



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO EMVZ
MEDICINA VETERINÁRIA**

ANA PAULA NEVES CORREIA

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR SUPERVISIONADO:
DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE DOENÇAS VIRAIS EM BOVINOS COM
DIARREIA**

Araguaína, TO

2022

Ana Paula Neves Correia

**Relatório de estágio curricular supervisionado:
Diagnóstico molecular de doenças virais em bovinos com diarreia**

Monografia apresentada à Universidade Federal do Tocantins (UFT), Campus Universitário de Araguaína - EMVZ para obtenção do título de Médica Veterinária

Orientador: Professor Dr. José Carlos Ribeiro Júnior

Supervisora: Professora Dra. Alice Fernandes Alfieri

Araguaína, TO

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

C824r Correia, Ana Paula Neves .
 Relatório de Estágio Curricular Supervisionado: Diagnóstico Molecular de Doenças Virais em Bovinos com Diarreia . / Ana Paula Neves Correia. – Araguaína, TO, 2022.

37 f.

 Relatório de Graduação - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Araguaína - Curso de Medicina Veterinária, 2022.

 Orientador: Dr. José Carlos Ribeiro Júnior

 1. Diagnóstico molecular. 2. Bovinos. 3. RT-PCR. 4. PAGE. I.
Título

CDD 636.089

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).


Ana Paula Neves Correia

**Relatório de estágio curricular supervisionado:
Diagnóstico molecular de doenças virais em bovinos com diarreia**

Monografia apresentada à UFT – Universidade Federal do Tocantins – Campus Universitário de Araguaína - EMVZ, Curso de Medicina Veterinária foi avaliado para a obtenção do título de Médica Veterinária e aprovada em sua forma final pelo Orientador e pela Banca Examinadora.


Data de aprovação: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora


Documento assinado digitalmente
 JOSE CARLOS RIBEIRO JUNIOR
Data: 08/12/2022 13:59:54-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. José Carlos Ribeiro Júnior - UFT

Orientador

Documento assinado digitalmente
 ALINE ALBERTI MORGADO
Data: 08/12/2022 17:32:17-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dra. Aline Alberti Morgado - UFT

Documento assinado digitalmente
 BRUNA ALEXANDRINO
Data: 08/12/2022 16:03:42-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dra. Bruna Alexandrino - UFT

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus por estar do meu lado todas as vezes em que quis desistir e por me pôr em situações que me fizeram aprender muito e me moldaram na pessoa que sou hoje.

Aos meus professores, desde o ensino médio ao ensino superior, por serem excelentes profissionais e me mostrarem um mundo completamente novo no qual estou ansiosa para fazer parte.

Ao pessoal do LabMa por me fazerem rir e aprender ao mesmo tempo e ao pessoal do LabViral por me ensinarem tanto em tão pouco tempo que não posso acreditar na experiência surreal que tive.

Aos meus pais, que investiram na minha educação e me ajudaram a me tornar a mulher que sou, me ensinando humildade, caráter e sabedoria. À minha irmã, por todo o apoio, ensinamentos e por me servir de grande ícone de admiração. Obrigada por ser uma mulher tão incrível e me guiar a tentar ser o mesmo. Quem me dera conseguir ser metade do mulherão que tu é.

À Casa das Primas - Sérgio, Ítalo, Rony e Emily – por ser minha família e meu apoio quando me senti tão sozinha e desolada. Gratidão eterna por terem salvado a minha vida e me mostrado quanto o mundo pode ser incrível. Obrigada por todas as risadas, os choros, os beijos, os abraços, os pores do sol na sacada, as noites estudando, as noites nos bares e as madrugadas memoráveis cantando alto e incomodando todos os vizinhos. Obrigada por salvarem a minha vida. Eu amo cada um de vocês, meus eternos irmãos. Não seria a pessoa que sou sem vocês.

Aos meus melhores amigos, Paloma, Rony e Lucas por me enaltecerem e me ajudarem a acreditar que sou capaz, mesmo duvidando constantemente. Obrigado por dividirem o mesmo neurônio que eu. Amo vocês mais do que tudo. Minha família é a família de vocês e enquanto eu estiver viva, vocês terão um lar.

E por fim, um agradecimento diferenciado a todos que passaram pela minha vida e não ficaram. Apesar de tudo que experienciamos, não fomos feitos para permanecer. Isto não torna o que vivemos menos válido ou precioso para mim. Sou grata a tudo. Absolutamente tudo.

“Não é na ciência que está a felicidade, mas na aquisição da ciência.”

- Edgar Allan Poe.

RESUMO

O seguinte trabalho tem como intuito descrever o Estágio Curricular Supervisionado, o qual fora orientado pelo professor Dr. José Carlos Ribeiro Júnior e supervisionado pela professora Dra. Alice Fernandes Alfieri. Todo o estágio foi feito no Laboratório de Virologia Animal na Universidade Estadual de Londrina entre 15 de agosto e 27 de outubro de 2022. Além de apresentar o local, seus componentes, equipe, exames oferecidos e relatar as atividades desenvolvidas no decorrer do estágio, esta monografia tem como propósito abordar o diagnóstico molecular de enfermidades causadas por vírus que originam diarreia em bovinos. Através de técnicas que utilizam da biologia molecular para melhor acurácia em identificar patógenos, material genético fora extraído das amostras que em seguida foram levadas para análise com eletroforese em gel de poliacrilamida e RT-PCR seguida de eletroforese em gel de agarose e leitura em luz ultravioleta. Entre as amostras enviadas para análise no laboratório, houve uma grande quantidade de fezes diarreicas, portanto serão descritas as técnicas, resultados e discussões feitas a partir delas.

Palavras-chaves: biologia molecular; PAGE; RT-PCR; veterinária.

ABSTRACT

The following work aims to describe the supervised curricular internship, which was guided by professor Dr. José Carlos Ribeiro Júnior and supervised by professor Dr. Alice Fernandes Alfieri. The entire internship was completed in the Animal Virology Laboratory at the State University of Londrina, between the periods of August 15 and September 27, 2022. Besides introducing the premises, its components, the team, exams offered and report the activities developed during the internship, this essay also aims to address the molecular diagnosis of infirmities caused by viruses that originates diarrhea in bovines. Through procedures in which uses molecular biology to improve the accuracy to identify pathogens, genetic material was extracted from samples that later were analyzed by polyacrylamide gel electrophoreses and underwent RT-PCR followed by electrophoreses in agaroses gel and reading through UV light. Among the samples that were sent to the lab was a large amount of diarrheal feces, therefore it will be describe the techniques, the results and the discussions made from them.

