity signals that it has the status of an officially recognized species. The 8th ICTV Report (Fauquet, C.M. et al., 2005, Academic Press, an imprint of Elsevier) should be consulted to ascertain which names have been approved as official species names. When the taxonomic status of a new putative species is uncertain or its position within an established genus has not been clarified, it is considered a tentative species and its name is not written in italics although its initial letter is capitalized.

#### Origins of bioreagents

The origins of bioreagents should be described adequately, including citation of culture collections, companies, or colleagues from whom the bioreagents were obtained. If viruses were collected from nature, the collecting site and procedure should also be properly described. Bioreagents include but are not necessarily limited to virus strains and species, antibodies, and cell lines.

#### DNA sequences and GenBank Accession numbers.

Many Elsevier journals cite "gene accession numbers" in their running text and footnotes. Gene accession numbers refer to genes or DNA sequences about which further information can be found in the databases at the National Center for Biotechnical Information (NCBI) at the National Library of Medicine. Elsevier Authors wishing to enable other scientists to use the accession numbers cited in their papers via links to these sources, should type this information in the following manner:

For each and every accession number cited in an article, Authors should type the accession number in bold, underlined text. Letters in the accession number should always be capitalised. (See Example below). This combination of letters and format will enable Elsevier's typesetters to recognise the relevant texts as accession numbers and add the required link to GenBank's sequences.

Example: "GenBank accession nos. **AI631510** , **AI631511** , **AI632198** , and **BF223228**) , a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. **BE675048**) , and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. **AA361117**) ".

Authors are encouraged to check accession numbers used very carefully. An error in a letter or number can result in a dead link. In the final version of the printed article, the accession number text will not appear bold or underlined. In the final version of the electronic copy, the accession number text will be linked to the appropriate source in the NCBI databases enabling readers to go directly to that source from the article.

#### Preparation of supplementary data.

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the Author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data is provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

#### References

Responsibility for the accuracy of bibliographic citations lies entirely with the Authors.

#### Citations in the text:

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either "Unpublished results" or "Personal communication" Citation of a reference as "in press" implies that the item has been accepted for publication and a copy of the title page of the relevant article must be submitted.

#### Citing and listing of Web references.

As a minimum, the full URL should be given. Any further information, if known (Author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

#### Text:

All citations in the text should refer to:

1. Single Author: the Author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. Two Authors: both Authors' names and the year of publication;
3. Three or more Authors: first Author's name followed by "et al." and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: "as demonstrated (Allan, 1996a, 1996b, 1999; Allan and Jones, 1995). Kramer et al. (2000) have recently shown ...."

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same Author(s) in the same year must be identified by the letters "a", "b", "c", etc., placed after the year of publication.



Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2000. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51-59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 1979. *The Elements of Style*, third ed. Macmillan, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 1999. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281-304.

Use of the Digital Object Identifier (DOI)

The digital object identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. The correct format for citing a DOI is shown as follows (example taken from a document in the journal *Physics Letters B*):

doi:10.1016/j.physletb.2003.10.071

When you use the DOI to create URL hyperlinks to documents on the web, they are guaranteed never to change.

Preparation of electronic illustrations

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as "graphics" or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Helvetica, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide all illustrations as separate files and as hardcopy printouts on separate sheets.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please "save as" or convert the images to one of the following formats (Note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below.):  
EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as "graphics".

TIFF: Colour or greyscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (colour or greyscale): a minimum of 500 dpi is required.

DOC, XLS or PPT: If your electronic artwork is created in any of these Microsoft Office applications please supply "as is".

Please do not:

- Supply embedded graphics in your wordprocessor (spreadsheet, presentation) document;
- Supply files that are optimised for screen use (like GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

### Captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

### Line drawings

The lettering and symbols, as well as other details, should have proportionate dimensions, so as not to become illegible or unclear after possible reduction; in general, the figures should be designed for a reduction factor of two to three. The degree of reduction will be determined by the Publisher. Illustrations will not be enlarged. Consider the page format of the journal when designing the illustrations. Do not use any type of shading on computer-generated illustrations.

### Photographs (halftones)

Remove non-essential areas of a photograph. Do not mount photographs unless they form part of a composite figure. Where necessary, insert a scale bar in the illustration (not below it), as opposed to giving a magnification factor in the caption. Note that photocopies of photographs are not acceptable.

### Colour Illustrations

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable colour figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in colour on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. For colour reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for colour in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting colour figures to "grey scale" (for the printed version should you not opt for colour in print) please submit in addition usable black and white versions of all the colour illustrations.

Proofs

When your manuscript is received by the Publisher it is considered to be in its final form. Proofs are not to be regarded as "drafts".

One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding Author, to be checked for typesetting/editing. No changes in, or additions to, the accepted (and subsequently edited) manuscript will be allowed at this stage. Proofreading is solely your responsibility.

A form with queries from the copyeditor may accompany your proofs. Please answer all queries and make any corrections or additions required.

The Publisher reserves the right to proceed with publication if corrections are not communicated. Return corrections within 2 days of receipt of the proofs. Should there be no corrections, please confirm this.

Elsevier will do everything possible to get your article corrected and published as quickly and accurately as possible. In order to do this we need your help. When you receive the (PDF) proof of your article for correction, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication. Subsequent corrections will not be possible, so please ensure your first sending is complete. Note that this does not mean you have any less time to make your corrections, just that only one set of corrections will be accepted.

Offprints Twenty-five offprints will be provided free of charge. Additional reprints may be purchased at the proof stage. The offprint order is sent to authors with the copyright form when the article is received by the Issue Manager