

BLO 224

853

Dr. J. A. R. C.

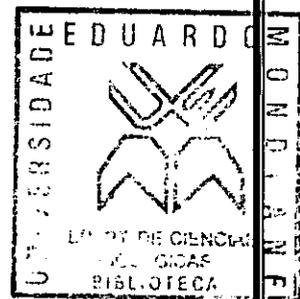


Universidade Eduardo Mondlane
Faculdade de Ciências
Departamento de Ciências Biológicas

Variante: Trabalho de Investigação

Projecto de Trabalho de Culminação de Estudos

Optimização da técnica de PCR para o diagnóstico da doença de Newcastle



Ivete Sandra Alberto Maquia



Universidade Eduardo Mondlane
Faculdade de Ciências
Departamento de Ciências Biológicas

Variante: Trabalho de Investigação
Projecto de Trabalho de Culminação de Estudos

Optimização da técnica de PCR para o diagnóstico da doença de Newcastle

Supervisores:

dr^a. Cristina Beatriz
Dr. José M. Fafetine

Maputo, Dezembro de 2006

Agradecimentos

Agradecer acima de tudo a Deus por cada dia de suspiro de vida e pela força que me manteve viva nesta longa caminhada.

Agradecer aos meus supervisores dr^a. Cristina Beatriz e Dr. José Fafetine pela confiança, paciência e dedicação.

Ao Dr. Luís Neves e dr^a. Dácia Correia pelos seus conselhos e acompanhamento ao longo do meu trabalho.

À Eng. Ivone Muocha, dr^a. Olivia Pedro e dr. Lourenço Mucambe pela transmissão de conhecimentos na parte prática da área de biologia molecular.

Aos meus amigos André Janeiro, Lina Ivette, Nilsa Margarida e Wilson Naisse pela disponibilidade em ceder um pouco do seu espaço de forma a desenvolver o meu trabalho.

A minha irmã Adelaide Maquia e meu sobrinho Yuran Albert pela sua paciência durante as minhas longas horas de ausência.

Ao Dalilo Latifo dedicação e carinho que demonstrou durante esta longa caminhada.

E a todos familiares e amigos que directa ou indirectamente contribuíram para este trabalho fosse realizado vai o meu sincero....

AGRADECIMENTO!!!!

Declaração de Honra

É por minha honra que declaro que o presente trabalho foi por mim realizado e que os dados apresentados correspondem a mais perfeita realidade.

Ivete Sandra Alberto Maquia

Ivete Sandra Alberto Maquia

Dedicatória

Aos meus Pais...

Alberto de Araújo Maquia

&

Maria Luísa Marcacia António

...almas que suspiram num tempo infinito

A vós dedico com todo amor e afecto este sonho concretizado

Que em vós me inspirei... e agradeço pela luz, força e coragem que me deste

Mesmo estando distantes.

Lista de figuras

Figura 1: Géis com bandas do produto d PCR II padrão das amostras de campo e vacinas.

Figura 2: Gel de agarose com produtos de PCR II com variação da concentração da *Taq polimerase* a 0,025 e 0,05 U/ μ l (0,25 e 0,5 μ l).

Figura 3: Gel de agarose com produtos de PCR II com concentração da *Taq polimerase* em otimizada a 0,05 U/ μ l (0,5 μ l) e variação da concentração do MgCl₂ a 0,75 mM (0,75 μ l).

Figura 4: Gel de agarose com produtos de PCR II com a concentração da *Taq polimerase* otimizada a 0,05 U/ μ l (0,5 μ l) e variação da concentração do MgCl₂ a 1 mM (1 μ l).

Figura 5: Gel de agarose com produtos de PCR II com a concentração da *Taq polimerase* otimizada a 0,05 U/ μ l (0,5 μ l) e variação da concentração do MgCl₂ a 2,25 mM (2,25 μ l).

Figura 6: Gel de agarose com produtos de PCR II com a concentração da *Taq polimerase* otimizada a 0,05 U/ μ l (0,5 μ l) e variação da concentração do MgCl₂ a 2 mM (2 μ l).

Lista de tabelas

Tabela 1: Tabela de componentes para a mistura da reacção de PCR I padrão.

Tabela 2: Tabela das condições do PCR I.

Tabela 3: Tabela de componentes para a mistura da reacção de PCR II padrão.

Tabela 4: Tabela das condições do PCR II.

Tabela 5: Condições de manipulação dos parâmetros de optimização.

Lista de Anexos

Anexo 1: Preparação de soluções.

Anexo 2: Protocolo de extracção de ARN.

Anexo 3: Protocolo de síntese de ADN complementar.

Anexo 4: Tabelas de resultados do PCR II padrão e do PCR II com variação das concentrações da Taq polimerase e $MgCl_2$.

Lista de abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucléico.

Amp. Grade: *Amplification grade*.

ARN: Ácido Ribonucléico.

AVPM-1: Paramyxovírus Aviário serotipo 1 (*Avian paramyxovirus type 1*).

BSA: "Bovine Serum Albumine" (Albumina do soro bovino).

C: Citosina.

CB-UEM: Centro de Biotecnologia da Universidade Eduardo Mondlane.

ADNc: ADN complementar.

DEPC: Dietilpirocarbonato.

DINAP: Direcção Nacional de Pecuária.

DNase: Deoxiribonuclese.

dNTP: Desoxinucleotídeo trifosfato.

DTT: Ditioneitol

DN: Doença de viral de Newcastle.

ELISA: Ensaio de Imunoabsorção enzimática (*Enzyme-Linked Immunoassays*).

F: Proteína de fusão.

G: Guanina.

HN: Hemaglutimina-neuraminidase.

kb: kilobases.

M: Proteína matrix.

Mg: Magnésio.

MgCl₂: Cloreto de magnésio

ml: Mililitros.

mM: Milimolares.

NDV: *Newcastle disease virus*.

nM: Nanomolares.

NP: Nucleoproteína.

P: Fosfoproteínas.

pb: Pares de base

PCR: Reacção em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*).

RNase. Ribonuclease.

rpm :Rotações por minuto.

RT: Transcrição Reversa (*Reverse Transcription*).

RT-PCR: *Reverse Transcription* – PCR.

TBE: Tris Borato EDTA.

Taq polimerase: Polimerase da bactéria *Thermus aquaticus*.

U: Unidades.

µl: Microlitros.

µM: Micromolares.

Resumo

O vírus da doença de Newcastle, conhecido na região sul do país como "Mazungu", é que ataca espécies aviárias. Este vírus apresenta um genoma que é constituído por uma fita simples de ARN.

O ARN total foi extraído a partir de 5 amostras de campo de líquido amniótico positivas infectados pelo vírus através do teste de inibição de hemaglutinação e 3 amostras de vacinas ambos tipos de amostras pelo Método TRIZOL.

Para o seu diagnóstico molecular pela técnica de Reacção em Cadeia da Polimerase (PCR), foi necessária a síntese da molécula de ADN complementar pelo uso da enzima de transcrição reversa *SuperScript TM III*.

O ADN complementar formado foi imediatamente utilizado como ADN para a primeira amplificação (PCR I), seguindo-se a segunda amplificação (PCR II), de modo a garantir um produto mais específico, cujo ADN corresponde ao produto do PCR I.

As amostras do PCR II foram corridas no gel de agarose a 1%, na qual após a visualização das bandas de todas amostras, foram seleccionadas as que apresentaram no gel de agarose amplificação do produto para o seu uso na optimização do PCR pela redução das concentrações dos reagentes enzima *Taq polimerase* e $MgCl_2$.

Os resultados obtidos indicam que o PCR II sem manipulação dos reagentes (PCR II padrão) apresentou melhores resultados em termo de visualização de bandas em todas as amostras exceptuando uma amostra de campo. As amostras das vacinas apresentaram resultados positivos em todas variações de concentrações dos reagentes pretendidos.