Keywords: molecular biology; PAGE; RT-PCR; veterinary.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Salão do Piso 1 do Laboratório de Virologia Animal.....	15
Figura 2. Salão do Piso 2 do Laboratório de Virologia Animal.....	16
Figura 3. Gráfico de amostras recebidas em porcentagem.....	20
Figura 4. Padrão de rotavírus identificado em gado leiteiro em estudo de BUZINARO et. al em 2000.....	24

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Exames ofertados pelo Laboratório de Virologia Animal.....	17
Quadro 2. Atividades desenvolvidas durante o período de estágio.....	18
Quadro 3. Exames solicitados durante o período de estágio no Laboratório de Virologia Animal e seus respectivos resultados.....	26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

cDNA	DNA complementar
CVD	vírus da cinomose canina
DNA	ácido desoxirribonucleico
DEPEC	dietilpirocarbonato
L2	tampão TRIS-HCl-guanina-sílica fracionada
L6	tampão TRIS-HCl-EDTA-Triton-sílica fracionada
mg	miligrama
PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida
PBS	tampão fosfato salino
PCR	reação em cadeia polimerase
POP	programa operacional padrão
R2	residente de segundo ano
RNA	ácido ribonucleico
rpm	rotações por minuto
RT	transcrição reversa
SDS	dodecil sulfato de sódio
TBE	tampão TRIS-borato-EDTA
TERV	tampão de estabilização de rotavírus
UEL	Universidade Estadual de Londrina
UFT	Universidade Federal do Tocantins

LISTA DE SÍMBOLOS

μl microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	LOCAL DE ESTÁGIO.....	14
2.1	Exames oferecidos.....	16
2.1.1	Envio de material.....	17
3	ATIVIDADES DESENVOLVIDAS.....	18
3.1	Casuística.....	19
4	INTRODUÇÃO ÀS ENFERMIDADES.....	20
4.1	Rotavírus bovino.....	20
4.2	Coronavírus.....	21
4.3	Diarreia viral bovina.....	22
5	Relato de caso.....	23
5.1	PAGE.....	24
5.2	RT-PCR.....	25
5.3	Discussão.....	27
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	27
7	REFERÊNCIAS.....	28
	ANEXOS.....	31

1 INTRODUÇÃO

O Estágio Curricular Supervisionado Obrigatório, que compõe a etapa final para a obtenção do título de Médico Veterinário pela Universidade Federal do Norte do Tocantins, foi realizado no Laboratório de Virologia Animal do Departamento de Medicina Preventiva (DMVP) na Universidade Estadual de Londrina, Paraná. Com supervisão da professora Dra. Alice Fernandes Alfieri e orientação do professor Dr. José Carlos Ribeiro Júnior, o período de estágio compreendeu-se entre 15 de agosto a 27 de outubro de 2022, das 8:00 às 12:00 pela manhã e 14:00 às 18:00 no período da tarde, totalizando 432 horas.

Com o auxílio de profissionais qualificados, a experiência do estágio supervisionado torna-se transformadora ao fazer a correlação entre a teoria da graduação e a prática do trabalho do médico veterinário. Ao trabalhar com o diagnóstico molecular, foi possível entender a acurácia e grande efetividade que ele proporciona ao ser capaz de fazer diferenciações invisíveis aos olhos e facilitar para o profissional da saúde o entendimento dos patógenos enfrentados.

Dentro da imensidade de técnicas e procedimentos vistos durante o período de estágio, observou-se uma elevada frequência da entrada de amostras de fezes bovinas de animais com suspeita clínica para infecções virais causadores de diarreia, acometendo não somente animais adultos, mas também neonatos. Esta manifestação clínica presente em bezerros causa demasiadas perdas na produção, resultando em grandes impactos econômicos (DARGATZ, 1997). Conseqüentemente, faz-se necessária a presença do diagnóstico efetivo e rápido destas enfermidades, podendo assim diminuir as perdas do produtor.

2 LOCAL DE ESTÁGIO

O laboratório de Virologia Animal da Universidade Estadual de Londrina compõe parte do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, sendo a equipe composta pelos docentes Dr. Amauri Alcindo Alfieri, Dra. Alice Fernandes Alfieri, Dra. Elis Lorenzetti e pelos técnicos Dra. Juliana Torres Tomazin Fritzen, Marcos Vinicius de Oliveira e Renilda Calabrio Cianca. Durante o período de efetivação do estágio também estavam presentes as residentes em moléstias infecciosas Carolina Yuka Yasumitsu, Bruna Ávila Torres e a bolsista técnica de nível superior Denise Correia Silva.

O prédio do laboratório é dividido em dois pisos. O primeiro possui um salão (Figura 1) com três bancadas, onde ocorre a recepção, identificação, armazenagem das amostras e as técnicas de extração de material genético. Nele há também refrigeradores, estufa de secagem, três centrífugas, um vórtex e uma máquina de maceração mecânica, equipamentos que auxiliam na realização das técnicas. Com acesso ao salão existem seis salas, onde ocorrem as técnicas de eletroforese, soroneutralização, esterilização de placas de microtitulação, maceração de tecidos, armazenamento de amostras da rotina e clonagem de forma separada. Além destas, o primeiro piso também contém uma sala para limpeza e esterilização de materiais, dois banheiros, um almoxarifado e uma lavanderia.

Figura 1. Salão do Piso 1 do Laboratório de Virologia Animal.



Fonte: Zucoloto, arquivo pessoal, 2021.

O segundo piso é compreendido pelas salas de preparo de mix de PCR; sala de inclusão de material genético; sala de cultivo celular; sala de permanência dos alunos; sala de sequenciamento genético e sala de armazenamento de amostras à -20°C e -80°C. Nestes locais é permitida somente a entrada de material o qual já passou pelo processo de extração, evitando assim a entrada de sujidades e a ocorrência de contaminações.

Figura 2. Salão do Piso 2 do Laboratório de Virologia Animal.



Fonte: Arquivo pessoal, 2022.

Amostras de diversas fazendas, clínicas e empresas de diferentes regiões do Brasil chegam ao laboratório com requisições dos médicos veterinários responsáveis. Após o recebimento e aprovação dos pedidos, começam então os procedimentos que antecedem os exames, como por exemplo inativação de soro sanguíneo e coleta de tecido para maceração. Quando finalizadas as análises, os laudos são enviados via e-mail, fax ou Correios.

2.1 Exames oferecidos

Dentre os exames feitos no laboratório (Quadro 1) estão o Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA), ELISA Policlonal, a técnica de Reação em Cadeia Polimerase (PCR), Soroneutralização, Inibição de Hemaglutinação (HI), Hemadsorção (HA), Hemadsorção – eluição – Hemaglutinação (HeHa), e

Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE). As análises que utilizam do soro sanguíneo como material possibilitam detecção de Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR), Diarreia viral bovina (BVD), Parvovírus canino (CPV) e Rotavírus humano/animal. Quando o material recebido é fezes, os testes feitos são para Rotavírus humano/animal/aves, Coronavírus bovino (BCov) e CPV. Outros exames disponíveis são Isolamento viral de Herpesvírus, Pestivírus A e B (BVDV) e Rotavírus e PCR para IBR, BVD, Rotavirose e Cinomose (CVD).

Quadro 1. Exames ofertados pelo Laboratório de Virologia Animal.

Exames	Material	Agentes
ELISA	soro sanguíneo	herpesvírus
ELISA Policlonal	soro sanguíneo	rotavírus animal/humano
HA	fezes	parvovírus canino
HeHA	fezes	BCov
HI	soro sanguíneo	CPV
PAGE	fezes	rotavírus
PCR	tecido, fezes, urina, sangue com coagulante	herpesvírus, BVDV, rotavírus e CVD
Soroneutralização	soro sanguíneo	herpesvírus, BVDV

Fonte: Própria autora, 2022.