Índice

1. Introdução	1
2. Revisão bibliográfica	3
2.1. O vírus de Newcastle.....	3
2.2. Patologia.....	3
2.3. Sintomatologia	4
2.4. Patogênese.....	5
2.5. Diagnóstico.....	6
2.5.1. Testes serológicos	7
2.5.2. Testes moleculares	9
2.6. O princípio da técnica de PCR	9
2.7. Optimização da técnica de PCR.....	10
3. Objectivos	13
3.1. Objectivo geral	13
3.2. Objectivo específico.....	13
4. Local de realização do estudo	13
5. Material e métodos	13
5.1. Material	13
5.1.1. Extracção do ARN total pelo Método TRIZOL	14
5.1.2. Síntese de ADN complementar usando SuperScript™ III para RT-PCR (Reverse Transcriptase-PCR).....	14
5.1.3. Amplificação do gene F do vírus da doença de Newcastle	15

5.1.4. Electroforese e detecção dos produtos amplificados	16
5.2. Metodologia	16
5.2.1. Electroforese e detecção dos produtos amplificados	19
5.2.2. Optimização da técnica de PCR.....	20
6. Resultados.....	21
6.1. Resultados das amostras do PCR II padrão.....	21
6.2. Optimização do PCR II pela variação da concentração Taq polimerase a 0,025 e 0,05 U/ µl (0,25 e 0,5 µl).....	22
6.3. Optimização do PCR II pela variação do MgCl ₂ , com a Taq polimerase optimizada a 0,005 U/ µl (0,5 µl).....	24
6.3.1. Variação do MgCl ₂ a 0,075 mM (0,75 µl).....	24
6.3.2. Variação do MgCl ₂ a 1 mM (1 µl)	25
6.3.3. Variação do MgCl ₂ em 2 mM (2 µl).....	26
6.3.4. Variação do MgCl ₂ a 2,25 mM (2,25 µl).....	27
7. Discussão.....	28
8. Conclusões	30
9. Limitações.....	31
10. Recomendações	32
11. Bibliografia.....	33
ANEXOS.....	39

1. Introdução

A doença de Newcastle é uma doença fatal e altamente contagiosa causada por um vírus que ataca espécies aviárias e está distribuída por todo mundo (Kho *et al.*, 2000). De acordo com Sousa e colaboradores (2000), a doença causa grande impacto económico na indústria aviária, pelo seu custo em campanhas de vacinação e pelos gastos associados ao diagnóstico laboratorial. Dentre as 50 ordens de aves existentes, 27 foram reportadas como susceptíveis vírus de Newcastle (Soares *et al.*, 2005).

Moçambique é um país com boas condições para produção pecuária (DINAP, 1993), porém, doenças infecto-contagiosas como a de Newcastle absorvem a maior parte dos recursos financeiros afectos ao sector avícola (Mapaco, 2005). A falta de capacidade e conservação de vacinas (DINAP, 1993) bem como a dificuldade de obtenção de vacinas termostáveis (DINAP, 1994) são factores que afectam negativamente as campanhas de controlo da doença a nível do sector familiar. Outro ponto a considerar, é a existência dum grande número de pequenos agricultores espalhados pelo país. Esta dispersão reduz a taxa de cobertura das campanhas (DINAP, 1995).

O diagnóstico desta doença pode ser feito pela detecção de anticorpos produzidos pelo organismo hospedeiro após a infecção, que podem ser demonstrados e quantificados por testes serológicos. Dentre os testes serológicos, os mais usados para o diagnóstico da doença de Newcastle são o teste de inibição de hemaglutinação (IH) e o teste de Ensaio de Imunoabsorção enzimática - ELISA (*Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*), e também técnicas moleculares (Seal *et al.*, 2000, Hirsh e Zee, 2002).

Dado que a base molecular da patogenicidade da doença de Newcastle (DN) depende da sequência de aminoácidos no sítio de clivagem da proteína de fusão (F) (Seal *et al.*, 2000, Collins *et al.*, 1993), a técnica da Reacção em Cadeia da Polimerase - PCR (*Polymerase Chain Reaction*) pode ser usada na amplificação do gene da proteína F das várias estirpes da doença (Seal *et al.*, 2000, Collins *et al.*, 1993). A técnica do PCR, quando antecedida duma transcrição reversa da fita simples do ácido ribonucléico (ARN) viral para síntese duma fita de ADN complementar (ADNc) (Stauber *et al.*, 1995), poderá amplificar pequenas quantidades de ácido desoxirribonucléico (ADN) (Errington *et al.*, 1995).

Porém, uma vez que não existe um protocolo-padrão óptimo para a aplicação da técnica de PCR, deve haver uma optimização dos diferentes parâmetros desta técnica, de modo a alcançarem-se melhores resultados na visualização das bandas de ADN amplificado em géis de agarose. A optimização da técnica varia desde a manipulação das diferentes temperaturas a dos diferentes componentes da mistura da reacção do PCR, garantindo a fidelidade, a especificidade e a síntese do produto desejado (Innis *et al.*, 1990).

A optimização da técnica de PCR visa a redução das quantidades de alguns reagentes, de forma a tentar torná-la menos dispendiosa sem que se perca a qualidade dos produtos amplificados.

2. Revisão bibliográfica

2.1. O vírus de Newcastle

A doença de Newcastle foi inicialmente identificada no ano de 1926, em Java e no mesmo ano alastrou-se para Inglaterra, concretamente para Newcastle, surgindo daí o seu nome (Fenner *et al.*, 1992, Seal *et al.*, 2000).

O vírus da doença de Newcastle também conhecido como *Paramyxovirus* aviário serotipo 1 é um membro da ordem Mononegavirales, da família *Paramyxoviridae*, sub-família *Paramyxovirinae*, género *Rubulavirus* (Murphy *et al.*, s/a, Aldous *et al.*, 2001). Este vírus apresenta um genoma que consiste numa molécula linear simples de ARN de sentido negativo, com 15 a 16 kb (Murphy *et al.*, s/a). O genoma viral codifica seis genes: 3'-NP-P-M-F-HN-L-5' (Gould *et al.*, 2000, Liang *et al.*, 2002), que codificam seis grandes proteínas, nomeadamente: nucleoproteína (NP); fosfoproteínas (P); proteína matrix (M); proteína de fusão (F); hemaglutinina-neuraminidase (HN); ARN polimerase ARN dependente (L) (Errington *et al.*, 1995, Peeters *et al.*, 2000, Ke *et al.*, 2001). São viriões com envelope de forma pleomórfica (podendo ocorrer em forma esférica e filamentosa), com 150 a 300 nm de diâmetro (Murphy *et al.*, s/a).

2.2. Patologia

A infecção viral tem início no momento em que as partículas infecciosas são produzidas (Aldous *et al.*, 2000) que ocorre, somente, quando a proteína F presente no envelope viral, é sintetizada como precursora Fo, que é clivada na forma activa funcional (Aldous *et al.*, 2000, Tiwari *et al.*, 2004) pelas proteases hospedeiras (Aldous *et al.*, 2000). A activação só ocorre a partir da libertação de peptídios que impedem a fusão entre a membrana viral e a membrana da célula hospedeira (Aldous *et al.*, 2000).

O nível de virulência pode ser diferenciado a partir do número básico de aminoácidos no sítio de clivagem da proteína de fusão (Seal *et al.*, 2000, Tiwari *et al.*, 2004). Dependendo da sua patogenicidade em galinhas, o vírus da doença de Newcastle (VDN) pode ser classificado em estirpes altamente virulenta (velogénica), estirpes com

virulência intermediária (mesogénica) ou estirpe avirulenta (lesogénica). Seguidamente explicam-se as formas de actuação de cada tipo de estirpe:

Lentogénia: causando uma leve ou inaparente infecção no tracto respiratório com pouca ou nenhuma mortalidade (Gohm *et al.*, 2000, Lee *et al.*, 2006).

Entérica lentogénica: forma mais leve do vírus. Infecta o aparato intestinal porém não resultando em nenhum sintoma clínico (Castro e Heuschele, 1992).

Mesogénia: é causada por sinais respiratórios e nervosos, apresenta uma taxa de mortalidade moderada (Gohm *et al.*, 2000, Lee *et al.*, 2006). Esta estirpe ataca na sua maioria as aves jovens (Fenner *et al.*, 1992).

Velogénia: quando a doença atinge altas taxas de mortalidade (Pham *et al.*, 2005). Neste nível, além das anomalias respiratórias, seguem-se severos sintomas neurológicos e hemorrágicos viscerais (Castro e Heuschele, 1992). Pode ser dividida em:

Velogénia viscetrópica: resulta em edemas do pescoço, cabeça, fortes sinais respiratórios e diarreia verde (Castro e Heuschele, 1992).