2.1.1. Envio de material

A forma como o material é enviado tem de ser adequada para que chegue em perfeito estado para análise. O soro deve ser armazenado de forma mais limpa possível, ou seja, sem hemácias ou hemólise, enviado sob refrigeração ou congelado, identificado e com volume entre 1 e 2 mL. As fezes podem ser enviadas em pote coletor próprio para este material, luvas de palpação ou sacos plásticos bem fechados e refrigerados até sua chegada ao laboratório. A massa média adequada é de 10 gramas por animal ou por *pool* que seja representativo do lote.

Quando o material for tecido, os fragmentos ou órgãos devem estar individualizados em sacos plásticos ou luvas de palpação, refrigerados e, se possível, submersos em líquido de Valée. O tamanho dos fragmentos pode ser de aproximadamente 10 cm e de regiões próximas à lesão. No caso de papilomas, deve ser feita assepsia do local antes e depois da coleta, mantendo-os refrigerados ou

congelados em frasco limpo ou saco plástico, com massa entre 3 e 5 gramas por animal.

As amostras, obrigatoriamente, devem ser enviadas em caixas de isopor com gelo reciclável ou comum, desde que este esteja em saco fechado, não molhando as amostras; lacradas; identificadas; e, acompanhadas do pedido e ficha de acompanhamento com o histórico clínico do animal. Sem estes pré-requisitos, o laboratório não admite a amostra para análise.

3 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

Cada técnica realizada no laboratório respeita um procedimento operacional padrão (POP), de escolha dos responsáveis, para que sejam feitas da melhor forma possível. Nos Anexos estão alguns dos POPs elaborados para o laboratório, incluindo manipulação de equipamentos e extração de material genético. Dentre as atividades desenvolvidas, foi possível conhecer diversas metodologias utilizadas para diagnóstico de moléstias virais, desde o preparo inicial dos materiais até o resultado e laudos.

Quadro 2. Atividades desenvolvidas durante o período de estágio no Laboratório de Virologia Animal da Universidade Estadual de Londrina.

ATIVIDADE	REALIZAÇÃO
Lavagem, preparo e esterilização de material	Acompanhamento e realização das etapas para limpeza e esterilização de materiais utilizados no laboratório.
Preparo de soluções estéreis	Esterilização de meios que serão usados para cultivo celular.
Extração bruta de fezes	Extração inicial feita com tampão de estabilização de rotavírus (TERV).
Extração de ácido nucleico pela técnica fenol/clorofórmio/álcool-isoamílico	Associação das técnicas descritas por Alfieri et. al (2006) e BOOM (1990).
Preparo de géis de agarose e	Estes géis são meios utilizados para

poliacrilamida	técnicas de eletroforese, permitindo visualização de fragmentos de material genético (GREMY, 1959).
Preparo de solução de mix para PCR e RT-PCR	Soluções que contém percussores e enzimas necessárias para a realização da PCR e RT-PCR.
Execução das técnicas de PCR e RT-PCR	Reação em cadeia polimerase com intuito de amplificar o material genético da amostra.
Acompanhamento de eletroforese	Aplicação e análise da técnica de eletroforese em géis de agarose e poliacrilamida.
Inoculação das amostras em cultura celular e acompanhamento do efeito citopático viral	Inoculação e incubação por três dias em estufa à 37°C, posteriormente analisando efeito do vírus sobre a célula.
Preparo de tubos e garrafas de células de linhagem estabelecida	Preparo de cultivo celular de linhagem Madin-Darby Bovine Kidney (MDBK)
Purificação de produtos de PCR ou Nested	Utiliza do kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Anexo D) para limpeza e preparo da amostra de DNA para procedimentos como sequenciamento.

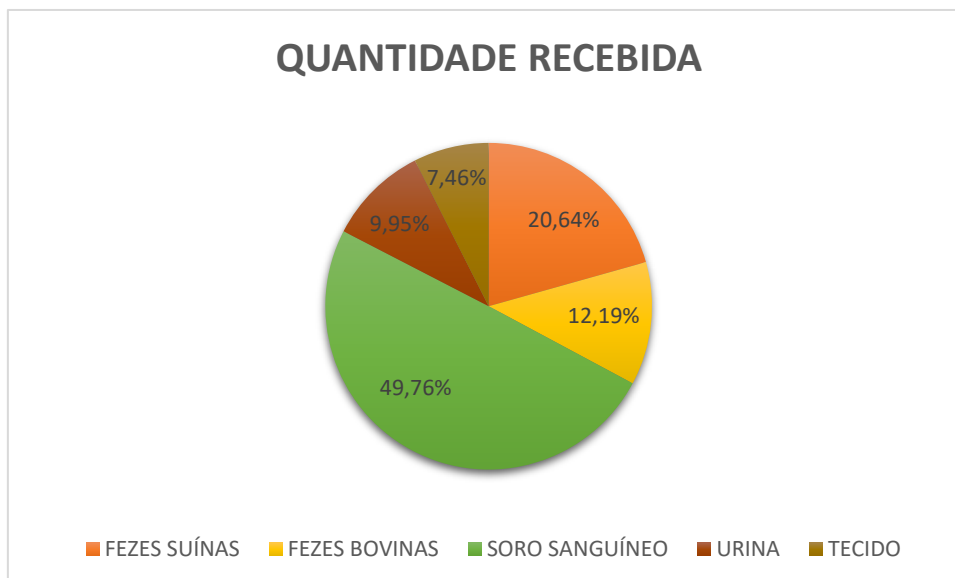
Fonte: Própria autora, 2022.

Casuística 3.1

Durante o período de estágio acompanhou-se variados exames e projetos de pesquisa que estavam em desenvolvimento com alunos de pós-graduação e professores da universidade. Dentre os materiais processados, houve cerca de 200

amostras de soro sanguíneo, 83 fezes suínas, 49 de fezes bovinas, 40 amostras de urina de cães e 30 amostras de tecido.

Figura 3. Gráfico de amostras recebidas em porcentagem.



Fonte: Própria autora, 2022.

4. INTRODUÇÃO ÀS ENFERMIDADES

O Brasil é um dos maiores produtores de carne bovina do mundo, ficando em segundo lugar no ranking mundial, sendo responsável por 13,66% da produção (ABIEC, 2022). Para a manutenção e prospecção desta posição é necessário um controle de qualidade altíssimo sobre possíveis doenças que possam diminuir a produção, causar óbitos ou até apresentarem caráter zoonótico (ESONA & GAUTAM, 2015). Dentre as doenças virais causadores de diarreia que mais acometem bovinos no Brasil, se destacam o rotavírus bovino (BRV), BCov e a diarreia viral bovina (BVD).

4.1 Rotavírus bovino

O Rotavírus bovino pertence ao gênero *Rotavirus*, Família *Sedoviridae* (ICTV, 2022) e infecta todos os vertebrados, sendo geralmente associado à diarreia neonatal, que resulta em grandes perdas econômicas mundialmente. Ele é um vírus RNA, não envelopado, com dupla hélice e 11 segmentos de material genético, no qual cada segmento codifica uma proteína específica, classificando-os em grupos (A-H) ou espécies diferentes (RONDELLI *et al.*, 2018). Esta última característica é

utilizada como um diferencial em metodologias de diagnóstico, como por exemplo o PAGE.

A estrutura do rotavírus é composta por um capsídeo proteico dividido em três camadas, nas quais estão distribuídas seis proteínas estruturais (VP1-VP4, VP6, VP7) e seis não estruturais (NSP1-NSP6) (MEDEIROS *et al.*, 2020). No Brasil, o grupo mais comum detectado é o grupo A (RVA), responsável principalmente por causar diarreia nas primeiras semanas de vida bezerros e leitões. Outros grupos, como B e C, também já foram identificados nesta espécie, porém em menor frequência (ALFIERI *et al.*, 2004).

A infecção por rotavírus acontece via fecal-oral, devido a ingestão de água e alimentos contaminados com os vírions. Os animais podem ser assintomáticos ou desenvolverem problemas gastrointestinais graves como diarreia aguda, vômitos e alto grau de desidratação (DESSELBERGER, 2014). O diagnóstico pode ser feito por análise em microscopia eletrônica; isolamento viral em meio de cultivo celular, apesar de menos frequentemente utilizado, e o ensaio imunoenzimático ELISA, que é o teste de eleição para detecção de rotavírus (VIEIRA & GOMES, 2021).

Não há tratamento específico para rotavírus, somente o cuidado paliativo e manutenção dos sinais clínicos, fazendo a hidratação do animal e reposição de eletrólitos. Em animais jovens, pode ser feito o uso de cateter esofágico para a administração dos fluidos e nos animais adultos é preferível a reidratação via intravenosa (GELETU *et al.*, 2021).

Como profilaxia, faz-se as boas práticas de manejo e higiene além da vacinação de todo o rebanho. Devido à sua grande variabilidade genômica, o controle epidemiológico é de grande importância para que se entenda a prevalência dos determinados genótipos da região e a vacina utilizada seja eficiente. (SIQUEIRA, 2018).

4.2 Coronavírus bovino

O BCov é um vírus RNA fita simples, com morfologia esférica, envelopado e pertence ao Gênero *Betacoronavirus* da Família *Coronaviridae*. Ele possui 5 proteínas estruturais que são importantes para a ocorrência da infecção da célula hospedeira, são elas: M (matriz), Sm (“small membrane”), N (nucleocapsídeo), S (Spike) e HE (hemaglutinina-esterase), utilizadas para diferenciação entre outros tipos de coronavírus (BEUTTEMULLER *et al.*, 2017).

Este patógeno é geralmente encontrado em bovinos de diferentes idades com sintomatologia respiratória e gastrointestinal, são conhecidas três síndromes que são causadas pelo BCov: disenteria do inverno, diarreia neonatal e síndrome respiratória. Surtos de diarreia em gado adulto não são incomuns, principalmente quando associados à BCov. Os sinais característicos são diarreia com aspecto aquoso, depressão e anorexia (RIBEIRO *et al.*, 2016).

Assim como a rotavirose, o coronavírus bovino não tem tratamento específico, somente manutenção dos sinais clínicos, como reidratação, sendo ela intravenosa e não oral, pois o BCov causa danos às células do epitélio intestinal; e antibioticoterapia para infecções secundárias. Estudos em Ontario, Canadá entre 2008 e 2012 apontam um crescimento de infecções por coronavírus em bezerros diarreicos, causando grandes impactos nas produções de bovinos, isto pode ser explicado pelo aumento de densidade nas propriedades, elevando o número de contaminações, assim como a falta de diagnóstico preciso e o número de novas cepas. Por ter característica de alta infectividade, recomenda-se manter o animal com BCov em isolamento, até que haja completa recuperação (NASCIMENTO *et al.*, 2021).

A profilaxia indicada é a vacinação de todo o rebanho, incluindo os bezerros, além de manejo adequado com limpeza e monitoramento dos animais. Atualmente existem vacinas para bezerros com menos de três semanas de vida, outra forma também pode ser a aplicação do vírus inativo nas vacas prenhas entre três e seis semanas antes do parto. A reaplicação da vacina deve ocorrer 4 semanas depois, assim, com a vaca imunizada, a progênie receberá imunização através do colostro (NASCIMENTO *et al.*, 2021).

4.3 BVD

A diarreia viral bovina é uma importante patogenia causada por vírus do Gênero *Pestivirus*, seja ele *Pestivirus A* (BVDV 1) ou *Pestivirus B* (BVDV 2), pertencentes à Família *Flaviviridae*. Ele é envelopado, de formato esférico e tem como ácido nucleico uma fita simples de RNA (ICTV, 2022). O pestivírus bovino já fora isolado em gado apresentando problemas respiratórios, reprodutivos, digestivos, sinais hemorrágicos e em fetos mumificados. Apresentando, portanto, diferentes

características que são equivalentes a cada sorotipo específico. (MERCHIATTO, 2020).

A transmissão deste vírus pode ocorrer atrás de fômites, de forma indireta e através do contato com secreções, excreções, além de embriões e sêmen contaminado em inseminações assistidas (WEBER, 2013). O diagnóstico pode ser feito com testes de sorologia (soroneutralização e teste ELISA), isolamento viral, imuno-histoquímica, além de técnicas moleculares como RT-PCR e RTq-PCR. ((BRUM & WEIBLEN, 2007).

Para profilaxia é recomendado, além do uso de boas práticas de higiene, a vacinação de todos os animais, exceto vacas prenhes, pois há associação de infecção via intrauterina com vacinas atenuadas. (MOENNING & BRECHER, 2018). Por ser um vírus que está mundialmente distribuído, afetando animais domésticos e silvestres, é necessário o controle epidemiológico, acompanhando o surgimento de novas cepas e correlacionando seus respectivos sinais clínicos. (MARCO *et al.*, 2011).

5 RELATO DE CASO

Entre os dias 15 de agosto e 27 de outubro de 2022 foram recebidas 49 amostras de fezes bovinas no Laboratório de Virologia Animal da UEL. Dentre elas, 16 apresentavam-se diarreicas, 45 pertenciam a bovinos de corte, 4 a bovinos de leite e 8 eram de bezerros. Os exames solicitados procuravam os agentes BRV, BCov e BVDV, sendo os dois primeiros os mais solicitados (46 amostras). As metodologias de diagnóstico utilizadas foram RT-PCR e PAGE.

Para a realização das duas metodologias realizadas, a primeira fase consiste na extração do material genético das amostras. O POP utilizado para extração faz associação das técnicas fenol/clorofórmio-álcool isoamílico e sílica/isotiocianato de guanidina descrita por Alfieri *et. al* (2006) que tem como produto 50µL de ácido nucleico (Anexo II). Este pode ser armazenado em microtubo estéril à 4°C ou congelado a -20°C caso não seja utilizado imediatamente. A partir disto, a amostra pode ser processada para o teste requisitado.