Velogénia neutrópica: aves que apresentam esta estirpe e sobrevivem mais de duas semanas podem desenvolver fortes sinais neurológicos indistinguíveis das causadas pela estirpe velogénia viscetrópica (Castro e Heuschele, 1992).

2.3. Sintomatologia

Segundo Murphy *et al.* (s/a), em galinhas os sistemas respiratório, nervoso, circulatório e gastrointestinal são os primeiros a manifestarem os sinais da infecção, sendo as manifestações clínicas dependentes da idade e do estado imunológico do hospedeiro, bem como da virulência e do tropismo da estirpe do vírus. Segundo OIE (2002), o período de incubação do vírus é de 4 a 6 dias. Normalmente, de acordo com Fenner e colaboradores (1992), os sintomas da doença são anorexia, subida de temperatura, apatia, secura da laringe e faringe; outros sintomas como sede anormal,

sonolência, fraqueza e falta de apetite (Murphy *et al.*, s/a), diarreia esverdeada e aguada, inchaços em torno dos olhos e do pescoço (OIE, 2002). Também ocorrem casos tosse, as asas tornam-se inclinadas, verifica-se arrastamento das pernas (OIE, 2002), torcicolos, desvio lateral da cabeça acompanhado de movimentos anormais como sobressaltos e até quedas (Biester e Schwarte, 1968). Ocorre uma redução na produção de ovos, sendo estes quando postos nesta fase pequenos, com casca branca e uma albumina aquosa (Fenner *et al.*, 1992) e de qualidade reduzida (Murphy *et al.*, s/a).

Segundo a OIE (2002), as aves atacadas pelo vírus de Newcastle podem apresentar algumas lesões como:

- edemas, hemorragia ou degeneração dos ovários;
- congestão e algumas vezes hemorragias da mucosa traqueal;
- aparecimento de pequenas equimoses na mucosa dos pro-ventrículos;
- edemas do tecido intersticial ou peri-traqueal do pescoço;
- edemas, hemorragias, necroses ou ulceração do tecido linfóide na mucosa da parede intestinal.

2.4. Patogênese

No geral, a replicação dos paramixovírus dá-se ao nível do citoplasma da célula hospedeira. A fixação do vírus é feita pela proteína hemaglutinante, onde posteriormente ocorre a fusão do invólucro viral com a membrana celular hospedeira pela acção do produto de clivagem. Dado que o genoma do vírus de Newcastle apresenta uma fita simples de ARN, a transcrição do ARN-mensageiro ocorre por intermédio da ARN-polimerase viral. As proteínas virais são sintetizadas no citoplasma e as glicoproteínas virais são sintetizadas e glicolisadas na via secretora (Brooks, *et al.*, 1998).

A replicação do vírus ocorre inicialmente no epitélio da mucosa do tracto digestivo e respiratório superior do hospedeiro, difundindo-se, em seguida, através da via circulatória, pelo baço e pela medula óssea, produzindo deste modo a virémia secundária (Fenner *et al.*, 1992). A partir deste momento, dá-se a infecção de órgãos como o pulmão,

o intestino e o sistema nervoso central. Os transtornos respiratórios resultam da congestão dos pulmões e da lesão do centro respiratório cerebral (Murphy *et al.*, s/a).

2.5. Diagnóstico

Tal como toda e qualquer outra doença, a doença causada pelo vírus de Newcastle também requer algumas técnicas no seu diagnóstico e para tal é necessário o seu isolamento.

O vírus pode ser isolado do baço, cérebro, pulmões pela inoculação em ovos embrionados de 10 dias, devendo ser diferenciado de outros vírus pelas técnicas de inibição de hemaglutinação e hemadsorção (Fenner *et al.*, 1992).

Para casos de identificação de grupos antigénos, actualmente são usados anticorpos monoclonais que correspondem a anticorpos altamente específicos produzidos por células clonadas (células híbridomas) especificadamente seleccionadas, obtidas pela fusão entre as células do mieloma e os linfócitos B produtores de anticorpos (Murphy *et al.*, s/a). Contudo, a tipificação do vírus a nível de patotipo usando esta técnica é bastante trabalhosa (Seal *et al.*, 1995, 2000).

Testes serológicos já foram desenvolvidos para o diagnóstico da DV sendo estes comumente usados no seu diagnóstico. Dentre os testes serológicos usados podem ser mencionados os testes de precipitação em gel de agar (Mishra *et al.*, 2000), teste de neutralização (Charan *et al.*, 1981, Mishra *et al.*, 2000), teste de hemaglutinação (Roy e Venugopalan, 1999), teste de Inibição de Hemaglutinação (IH) e teste ELISA, sendo os dois últimos citados como os mais usados dentre os testes serológicos (OIE, 2004).

Foram também desenvolvidos alguns testes moleculares, como sondas dos oligonucleotidos e análises do genoma do ARN viral, para diferenciação e identificação das diferentes estirpes, porém com pouco sucesso (Seal *et al.*, 1995, 2000).

A técnica da PCR é a técnica molecular mais usada no diagnóstico de doenças infecciosas (Katarina *et al.*, 2002). Para a identificação dos patotipos do vírus foram desenvolvidos diferentes formas de PCR, entre elas: PCR acoplada a digestão com enzimas de restrição, ao sequenciamento, a *Reverse Transcription* - PCR (RT-PCR) acoplada com a técnica de detecção ELISA (Lee *et al.*, 2006).

2.5.1. Testes serológicos

De acordo com Murphy e colaboradores (s/a), os testes serológicos são testes de detecção e quantificação de anticorpos e antígenos, sendo válidos somente na presença de anticorpos, anticorpos estes que são produzidos em poucos dias, ou semanas, após a infecção. No diagnóstico para a detecção de anticorpos contra a presença do VDN, os testes serológicos de Inibição de Hemaglutinação (IHA) e ELISA (OIE, 2004) são comumente usados em programas de vacinação avícola (Errington *et al.*, 1995).

Teste de Inibição de hemaglutinação (IHA):

A hemaglutinação é um processo no qual as hémaceas sofrem aglutinação. No caso dos vírus, este processo pode ser mediado por proteínas virais ligadas (Murphy *et al.*, s/a). Na inibição de hemaglutinação os anticorpos podem inibir vírus mediadores de hemaglutinação (HA) bloqueando os antígenos na superfície dos viriões responsáveis pela HA. O teste IHA inicia pela destruição de HA não específicas do soro e mede somente os anticorpos que se ligam directamente à hemaglutinina viral (Fenner *et al.*, 1974).

Segundo Xu e colaboradores (1997), o teste de IHA é considerado o método serológico convencional mais usado no diagnóstico da DN e também descrito como teste padrão para o seu diagnóstico. Ainda de acordo com os mesmos autores comparando com o teste ELISA, o teste IHA é mais informativo na determinação de titulações protectoras contra o vírus em causa.

Apesar da sua rapidez, simplicidade e o baixo custo (Murphy *et al.*, s/a), Kho e colaboradores (2000) apontam algumas desvantagens que o teste IHA apresenta como a baixa sensibilidade, e, de acordo com Sousa e colaboradores (2000), alta incidência de resultados falsos positivos, no soro de algumas galinhas tornando-o pouco fiável. Daí a necessidade do uso de técnicas adicionais, como o ELISA (Xu *et al.*, 1997, Roy e Venugopalan, 1999).

Ensaio de Imunoadsorção Enzimática (Enzyme-Linked Immunoassays) ELISA:

Segundo Murphy e colaboradores (s/a), o teste ELISA é um dos pioneiros no diagnóstico serológico. Este é um teste que pela presença de anticorpos específicos indica a presença de agentes infectantes e tem a capacidade de medir anticorpos e antígenos virais (Hirsh e Zee, 2002). O teste ELISA pode ser usado de diferentes formas dependendo do tipo de amostra e do objectivo final. Deste modo, para o melhoramento doutras técnicas de diagnóstico, foram desenvolvidas o *dot*-ELISA que pode ser usado em amostras de tecidos de galinhas, embriões e fluido alantóico como forma de despistar os resultados falsos-negativos causados pela falta de sensibilidade de teste como os testes de hemaglutinação e IHA aquando da fraca titulação destes. O *dot*-ELISA tem a vantagem de ser mais sensível, mais rápido e poder processar maior número de amostras (Roy e Venugopalan, 1999).

O ELISA indirecto é outro teste usado no sero-diagnóstico deste vírus aviário porém, apesar da sua alta sensibilidade, fácil optimização e a falta de necessidade de um pré-tratamento das amostras de soro, este teste não é aplicável na testagem de alguns soros de sistema único a não ser que as espécies conjugadas contra esses soros sejam usadas em substituição dum conjugado anti-aviário (Sousa *et al.*, 2000).

O teste ELISA tem a capacidade de detectar menores quantidades de anticorpos no soro em relação ao teste IHA, podendo assim, ser usado como teste complementar no diagnóstico da doença de Newcastle (Mishra *et al.*, 2000).

Apesar de rápido, sensível e de simples execução (Lima e Mota, 2003), a falta de reacções específicas em soros de galinhas (Kho *et al.*, 2000) bem como a dificuldade na produção e manutenção das células hibridomas em alguns laboratórios (Sousa *et al.*, 2000) são factores que tornam o teste ELISA pouco aconselhável em caso de diagnóstico para testes específicos.

2.5.2. Testes moleculares

PCR: Reacção em Cadeia da Polimerase (Polymerase Chain Reaction):

Com o avanço da biotecnologia, foram desenvolvidas técnicas para o melhoramento da detecção deste vírus dum modo rápido e eficaz (Aldous *et al.*, 2001). A Reacção em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma técnica que permite a amplificação enzimática *in vitro* de pequenas quantidades de ADN (Lima e Mota, 2003) que pode ser usada no diagnóstico laboratorial (Stäuber *et al.*, 1995, OIE, 2004). Uma vez que o vírus de Newcastle contém uma fita simples de ARN é necessário criar uma molécula de ADN complementar, por transcrição reversa da fita simples de ARN de forma a se detectar o ARN viral (Stäuber *et al.*, 1995). Esta transcrição reversa pode ser feita pela técnica de *SuperScriptTM III*.

A técnica da PCR pode ser uma grande aposta no que diz respeito ao diagnóstico desta doença, por apresentar alta sensibilidade, especificidade (Lima e Mota, 2003) e, ao contrário dos testes serológicos que necessitam amostras recém-colectadas ou amostras com hemácias vivas (Manson e Mutsvangwa, 2003), esta técnica pode utilizar qualquer tipo de amostras, desde que esteja bem conservada (Darbre, 1999).

2.6. O principio da técnica de PCR

O ciclo de amplificação em cadeia é constituído por três etapas, nomeadamente: a desnaturação em que ocorre a separação das duas fitas da hélice dupla do ADN-alvo pelo calor, cujas temperaturas podem variar entre 90 a 95°C (Lima e Mota, 2003); o pareamento dos *primers* por ligações de hidrogénio ao ADN-alvo de cadeia simples. Este pareamento só é possível com a redução da temperatura entre 50° a 70°C (Lodish *et al.*, 2000, Lima e Mota, 2003). A última etapa do ciclo é a extensão dos *primers* que corresponde à síntese das cadeias complementares da cada fita molde, por acção da *Taq polimerase* (Griffiths *et al.*, 1996, Latchman, 1997, Pelczar *et al.*, 1997). Esta enzima faz a extensão de cada *primer* a partir da sua extremidade 3' pela polimerização dos dNTP's,

gerando novas fitas complementares que são sintetizadas na direcção 5' → 3', a partir da fita molde 3' → 5' do fragmento a ser amplificado (Lodish *et al.*, 2000).

No final do terceiro passo, o ciclo reinicia-se, podendo ser repetido várias vezes (25 – 30 ciclos), para permitir o aumento exponencial do número de cópias da sequência de ADN-alvo, e consequentemente a concentração do ADN pré-existente (Lima e Mota, 2003).

Experimentalmente, cerca de trinta ciclos de amplificação proporcionam uma quantidade de ADN suficiente para uma análise directa do segmento amplificado sem haver necessidade de se utilizarem sondas.

O produto de PCR pode ser visualizado após electroforese em gel de agarose e o seu tamanho pode ser estimado por comparação com padrões lineares de ADN (Lima e Mota, 2003).

2.7. Optimização da técnica de PCR

Segundo Innis e seus colaboradores (1990), a não detecção ou baixa quantidade dos produtos amplificados; a presença de bandas não-específicas pela não-extensão dos *primers*; a formação de “dímeros” que competem na amplificação com o produto desejado e as mutações ou heterogenia devido a desincorporação, são problemas que podem ser evitados pela manipulação dos parâmetros da PCR. A optimização das concentrações da enzima, dos dNTPs, do magnésio (Mg), dos *primers* e de outros componentes, bem como das diferentes temperaturas de desnaturação, hibridação (pareamento ou re-associação) e extensão, varia de acordo com o tipo de produto a amplificar (Innis *et al.*, 1990).

A concentração da enzima *Taq polimerase* determina a qualidade do produto amplificado e consequentemente a visualização durante a electroforese em gel. Baixa concentração da enzima resulta na insuficiência do produto amplificado enquanto o excesso pode conduzir ao acúmulo de grandes quantidades de produtos não-específicos. Daí que, para a optimização da técnica de PCR, recomenda-se uma variação da concentração enzimática entre 0.5 a 5 unidades/100 µl (Innis *et al.*, 1990).

Os dNTPs numa concentração entre 20 e 200 μM dão um óptimo balanço na síntese do produto amplificado, fidelidade e especificidade. Os quatro dNTPs devem ser usados em igual, e baixa concentração, reduzindo a possibilidade da extensão de nucleotídeos desincorporados (Innis *et al.*, 1990).

A reacção de polimerização tem lugar na presença de Mg^{2+} , o qual é indispensável ao processo uma vez que estes iões são os catalizadores da reacção (Lima e Mota, 2003). A concentração óptima de Mg^{2+} varia de acordo com a concentração dos dNTPs, isto é, para cada concentração total de dNTPs, o PCR deve conter 0.5-2.5 mM de Mg. A concentração de Mg afecta características como: a fidelidade do processo, a actividade enzimática, a especificidade do produto, a hibridação dos *primers*, etc (Innis *et al.*, 1990).

A quantidade de "buffer" recomendada para o PCR varia de 10 a 50 mM de Tris-HCl (pH 8.3-8.8 quando medido a 20°C) (Innis *et al.*, 1990).

A albumina do soro bovino (BSA) pode ajudar na estabilização enzimática, contudo, a sua adição pode ser dispensada em alguns protocolos (Innis *et al.*, 1990).

São necessários poucos segundos para que o ADN desnature, porém, se a desnaturação for incompleta, as fitas de ADN podem se reunir e a quantidade de produto amplificado pode ser reduzido. As condições típicas de desnaturação são de 95°C, durante 30 segundos, ou 97°C durante 15 segundos, contudo, as altas temperaturas podem ser favoráveis, especialmente para amostras cuja concentração é alta em G-C (Innis *et al.*, 1990).

A composição em nucleotídeos, o comprimento e a concentração dos *primers* determinam a temperatura e o tempo necessário para a hibridação. O aumento da temperatura de hibridação possibilita a correcta hibridação dos *primers* e aumenta a extensão dos nucleotídeos correctos na terminal 3' dos mesmos. Assim, a elevação das temperaturas de hibridação, durante os ciclos iniciais, pode aumentar a especificidade do produto (Innis *et al.*, 1990). A concentração e comprimento das sequências-alvo e a temperatura são factores determinantes para o tempo de extensão dos iniciadores. Para a extensão dos *primers* a temperatura de 72°C é a ideal. Para produtos com comprimento superior a 2 kb, um minuto é suficiente para a sua extensão a 72°C. Porém, se a concentração do substrato for baixa nos ciclos iniciais e se a concentração do produto

exceder a concentração das enzimas (1 nM), o aumento do tempo de extensão pode ser favorável (Innis *et al.*, 1990).