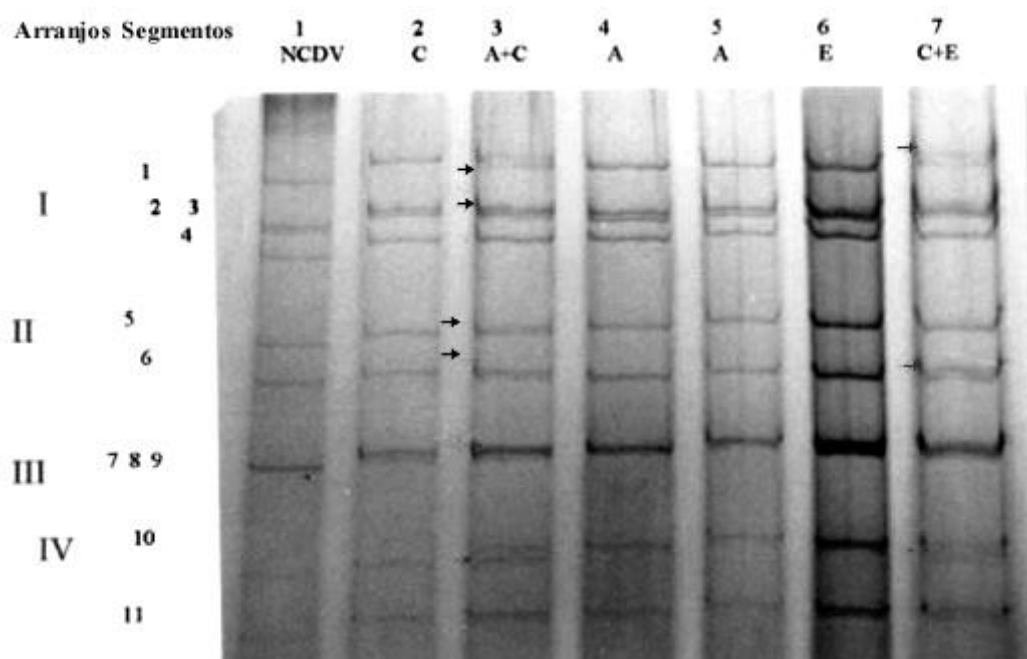
5.1 PAGE

A eletroforese em gel de poliacrilamida feita no laboratório segue um protocolo operacional padrão para todas as suas etapas (Anexo V). Primeiramente é feita a organização da bancada com a disposição de todos os materiais que serão utilizados, incluindo pipetas, ponteiras e soluções.

Faz-se dois géis, um inferior com volume de 20mL e um superior com 10mL. Ambos os géis são colocados em um molde de vidro, primeiro o inferior, até que polimerize e por fim o segundo gel, fazendo sobreposição. Diferentemente de géis de agarose, as amostras do PAGE são aplicadas verticalmente, em seguida são colocadas em uma cuba com um eletrodo negativo na parte superior e um positivo na parte inferior para que a migração das amostras ocorra de cima para baixo.

O processo da eletroforese dura aproximadamente 3 horas, ao seu fim o gel passa por uma série de soluções que serão responsáveis pela revelação dos resultados. No caso do rotavírus, como seu material genético contém 11 segmentos, a leitura pode ser feita de duas formas. Caso o intuito seja identificar a presença ou ausência do rotavírus na amostra, independe o padrão dos segmentos desde que sejam aparentes. Caso o exame seja feito para diferenciar os tipos de rotavírus, faz-se uma análise do padrão dos segmentos, assim como mostrado no estudo de Buzinaro *et al.* (2000).

Figura 4. Padrão de rotavírus identificado em gado leiteiro em estudo de Buzinaro *et al.* (2000).



Dentre as amostras testadas para rotavírus em PAGE, foram identificadas amostras positivas para rotavírus A, o que condiz com vários estudos feitos no Brasil

sobre maior frequência deste grupo em bovinos (ALFIERI *et al.*, 2004; RONDELI, 2018; MEDEIROS *et al.*, 2020).

5.2 RT-PCR

A transcrição reversa-reação em cadeia polimerase é dividida em três fases, portanto faz-se três soluções (mix) na sala de preparo. O primeiro mix é feito para a Desnaturação, no qual são utilizados dois *primers* (*forward* e *reverse*) e água DEPC, ele então será acrescido a amostra de DNA. O segundo é feito para o processo de Transcrição Reversa, nele serão acrescentados tampões, MgCl₂, dNTPs, a enzima SuperScript II/MMLV e água DEPEC, resultando em uma solução que será adicionada ao microtubo que passou pela Desnaturação. O mix de PCR é composto de tampões, dNTPs, um par de primers, a enzima Taq DNA Polimerase Platinum e água DEPC.

A Desnaturação da amostra consiste na adição do mix, seguida de elevação de temperatura no termociclador (97°C) por 7 minutos, ou seja, até que a fita de RNA de desenovele e os primers se liguem a ela. Passado o tempo, as amostras são retiradas do termociclador e imediatamente levadas a banho de gelo por 5 min, para que haja choque térmico, abaixando a temperatura rapidamente sem que a fita volte a se enovelar, permitindo a próxima fase.

A Transcrição Reversa (RT) é a etapa em que o RNA se torna um cDNA, ou seja, um DNA complementar. A enzima de escolha para fazer a transcrição reversa foi a SuperScript II (Invitrogen) que tem temperatura ótima de 42°C, portanto o produto da Desnaturação é acrescido do mix RT, que contém condições de microambiente favoráveis à ação da enzima. Depois de homogeneizadas e centrifugadas, elas foram novamente levadas ao termociclador por 30 minutos.

A Reação em Cadeia Polimerase (PCR) é o método de amplificação de material genético capaz de fazer aumentos exponenciais de sequencias de DNA. O processo ocorre em ciclos, ou seja, há quedas e aumentos de temperatura que irão permitir que os *primers* se liguem às fitas de cDNA, indicando o local onde a enzima Taq DNA polimerase crescerá novas bases nitrogenadas, gerando novas fitas de DNA (DESSELBERGER, 2014). Por ser caracterizada pelos ciclos térmicos, cada PCR irá variar, pois os ciclos variam de acordo com os *primers* utilizados e cada um deles terá uma temperatura de ação adequada.

A solicitação de RT-PCR foi submetida ao laboratório na procura de três agentes: Rotavírus A, BCov e BVD. Os três vírus têm como material genético o RNA, portanto todos passaram pelos mesmos procedimentos. O fator que distingue os três é o par de *primers* utilizado, pois cada *primer* se liga a uma sequência de nucleotídeos específica. No rotavírus A, o par de *primers* utilizado foi o *Beg 9* e *End 9*, descritos por Gouvea *et al.* (1990) que se ligam à região que codifica o gene VP7. Os primers escolhidos para diagnóstico de BVDV são 324/BD1 e 326/BD3, estes descritos por Vilcek *et al.* (1994) e o par utilizado em PCR para BCov é nt79-98/nt467-485 (TAKIUCHI *et al.*, 2005).

Das 17 amostras testadas para os agentes supracitados em RT-PCR, somente 5 tiveram resultados positivos, sendo elas com Rotavírus A presente.