O número óptimo de ciclos depende, principalmente, da concentração inicial do ADN-alvo quando todos os outros parâmetros estão otimizados. A optimização do número de ciclos encontra-se entre os 25 e 40, dado que números inferiores podem culminar em baixa quantidade de produto amplificado e números superiores aumentam a complexidade e a quantidade de produtos não específicos (Innis *et al.*, 1990).

Concentrações entre 0.1 e 0.5 μM dos *primers* são ideais para a manipulação do PCR. Uma alta concentração de *primers* conduz à acumulação de produtos amplificados não específicos (Innis *et al.*, 1990, Lima e Mota, 2003). Produtos não específicos, e dímeros de *primers*, podem tornar-se substratos da PCR, competindo assim, com os produtos desejados para as enzimas, para os *primers* e dNTPs, o que fará com que haja baixa produção do produto amplificado desejado (Innis *et al.*, 1990).

3. Objectivos

3.1. Objectivo geral

- Optimização da técnica de PCR para o diagnóstico da doença de Newcastle.

3.2. Objectivo específico

- Amplificar o gene F, do genoma do vírus de Newcastle, pela técnica de PCR de modo a se alcançar um produto 550 pb na segunda amplificação.

4. Local de realização do estudo

O presente trabalho foi realizado no laboratório do Centro de Biotecnologia da Universidade Eduardo Mondlane (CB-UEM), localizado na Faculdade de Veterinária, na Av. de Moçambique km 1,5.

5. Material e métodos

5.1. Material

Foram usadas 8 amostras, das quais 5 correspondiam ao líquido amniótico de ovos embrionados de galinha, inoculados com vírus de Newcastle e incubados durante 11 dias para desenvolvimento do vírus, e as restantes 3 eram amostras de vacinas. Sendo elas:

- Amostras do líquido amniótico: 450, RB, 452, 504 e 507;
- Vacinas: 7.10, 12.9 e Iz.

5.1.1. Extração do ARN total pelo Método TRIZOL

Líquido amiótico
Reagente TRIZOL
Clorofórmio
DEPC-ddH₂O
Centrífuga refrigerada "ALC 4239R"
Isopropanol
Etanol a 75%
Vortex
Centrífuga
Tubos de microcentrífuga
Suportes de tubos de microcentrífuga
Pipetas P1000, P200 e P20
Pontas para pipetas de P1000, P200 e P20
Luvas

5.1.2. Síntese de ADN complementar usando SuperScriptTM III para RT-PCR (Reverse Transcriptase-PCR)

5.1.2.1. Tratamento com DNase

Eppendorfs de 0.5 ml
Amostras de ARN
Água DEPC
10 x DNase I buffer
DNase I, Amp grade, 1U/ μ l
25 mM de EDTA
Forno de hibridação "Ecogen"
Pipetas 10, 2 μ l

Pontas para pipetas 10, 2 μ l

5.1.2.2. Síntese de ADN complementar

ARN total

Oligo (dt) 20 (50 μ M)

10 mM dNTP Mix

Forno de hibridação "Ecogen"

Centrífuga "Eppendorf: Centrifuge 5415D"

5X First-Strand buffer

0,1 M DTT

Rnase OUTTM (40 units/ μ l)

SuperScriptTM III RT (200 units/ μ l) (*Transcriptase reversa*)

Pipetas 20, 10, 2 μ l

Pontas pipetas 20, 10, 2 μ l

5.1.3. Amplificação do gene F do vírus da doença de Newcastle

- *Mistura da reacção PCR I*

ddH₂O

10x PCR "buffer" (Perkin-Elmer)

BSA (1 mg/ml)

dNTPs (mistura a 10 mM)

Primer NDV1F (10 pmole/ μ l)

Primer NDV2R (10 pmole/ μ l)

MgCl₂ (50 mM)

Taq ADN polymerase (5U/ μ l)

ADNc

Mistura da reacção PCR II

ddH₂O

10x PCR "buffer" (Perkin-Elmer)

BSA (1 mg/ml)

dNTPs (mistura a 10 mM)

Primer NDV3F (10 pmole/ μ l)

Primer NDV4R (10 pmole/ μ l)

MgCl₂ (50 mM)

Taq ADN polymerase (5U/ μ l)

ADN

5.1.4. Electroforese e detecção dos produtos amplificados

Proveta

Agarose

Brometo de etídio

TBE 1X

Tampão de carregamento

Cloreto de sódio

Equipamento de electroforese "BIO RAD"

Transiluminador

5.2. Metodologia

Foi preparada a água DEPC usando o protocolo descrito no anexo 2.

O ARN foi extraído de acordo com o Método de TRIZOL (ver anexo 3).

Após a extração do ARN total, foi sintetizado o ADNc pelos métodos descritos no anexo 4.

Uma vez que a transcrição reversa foi efectuada, houve a formação ADNc das amostras obtidas, que foi sujeito a duas amplificações (PCR I e II). O PCR I, feito pela mistura dos reagentes da tabela 1, amplificou, sob as condições abaixo descritas na tabela 2, somente as fitas de ADNc. Os produtos da PCR I foram usados como amostras de ADN na segunda amplificação, PCR II, após a mistura dos reagentes da tabela 3, e sujeitos às condições abaixo descritas na tabela 4, de modo a aumentar a especificidade e qualidade da amplificação. As misturas de reagentes apresentadas nas tabela 1 e 3 correspondem as misturas padrão. Serão alguns destes reagentes que irão ser manipulados para a optimização do PCR II.

Tabela 1: Tabela de componentes para a mistura da reacção de PCR I padrão.

Componentes	Stock	Concentração final	Volume por reacção
ddH ₂ O			24 µl
PCR buffer	10 X	1 X	5 µl
MgCl ₂	50 mM	2,5 mM	2,5 µl
dNTPs	10 mM	0,2 mM	1 µl
Primer NDV1F	10 pmol/µl	0,3 pmol/µl	1,5 µl
Primer NDV2R	10 pmol/µl	0,3 pmol/µl	1,5 µl
BSA	1 mg/ml	0,1 mg/ml	5 µl
<i>Taq</i> ADN polymerase	5U/µl	0,5 U/µl	2 µl
ADNc			2 µl
Volume total			50 µl

Tabela 2: Tabela das condições do PCR I.

Etapa	Temperatura	Tempo	Nº de ciclos
Etapa 1	95°C	2 minutos	
Etapa 2	94°C	45 segundos	5 ciclos
	55°C	30 segundos	
	72°C	2 minutos	
Etapa 3	94°C	45 segundos	30 ciclos
	48°C	1 minuto	
	72°C	2 minutos	
Etapa 4	72°C	7 minutos	
Etapa 5	4°C	∞	

Tabela 3: Tabela de componentes para a mistura da reacção de PCR II padrão.

Componentes	Stock	Concentração final	Volume por reacção
ddH ₂ O			27 µl
PCR buffer	10 X	1 X	5 µl
MgCl ₂	50 mM	2,5 mM	2,5 µl
dNTPs	10 mM	0,2 mM	1 µl
Primer NDV1F	10 pmol/µl	0,3 pmol/µl	1,5 µl
Primer NDV2R	10 pmol/µl	0,3 pmol/µl	1,5 µl
BSA	1 mg/ml	0,1 mg/ml	5 µl
<i>Taq</i> ADN polymerase	5U/µl	0,2 U/µl	2 µl
ADNc			2 µl
Volume total			50 µl

Tabela 4: Tabela das condições do PCR II.

Etapa	Temperatura	Tempo	Nº de ciclos
Etapa 1	95°C	2 minutos	
Etapa 2	94°C	45 segundos	5 ciclos
	55°C	30 segundos	
	72°C	1 minutos	
Etapa 3	94°C	50 segundos	30 ciclos
	50°C	1 minuto	
	72°C	1 minutos	
Etapa 4	72°C	7 minutos	
Etapa 5	4°C	∞	

5.2.1. Electroforese e detecção dos produtos amplificados

A detecção dos produtos de amplificação foi feita através de electroforese em géis de agarose a 1%. O gel foi preparado em Tris Borato EDTA (TBE) 1X (preparado de acordo com o protocolo no anexo 2) corado com brometo de etídio ($5 \cdot 10^{-4}$ mg/ml). Foram usados 0,5 μ l do marcador de peso molecular para a comparação com as bandas do produto amplificado no gel, diluídos em 4,5 μ l de cloreto de sódio (NaCl) e 2 μ l de tampão de carregamento.