Quadro 3. Exames solicitados durante o período de estágio no Laboratório de Virologia Animal e seus respectivos resultados.

AMOSTRAS	EXAME SOLICITADO	AGENTE PESQUISADO	RESULTADOS
1-20	PAGE	ROTAVÍRUS A	PAGE POSITIVO
21-23	PAGE E RT-PCR	ROTAVÍRUS E BCOV	NEGATIVO
24-26	PAGE E RT-PCR	ROTAVÍRUS E BCOV	NEGATIVO
27-29	RT-PCR	BVDV E BCOV	NEGATIVO
30, 31	PAGE E RT-PCR	ROTAVÍRUS E BCOV	NEGATIVO
32-36	RT-PCR	ROTAVÍRUS A E BCOV	RVA POSITIVO
37	RT-PCR	ROTAVÍRUS A E BCOV	NEGATIVO
38-49	PAGE	ROTAVÍRUS	NEGATIVO

Fonte: Própria autora, 2022.

5.3 Discussão

No Brasil existem diversos fatores que podem ser responsáveis por causar desequilíbrios intestinais em bovinos, entre eles protozoários, bactérias e problemas de manejo (RIBEIRO *et al.*, 2016). Portanto é bastante comum que haja ampla solicitação de exames a procura dos principais patógenos que são comumente encontrados em propriedades de gado leiteiro e corte. As solicitações variam de acordo com a manifestação clínica, o histórico do animal, a análise do médico veterinário, entre tantos outros fatores. Com isto é necessário o conhecimento amplo sobre diferentes técnicas de diagnóstico para que ao fazer a solicitação de exames, o médico veterinário responsável seja assertivo à sua suspeita clínica inicial. Essas ações, portanto, podem fundamentar programas de vigilância, controle e profilaxia para diversas enfermidades, além de monitorar as cepas circulantes dos principais agentes etiológicos.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em virtude de tudo que foi vivenciado durante o período de estágio foi eternamente gratificante presenciar e trabalhar ao lado de profissionais de intelecto imensurável. Esta etapa final da graduação é de enorme importância ao estudante para pôr em prática o conteúdo que foi adquirido durante os anos anteriores. Dentro do assunto escolhido, foi possível entender como a biologia molecular representa uma grande parte da ciência que está por trás de entender tantos aspectos dos agentes etiológicos de inúmeras doenças que afetam os animais e os seres humanos.

7. REFERÊNCIAS

ALFIERI, A.A.; PARAZZI, M.E.; TAKIUCHI, E.; MÉDICI, K.C.; ALFIERI, A.F. Frequency of group A rotavirus in diarrhoeic calves in Brazilian cattle herds, 1998–2002. **Tropical Animal Health and Production**. v.38, p.521. 2006. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11250-006-4349-9#citeas>

ALFIERI, A.F., ALFIERI, A.A., BARREIROS, M.A.B., LEITE, J.P.G. and RICHTZENHAIN, L.J. G and P genotypes of group A rotavirus strains circulating in calves in Brazil, 1996–1999. **Veterinary Microbiology**. v.99, p.167–173. 2004. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113503004255?via%3Dihub1>

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNE. Perfil da Pecuária no Brasil. São Paulo: **Beef Report**. p. 47. 2022. Disponível em: https://www.abiec.com.br/publicacoes/beef-report-2022/#dfliip-df_4284/1/

BASERA S.S, SINGH R, VAID N, SHARMA K, CHAKRAVARTI S, MALIK YP. Detection of Rotavirus Infection in Bovine Calves by RNA-PAGE and RT-PCR. **Indian Journal of Virology**. p. 144-147. 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23637494/>

BEUTTEMULLER E.A, ALFIERI AF, HEADLEY S.A, ALFIERI A.A. Brazilian strain of bovine respiratory coronavirus is derived from dual enteric and respiratory tropism. **Genetis and Molecular Research**. V.16. 2017.

BOOM, R.; SOL, C.J.; SALIMANS, M.M.; JANSEN, C.L. WERTHEIM-VAN DILLEN, P.M.; VAN DER NOORDAA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v.28, n.3, p.495-503. 1990.

BRUM, M.C.S.; WEIBLEN, R. Detecção, identificação e quantificação de vírus. In: FLORES, E.F. (Ed.). **Virologia veterinária**. 1. ed. Santa Maria: Editora UFSM, 2007. p. 59-86.

ESONA MD, GAUTAM R. ROTAVIRUS. **Clin Lab Med**. v.2. p. 363-91. 2015.

CHRAMBACH, A., & RODBARD, D. **Polyacrylamide Gel Electrophoresis**. **Science**, v. 172. p. 440–451.1971.

DESSELBERGER, Ulrich. Rotaviruses. **Virus Research**. Volume 190, 2014. p 75-96. 2014.

DARGATZ, David. Part I: Reference Of 1997 Beef Cow-Calf Management Practices. **United States Department of Agriculture Animal and Plant Health Inspection Service. Veterinary Services**. 1997.

ESTES M.K. & KAPIKIAN A.Z. 2007. Rotaviruses. **Fields Virology**. p.1918-1974. 2007.

FRITZEN JTT, MORETTIN AB, LORENZETTI E, ALFIERI AF, ALFIERI AA. Bovine viral diarrhoea virus subgenotype 1a in a mummified fetus from a Brazilian dairy cattle herd. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v33. p. 966-968. 2021.

FRUCCHI APS, DALL AGNOL AM, BRONKHORST DE, BEUTTEMULLER EA, ALFIERI AA, ALFIERI AF. Bovine Coronavirus Co-infection and Molecular Characterization in Dairy Calves With or Without Clinical Respiratory Disease. **Frontiers in Veterinary Science**. V.9. 2022.

MATTHIJNSSENS, J., ATTOUI, H., BÁNYAI, K., BRUSSAARD, C.P.D., DANTHI, P., del Vas, M., DERMODY, T.S., DUNCAN, R., FĀNG, Q., JOHNE, R., MERTENS, P.P.C., Jaafar, F.M., PATTON, J., SASAYA T., SUZUKI, N., WEI, T. and ICTV Report Consortium. 2022, **ICTV Virus Taxonomy Profile: Sedoreoviridae** .2022.

MARCO, I.; CABEZÓN, O.; ROSELL, R.; FERNÁNDEZ-SIRERA, L.; ALLEPUZ, A.; LAVÍN, S. **Retrospective study of pestivirus infection in Pyrenean chamois (Rupicapra pyrenaica) and other ungulates in the Pyrenees (NE Spain)**. *Veterinary Microbiology*, v. 149, p. 17-22, 2011.

MEDEIROS, T. N.S. Diarreia neonatal e infecção por rotavírus A em bezerros de corte e leite, Brasil, 2006-2015. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 40, n. 1. p. 07-11. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-5919>

MERCHIORATTO, INGRYD et al. Identification and characterization of pestiviruses isolated from individual fetal bovine serum samples originated in Rio Grande do Sul state, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira [online]**. 2020, v. 40, n. 5 [Accessed 7 December 2022], pp. 368-373. Available from: <<https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-6514>>.

MOENNIG V; BECHER P. **Control of bovine viral diarrhoea**. *Pathogens*. (2018) 7:29. 10.3390/pathogens7010029. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5874755/?report=reader>

NASCIMENTO, U. F. S et al. Coronavírus bovino: Revisão. **Revista PubVet Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.15, n.06. p. 1-11. 2021. Disponível em: <https://www.pubvet.com.br/artigo/7782/coronaviacuterus-bovino-revisatildeo>

RIBEIRO J.; LORENZETTI E.; ALFIERI A.F.; ALFIERI A.A. Molecular detection of bovine coronavirus in a diarrhoea outbreak in pasture-feeding Nellore steers in southern Brazil. **Tropical Animal Health Prod**. 2016. p. 649-53. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7088806/>>

RONDELLI, A.L.H. Outbreak of neonatal diarrhoea caused by multiple genotypes of rotavirus A in a beef calves herd. **Pesquisa Veterinária Brasileira [online]**. 2018, v. 38, n. 10. pp. 1890-1895. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-5617>>

SIQUEIRA, H.P. de G. Caracterização epidemiológica de rotavírus bovino dos Estados de Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso do Sul, no período de 2006 a 2010. **Tese de doutorado**, 2019. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/180381>>.

VIEIRA, FELIPE DA SILVA; GOMES, Rafael Gomes. Diarreia em bezerros: etiologia, tratamento e fatores imunológicos. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, Curitiba, v.4, n.4, p.5061-5102. 2021. Disponível em: <https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BJAER/article/view/37374/28858>.

ANEXOS

ANEXO I – PROTOCOLO TERMOCICLADOR

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA	
LABORATÓRIO DE VIROLOGIA ANIMAL	
PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	Revisão 00
Utilização do Termociclador Swift MaxPro Esco Healthcare	POP 06.26
	Página 1/1

1. OBJETIVO

Descrever o método de utilização do Termociclador Swift MaxPro Esco Healthcare

2. REFERÊNCIAS

Manual Operacional

3. LOCAL DE APLICAÇÃO

Piso superior, bancada em L.

4. ESPECIFICAÇÕES

Termociclador Swift MaxPro Esco Healthcare

5. PROCEDIMENTO

5.1. Observações:

5.1.1. Verificar a necessidade de EPIs de acordo com o material a ser manipulado.

5.2. Método de utilização

5.2.1. Ligar o equipamento na tomada 110V.

5.2.2. Ligar o botão **O/I** na parte de trás do equipamento, e aguardar o equipamento ligar.

5.2.3. Pressionar **Shift** para selecionar o bloco A ou B

5.2.4. Pressionar F1 para listar os programas

5.2.5. Selecionar o programa necessário pressionando as setas ◀, ▶ ou ▼, ▲ e pressione o botão **F5**.

5.2.6. Pressione **F2**, aguarde o equipamento chegar à temperatura desejada.

5.2.7. Abra a tampa, coloque as amostras e feche a tampa.

5.2.8. Pressione **F3** para que o equipamento comece a processar.

5.2.9. Ao término, abrir a tampa retirar as amostras e pressionar **F2** duas vezes.

5.2.10. Desligar o equipamento no botão **O/I** na parte de trás.

5.3. Método de programação

ANEXO II – PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE FEZES

Protocolo para extração de ácido nucleico (fezes)

A) Preparo da suspensão fecal - Extração bruta (10 a 20%):

1. Colocar em um microtubo 100 μ L ou 100 mg de fezes (homogeneizadas com uma ponteira (fezes sólidas) ou vórtex (fezes líquidas)
2. Adicionar 500 μ L de tampão TRIS/ Ca^{++} 1X (TERV)
3. Homogeneizar em vórtex
4. Centrifugar a 3.000 rpm durante 5 min.
5. Recolher 500 μ L do sobrenadante para a extração

B) Associação das técnicas fenol/clorofórmio-álcool isoamílico e sílica/isotiocianato de guanidina (Alfieri et al., 2006)

Fase I – “Fenol”

1. Adicionar 50 μ L de SDS 10% ao sobrenadante recolhido da extração bruta
2. Homogeneizar em vórtex (evitar espuma)
3. Banho-maria 56°C por 20 min.
4. Spin (centrifugar em alta rotação por 30 segundos para baixar gotículas e evitar contaminação)
5. Adicionar 500 μ L de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1)
6. Homogeneizar em vórtex
7. Banho-maria 56°C por 15 min.
8. Homogeneizar em vórtex
9. Centrifugar em alta rotação por 10 min.
10. Recolher o sobrenadante em outro microtubo (não recolher a fase intermediária)

A extração pode ser interrompida nessa fase estocando a 4°C.

Fase II – Protocolo de Boom et al., 1990 (sílica/isotiocianato de guanidina)

1. Adicionar 500 μ L de L6 ao produto obtido na Fase I
2. Adicionar 25 μ L de sílica hidratada
3. Homogeneizar em vórtex
4. Agitar em temperatura ambiente durante pelo menos 30 min.
5. Spin (centrifugar em alta rotação por 30 segundos)
6. Desprezar o sobrenadante, por inversão, em frasco contendo NaOH
7. Adicionar 500 μ L de L2
8. Homogeneizar em vórtex
9. Spin (centrifugar em alta rotação por 30 segundos)

} 2x

10. Desprezar o sobrenadante, por inversão, em frasco contendo NaOH
11. Adicionar 1 mL de álcool 70% gelado
12. Homogeneizar em vórtex
13. Spin (centrifugar em alta rotação por 30 segundos)
14. Desprezar o sobrenadante, por inversão, em descarte comum
15. Adicionar 1 mL de acetona P.A. gelada
16. Homogeneizar em vórtex
17. Spin (centrifugar em alta rotação por 30 segundos)
18. Desprezar o sobrenadante, por inversão, em descarte comum
19. Secar o *pellet* de sílica (com o microtubo aberto) em termo bloco à 60°C (aproximadamente 2 min) ou banho-maria à 56°C (15 min)
20. Adicionar 50 µL de água DPEC
21. Homogeneizar em vórtex (evitar que a sílica fique na parede do microtubo)
22. Banho-maria 56°C por 15 min.
23. Homogeneizar em vórtex
24. Centrifugar a 13.000 rpm por 4 min.
25. Recolher o sobrenadante em microtubo de 50 µL (não recolher a sílica!!!)
26. Estocar à 4°C ou -20°C até a utilização. *O produto obtido é o ácido nucleico.*

ANEXO III – PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE TECIDO

Protocolo para extração de ácido nucleico (tecido)

A) Preparo da suspensão tecido:

1. Colocar em um microtubo 100 mg de tecido macerado
2. Adicionar 1000 µL de tampão PBS
3. Homogeneizar em vórtex
4. Centrifugar a 1.000 rpm durante 5 min.
5. Recolher 500 µL do sobrenadante para a extração

B) Associação das técnicas fenol/clorofórmio/álcool isoamílico e sílica/isotiocianato de guanidina

(Alfieri et al., 2006)

Fase I – “Fenol”

1. Adicionar 50 µL de SDS 10% e 10µL de proteinase K ao sobrenadante recolhido da extração bruta
2. Homogeneizar em vórtex (evitar espuma)
3. Banho-maria 56°C por 30 min.