Foram utilizadas aliquotas de 10 μ l de produto amplificado do PCR II, as quais foram misturadas com 2 μ l tampão de carregamento, inoculadas no gel e submetidas a corrida electroforética durante 45 minutos a 100V.

Após a corrida das amostras nos géis, as bandas de ADN foram visualizadas com a ajuda de um transiluminador a luz ultravioleta.

Após a corrida no gel dos produtos do primeiro PCR II, foram seleccionadas as amostras cujas bandas apresentaram melhor visibilidade, mostrando uma boa concentração de ADN amplificado, para o seu posterior uso na manipulação dos reagentes para a optimização da PCR.

5.2.2. Optimização da técnica de PCR

Para a optimização da técnica de PCR, para o diagnóstico do doença de Newcastle, foi manipulada a concentração da *Taq polimerase* e do $MgCl_2$ do PCR II, de acordo com as condições da tabela 5.

Tabela 5: Condições de manipulação dos parâmetros de optimização.

Parâmetros manipulados (PCR II)	
Concentração da <i>Taq polimerase</i>	Concentração do $MgCl_2$
	0,5 mM (0,5 μ l)
0,025 U/ μ l (0,25 μ l)	0,75 mM (0,75 μ l)
	1 mM (1 μ l)
0,05 U/ μ l (0,5 μ l)	2 mM (2 μ l)
	2,25 mM (2,25 μ l)

6. Resultados

6.1. Resultados das amostras do PCR II padrão

O ARN extraído foi ressuspenso em 10 μ l de água DEPC. Sendo que dos 10 μ l tiraram-se 5 μ l que foram diluídos em 3 μ l de água bidestilada para a síntese do ADN complementar, perfazendo o volume total de 11 μ l. Deste volume foi tirado 5 μ l para o PCR I, do qual, do seu produto amplificado, foram retirados 2 μ l para o PCR II.

As figuras 1, 2, 3, 4, 5 e 6 abaixo, apresentam os resultados da reacção padrão bem como das reacções optimizadas do PCR II de acordo com as condições já citadas (anexo 4). Todas as amostras amplificadas apresentaram bandas com \pm 550 pb.

Os poços dos géis das figuras acima mencionadas foram enumerados da esquerda à direita de acordo com o número de poços existentes.

Os géis da figura 1 representam os resultados do PCR II sem qualquer manipulação dos reagentes.

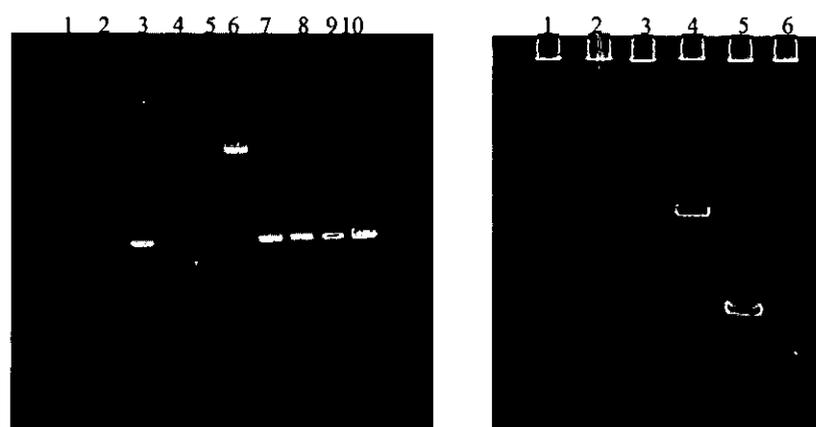


Fig. 1: Produtos do PCR II padrão após a corrida electroforética em gel da agarose 1%. Gel à esquerda: Poço 1 a 2, amostra 504; poço 3 a 4, amostra 507; poço 5, amostra 12.9, poço 6, marcador molecular; poço 7, amostra 1z; poço 8, amostra 7.10; poço 9 amostra 12.9, poço 10 amostra 1z. Gel à direita: Poço 2, amostra 450; poço 3, amostra RB; poço 4, marcador de 100 pb; poço 5, amostra 452.

O gel à esquerda representa a um gel de 10 poços no qual o marcador molecular foi colocado no poço 6 e as amostras nos poços 1 a 5 e 7 a 10.

Os poços 1 a 4 apresentam os produtos das alíquotas das amostras de campo, sendo que as alíquotas da amostra de campo 504 (nos poços 1 e 2) não sofreram nenhuma amplificação, dado que não apresentam bandas no gel; mas, as alíquotas da amostra do campo 507 (nos poços 3 e 4) foram amplificadas tendo, porém, a alíquota da amostra do poço 4 uma banda ténue.

Os poços 5, 7, 8, 9 e 10 apresentam as amostras de vacinas. Nas alíquotas da amostra 12.9 (nos poços 5 e 9), a amostra presente no poço 5 não foi amplificada enquanto que no poço 9 a amostra foi amplificada. Todas as alíquotas da amostra Iz (nos poços 7 e 10) foram amplificadas e o poço 8 com a amostra 7.10 mostrou amplificação da respectiva alíquota.

O gel à direita apresenta um gel de 6 poços onde marcador molecular foi colocado no poço 4 e as amostras de campo nos poços 2, 3 e 5.

O poço 2 apresenta amplificação da amostra 450 com uma banda ténue. O poço 3 apresenta a amostra RB também amplificada, com uma banda mais visível que a banda da amostra 450. A amostra 452 (poço 5) apresenta um produto amplificado com a banda mais visível em relação às restantes amostras.

6.2. Optimização do PCR II pela variação da concentração *Taq* polimerase a 0,025 e 0,05 U/ μ l (0,25 e 0,5 μ l)

A figura 2 representa um gel de 20 poços no qual o marcador de molecular foi colocado no poço 9 e as amostras nos poços 2 a 8 e 10 a 17, onde a concentração *Taq* polimerase nas amostras, variou a 0,025 e 0,05 U/ μ l (0,25 e 0,5 μ l). Os poços 1, 18, 19 e 20 não foram colocados.

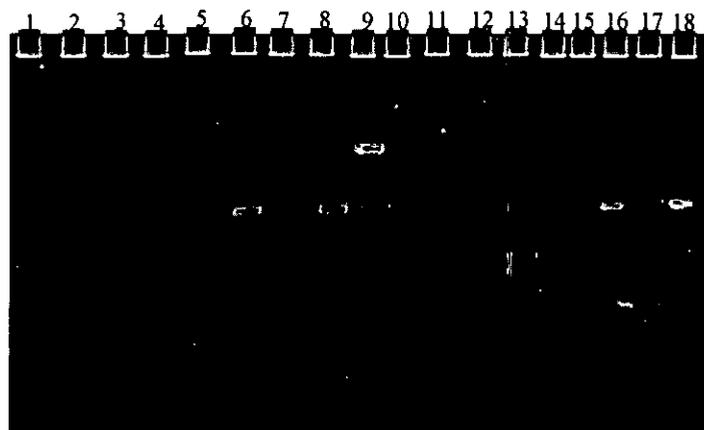


Fig. 2: Produtos do PCR II com variação da concentração da *Taq polimerase* a 0,025 e 0,05 U/ μ l (0,25 e 0,5 μ l) após a corrida electroforética em gel da agarose 1%. Variação da concentração da *Taq polimerase* a 0,025 U/ μ l (0,25 μ l): Poço 1, amostra 450; poço 2, amostra 452; poço 3, amostra 504; poço 4, amostra 507; poço 5 amostra 7.10; poço 6, amostras 12.9; poço 7, amostra Iz. Poço 8, marcador molecular. Variação da concentração da *Taq polimerase* a 0,05 U/ μ l (0,5 μ l): Poço 9, amostra 450; poço 10, amostra RB; poço 11, amostra 452; poço 12, amostra 504; poço 13, amostra 507; poço 14 amostra 7.10; poço 15, amostras 12.9; poço 16, amostra Iz.