4. Spin (centrifugar em alta rotação por 30 segundos para baixar gotículas e evitar contaminação)
 5. Adicionar 500 µL de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1)
 6. Homogeneizar em vórtex
 7. Banho-maria 56°C por 15 min.
 8. Homogeneizar em vórtex
 9. Centrifugar em alta rotação por 10 min.
 10. Recolher o sobrenadante em outro microtubo (não recolher a fase intermediária)
- A extração pode ser interrompida nessa fase estocando a 4°C.*

Fase II – Protocolo de Boom et al., 1990 (sílica/isotiocianato de guanidina)

1. Adicionar 500 µL de L6 ao produto obtido na Fase I
2. Adicionar 25 µL de sílica hidratada
3. Homogeneizar em vórtex
4. Agitar em temperatura ambiente durante pelo menos 30 min.
5. Spin (centrifugar em alta rotação por 30 segundos)
6. Desprezar o sobrenadante, por inversão, em frasco contendo NaOH
7. Adicionar 500 µL de L2
8. Homogeneizar em vórtex
9. Spin (centrifugar em alta rotação por 30 segundos)
10. Desprezar o sobrenadante, por inversão, em frasco contendo NaOH
11. Adicionar 1 mL de álcool 70% gelado
12. Homogeneizar em vórtex
13. Spin (centrifugar em alta rotação por 30 segundos)
14. Desprezar o sobrenadante, por inversão, em descarte comum
15. Adicionar 1 mL de acetona P.A. gelada
16. Homogeneizar em vórtex
17. Spin (centrifugar em alta rotação por 30 segundos)
18. Desprezar o sobrenadante, por inversão, em descarte comum
19. Secar o *pellet* de sílica (com o microtubo aberto) em termo bloco à 56°C (aproximadamente 2 min)
20. Adicionar 50 µL de água DPEC
21. Homogeneizar em vórtex (evitar que a sílica fique na parede do microtubo)
22. Banho-maria 56°C por 15 min.

23. Homogeneizar em vórtex
24. Centrifugar a 13.000 rpm por 4 min.
25. Recolher o sobrenadante (50 μ L) em microtubo de 500 μ L (não recolher a sílica!!!)
26. Estocar à 4°C ou -20°C até a utilização. *O produto obtido é o ácido nucleico.*

ANEXO IV – PROTOCOLO DE PURIFICAÇÃO PROMEGA

Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System

INSTRUCTIONS FOR USE OF PRODUCTS A9280, A9281, A9282, AND A9285.

Quick
PROTOCOL

DNA Purification by Centrifugation

Gel Slice and PCR Product Preparation

A. Dissolving the Gel Slice

1. Following electrophoresis, excise DNA band from gel and place gel slice in a 1.5ml microcentrifuge tube.
2. Add 10 μ l Membrane Binding Solution per 10mg of gel slice. Vortex and incubate at 50–65°C until gel slice is completely dissolved.

B. Processing PCR Amplifications

1. Add an equal volume of Membrane Binding Solution to the PCR amplification.

Binding of DNA

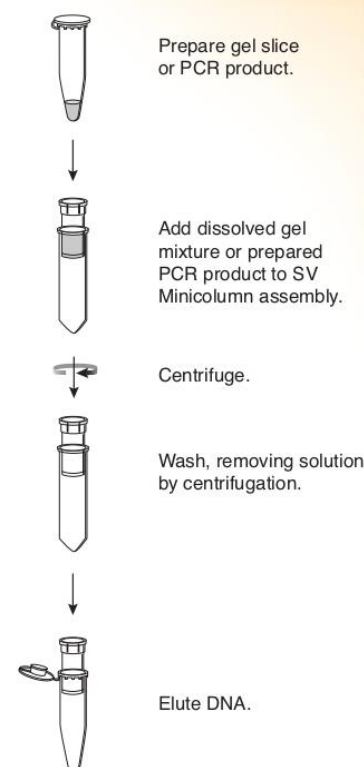
1. Insert SV Minicolumn into Collection Tube.
2. Transfer dissolved gel mixture or prepared PCR product to the Minicolumn assembly. Incubate at room temperature for 1 minute.
3. Centrifuge at 16,000 $\times g$ for 1 minute. Discard flowthrough and reinsert Minicolumn into Collection Tube.

Washing

4. Add 700 μ l Membrane Wash Solution (ethanol added). Centrifuge at 16,000 $\times g$ for 1 minute. Discard flowthrough and reinsert Minicolumn into Collection Tube.
5. Repeat Step 4 with 500 μ l Membrane Wash Solution. Centrifuge at 16,000 $\times g$ for 5 minutes.
6. Empty the Collection Tube and recentrifuge the column assembly for 1 minute with the microcentrifuge lid open (or off) to allow evaporation of any residual ethanol.

Elution

7. Carefully transfer Minicolumn to a clean 1.5ml microcentrifuge tube.
8. Add 50 μ l of Nuclease-Free Water to the Minicolumn. Incubate at room temperature for 1 minute. Centrifuge at 16,000 $\times g$ for 1 minute.
9. Discard Minicolumn and store DNA at 4°C or -20°C.



ORDERING/TECHNICAL INFORMATION:

www.promega.com • Phone 608-274-4330 or 800-356-9526 • Fax 608-277-2601

© 2002, 2004, 2005 and 2009 Promega Corporation. All Rights Reserved.



Promega

Printed in USA. Revised 11/09
Part #9FB072

376 OMA 07_2A

ANEXO V – PROTOCOLO PARA PAGE• Gel inferior (7,5%) PAGE (20 mL)

- 5 mL Lower TRIS

- 3 mL Acrilamida/Bisacrilamida

- 100 µL TEMED

- 0,560 mL persulfato de amônio 2% (0,04 g diluído em 2 mL de água bidestilada)

- 11,44 mL água bidestilada

- sempre adicionar por último o P.A. e o TEMED.

• Gel superior (3,5%) PAGE (10 mL)

- 2,5 mL Upper TRIS

- 1,4 mL Acrilamida/Bisacrilamida

- 100 µL TEMED

- 0,60 mL persulfato de amônio 2%

- 6,20 mL água bidestilada

• Solução fixadora para PAGE

- 30 mL álcool etílico absoluto

- 1,5 mL ácido acético

- Água MilliQ q.s.p. 300 mL

• Solução de prata para PAGE

- 0,55 g de nitrato de prata

- Água MilliQ q.s.p. 300 mL

Após os 30 min da impregnação pela prata o gel deve ser lavado duas vezes em água destilada, para tirar o excesso de prata.

• Solução reveladora para PAGE

- 9 g hidróxido de sódio

- 2,5 mL formaldeído

- 0,06 g borohidreto de sódio (deve ser pesado em frasco âmbar e ser diluído uns 5 min antes de passar o gel para esta solução)

- Água MilliQ q.s.p. 300 mL

• Solução stop da coloração para PAGE

- 15 mL ácido acético P.A.

- Água MilliQ q.s.p. 300 mL

- Solução conservadora para PAGE
 - 15 mL álcool etílico P.A.
 - Água MilliQ q.s.p. 300 mL