As amostras cuja variação da concentração enzima *Taq polimerase* a 0,025 U/ μ l (0,25 μ l) durante a mistura do PCR II foram carregadas nos poços 2 a 8. Os produtos das amostras de campo foram colocados nos poços 2 a 5 e o das amostras de vacina nos poços 6 a 8.

Os produtos das amostras de campo 450, 452, 504 e 507 nos poços 2, 3, 4 e 5 respectivamente, não foram amplificados, pois, não apresentaram banda no gel.

O gel mostra a amplificação dos produtos das amostras de vacina 7.10, 12.9 e Iz (poços 6, 7 e 8 respectivamente), onde a amostra de vacina 12.9 (poço 7) apresenta uma banda ténue.

Nos poços de 10 a 16 foram colocados os produtos das amostras cuja variação da concentração enzima *Taq polimerase* a 0,05 U/ μ l (0,5 μ l) durante a mistura do PCR II, onde os produtos das amostras de campo ocuparam os poços 10 a 14 e das amostras de vacina os poços 15 a 17.

As amostras de campo 450, RB e 504 (poços 10, 11 e 13 respectivamente) não foram amplificadas, não apresentando nenhuma banda. Enquanto que as amostras de campo 452

e 507 nos poços 12 e 14 respectivamente, mostram amplificação porém com bandas ténues.

As amostras das vacinas 7.10, 12.9 e Iz carregadas nos poços 14, 15 e 16 respectivamente, foram amplificadas, porém com a amostra 12.9 apresentando uma banda ténue.

As bandas das amostras das vacinas cuja variação da concentração enzima *Taq polimerase* a 0,05 U/ μ l (0,5 μ l) durante a mistura do PCR II apresentaram-se mais visíveis em relação a variação da concentração enzima *Taq polimerase* a 0,025 U/ μ l (volume 0,25 μ l).

6.3. Optimização do PCR II pela variação do $MgCl_2$, com a *Taq polimerase* optimizada a 0,05 U/ μ l (0,5 μ l)

6.3.1. Variação do $MgCl_2$ a 0,075 mM (0,75 μ l)

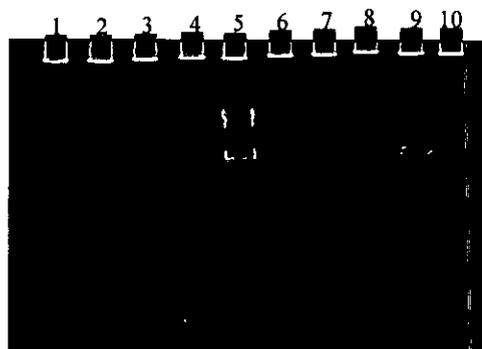


Fig. 3: Gel de agarose com produtos de PCR II com a concentração da *Taq polimerase* optimizada a 0,05 U/ μ l (0,5 μ l) e variação da concentração do $MgCl_2$ a 0,75 mM (0,75 μ l). Poço 2, amostra 450; poço 3, amostra 452; poço 4, amostra 504; poço 5, marcador de molecular; poço 6, amostra 507, poço 7, amostra 7.10; poço 8, 12.9; poço 9, amostra Iz.

A figura 3 representa um gel de 10 poços, cujo marcador molecular foi colocado no poço 5; as amostras de campo nos poços 2, 3, 4 e 6 e de vacinas nos poços 7 a 9, cuja concentração de $MgCl_2$ foi de 0,075 mM (0,75 μ l).

O gel da fig. 3 mostrou a não amplificação das amostras de campo 450, 452, 504 e 507, nos respectivos poços 2, 3, 4 e 6.

6.3.2. Variação do $MgCl_2$ a 1 mM (1 μ l)

A figura 4 representa um gel de 10 poços, cujo marcador molecular foi colocado no poço 5; as amostras de campo nos poços 2, 3, 4 e 6 e, nos poços 7 a 9 amostras de vacina. As amostras apresentam variação do $MgCl_2$ a 1 mM (1 μ l).

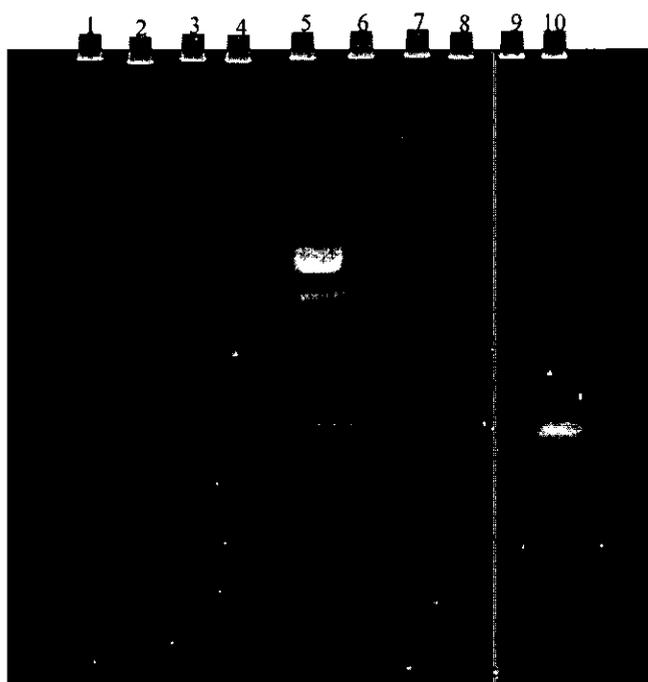


Fig. 4: Gel de agarose com produtos de PCR II com a concentração da *Taq polimerase* otimizada a 0,05 U/ μ l (0,5 μ l) e variação da concentração do $MgCl_2$ a 1 mM (1 μ l). Poço 2, amostra 450; poço 3, amostra 452; poço 4, amostra 504; poço 5, marcador molecular; poço 6, amostra 507, poço 7, amostra 7.10; poço 8, 12.9; poço 9, amostra Iz.

O gel da fig. 4 apresenta a não amplificação das amostras de campo 450, 452, 504 e 507, poços 2, 3, 4 e 6, respectivamente e, amplificação das amostras das vacinas 7.10, 12.9 e Iz, nos poços 7, 8 e 9 respectivamente.

As bandas presentes devido à amplificação das amostras de vacinas com variação do $MgCl_2$ a 1 mM (1 μ l) (fig. 4) foram mais visíveis em relação as bandas das amostras com variação do $MgCl_2$ a 0,75 mM (0,75 μ l) (fig. 3).

6.3.3. Variação do $MgCl_2$ em 2 mM (2 μ l)

O gel da figura 5 apresenta 6 poços onde o marcador molecular foi colocado no poço 4 e as amostras de campo nos poços 3 e 5.

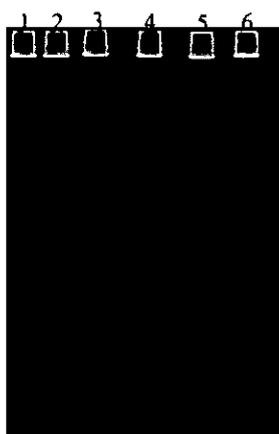


Fig. 5: Gel de agarose com produtos de PCR II com a concentração da *Taq polimerase* otimizada em 0,05 U/ μ l (0,5 μ l) e variação da concentração do $MgCl_2$ a 2 mM (2 μ l). Poço 3, amostra 452; poço 4, marcador molecular; poço 5; amostra 507.

A figura 5 apresenta o resultado das amostras de campo 452 (poço 3) amplificada e 507 (poço 5) não amplificada.

6.3.4. Variação do $MgCl_2$ a 2,25 mM (2,25 μ l)

A figura 6 representa um gel, com produtos de amostras de campo, cuja concentração do $MgCl_2$ foi de 2,25 μ l.

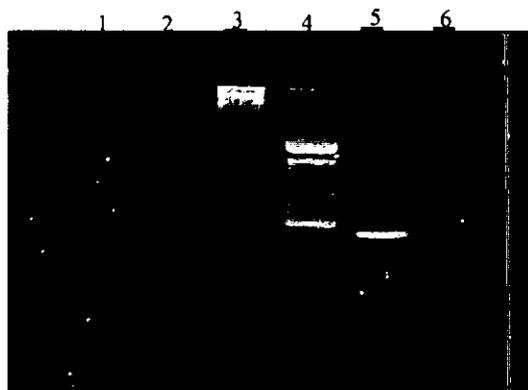


Fig. 6: Gel de agarose com produtos de PCR II com a concentração da *Taq polimerase* otimizada em 0,05 U/ μ l (0,5 μ l) e variação da concentração do $MgCl_2$ a 2,25 mM (2,25 μ l). Poço 1, amostra 507; poço 3, amostra RB; poço 4, marcador molecular; poço 5; amostra 452, poço 6, amostra 507.

O gel em 6 poços da figura 6, com marcador molecular colocado no poço 4 e as amostras nos poços 2, 3, 5 e 6, apresenta a não amplificação das amostras 450 e RB (poços 2 e 3 respectivamente) e amplificação das amostras 452 (poço 5) e 507 com banda ténue (poço 6).

7. Discussão

Em Moçambique as técnicas de diagnóstico baseiam-se no isolamento do vírus em ovos embrionados e na detecção de anticorpos pelas técnicas serológicas IHA e ELISA.

O PCR é uma técnica usada no diagnóstico de doenças virais (Murphy *et al.*, *s/a*). Actualmente em Moçambique não é usado como técnica rotineira para o diagnóstico desta doença.

Neste estudo usou-se o PCR padrão para a detecção do VDN, no qual foram usadas 5 amostras de campo e 3 amostras de vacinas, em que somente uma das amostras de campo não foi amplificada.

Segundo Innis e seus colaboradores a boa visualização das bandas das amostras no gel de agarose indica amplificação do produto durante o PCR II. De acordo com estes autores e tendo em consideração a amostra 507 (fig. 1, poço 3 do gel à esquerda) pode-se considerar que se conseguiu um bom resultado da amplificação do produto. Ainda de acordo com os mesmos autores, a presença de bandas ténues podem ser resultado de pouca quantidade de ADN amplificado durante a reacção do PCR II, como se verificou na amostra 450 (fig 2, poço 2 gel à direita).

A ausência de bandas no gel de agarose indica a não amplificação do ADN durante a reacção de PCR II. Este facto pode ser explicado, segundo Darbre (1999), pela má conservação da fonte de ARN em temperaturas acima de -20°C , bem como a contaminação com ADN; ou ainda, citando Katarina e seus colaboradores, pode dever-se a má conservação da própria amostra de ARN após a extracção. Estes factores podem ter contribuído para os resultados negativos da amostra de campo 504 em todos resultados.

Apesar dos resultados positivos durante amplificação do PCR II padrão, para a redução de custos da técnica, tentou-se otimizar de forma a diminuir as quantidades dos reagentes utilizados.

Durante a variação da concentração da enzima *Taq polimerase* a $0,05\text{ U}/\mu\text{l}$, notou-se que das 8 amostras carregadas, 5 amostras foram amplificadas, das quais 2 amostras de campo. Enquanto que na concentração da *Taq polimerase* a $0,025\text{ U}/\mu\text{l}$ das 7 amostras

carregadas somente 3 amostras de vacinas foram amplificadas. Estes resultados mostram a influência da concentração da *Taq polimerase* no processo de amplificação do ADN, quanto menor for a concentração de *Taq polimerase* menor é a quantidade de ADN amplificado.

Durante a experiência, foi usada a *Taq polimerase* a 0,05 U/ μ l na variação da concentração do MgCl₂. Pela variação da concentração do MgCl₂ a 0,75; 1; 2 e 2,25 mM notou-se uma proporcionalidade directa entre o aumento da concentração do MgCl₂ e o número de amostras amplificadas, o que se verificou com as amostras de campo 452 e 507 durante os ensaios da experiência.

8. Conclusões

Dos resultados obtidos deste trabalho conclui-se que:

O PCR II padrão mostrou-se mais eficaz para o diagnóstico da doença de Newcastle, uma vez que amplificou as amostras do campo, excepto a 504, e as amostras de vacinas.

No estudo da optimização desta técnica constatou-se que as amostras de campo são mais sensíveis às manipulações das condições de PCR, comparativamente com as de vacinas.

A variação da concentração da *Taq polimerase* para 0,05U/ μ l (0,5 μ l) e do MgCl₂ para 2,25 mM (2,25 μ l) podem ser consideradas aceitáveis, dependendo da quantidade de ARN viral das amostras.

9. Limitações

Durante o decorrer da parte experimental do trabalho, surgiram vários factores que influenciaram os resultados apresentados, tais como:

- A quantidade limitada de *primers* que de certo modo interferiu no número de possíveis manipulações das concentrações dos reagentes;
- O reduzido tempo de experiência, que foi um factor limitante no que diz respeito ao desenvolvimento de técnicas na área molecular;
- A perda da amostra RB, que influenciou na discussão de resultados reduzindo o número de amostras de campo;
- A falta de um espectrofotómetro para a quantificação do ARN extraído das amostras.

10. Recomendações

Para o posterior estudo do uso da técnica do PCR no diagnóstico da DN recomenda-se:

- A variação da concentração da *Taq polimerase* bem como do $MgCl_2$ deve ser feita a intervalos regulares de concentração com valores próximos ao valor padrão, evitando assim resultados negativos por parte das amostras de campo que são as mais sensíveis;
- A quantificação do ARN extraído para uso posterior;
- O uso de um número maior de amostras de campo, uma vez que estas são mais susceptíveis a contaminações do meio tanto da colheita como da manipulação;
- Colheita de amostra de campo nas melhores condições de esterilidade possíveis;
- Síntese do ADN complementar deve ser feita a partir da mesma quantidade de ARN, em todas as amostras, para não existirem diferenças significativas entre as quantidades de ADNc das diferentes amostras;
- Uso de amostras de campo recém colectadas e bem conservadas, a valores inferiores a -20°C ou em nitrogénio líquido, de forma a garantir a conservação do ARN viral.

11. Bibliografia

1. Aldous, E.W., M. S. Collins, A. McGoldrick e D. J. Alexander. (2001) Rapid pathotyping of Newcastle disease virus (NDV) using fluorogenic probes in a PCR assay. Veterinary Microbiology. 80: 201-212.
2. Biester, H. E. e L. H. Schwate (1968) Enfermedades de las Aves. Edição Revolucionaria. Espanha. 1113 pp.
3. Brooks, G. E., J. S. Butel e S. A. Morse (1998) Microbiologia Médica. 21ª Edição. Guanamara-Koogan. São Paulo. 573pp.
4. Castro, A. E. e W. P. Heuschele (1992) Veterinary Diagnostic Virology. A Practitioner's Guide. Mosby-Year book. EUA.
5. Charan, S., A. Rai e V. M. Mahajan. (1981) Comparison of Ezyme-Linked Immunosorbent Assay and Haemagglutination Inhibition Test for the Detection of Newcastle Disease Virus Antibodies in Human Sera. Journal of Clinical Pathology. 34: 90-92.
6. Collins, M. S., J. B. Bashiruddin e D. J. Alexander. (1993) Deduced Amino Acid Sequences at the Fusion Protein Cleavage Site of Newcastle Disease Virus Showing Variation in Antigenicity and Pathogenicity. Archives of Virology. 128: 363-370.
7. Darbre, D. P. (1999). Basic Molecular Biology: Essential Techniques Series. John Wiley & Sons Ltd. England. 194 pp.
8. DINAP (1993) Relatório Anual. Ministério da Agricultura. Maputo-Moçambique. 19 pp.

9. DINAP (1994) Relatório Anual. Ministério da Agricultura. Maputo-Moçambique. 22 pp.
10. DINAP (1995) Relatório Anual. Ministério da Agricultura e Pescas. Maputo-Moçambique. 43 pp.
11. Errington, W., M. Steward e P. T. Emmerson. (1995) A diagnostic immunoassay for Newcastle disease virus based on the nucleocapsid protein expressed by a recombinant baculovirus. Journal of Virology Methods. 55: 357-365.
12. Gohm, D. S., B. Thur, M. A. Hofmann. (2000) Detection of Newcastle Disease Virus in Organs and Faeces of Experimental Infected Chickens Using RT-PCR. Avian Pathology. 29: 143-152.
13. Gould, A. R., J. A. Kattenbelt, P. Selleck, E. Hansson, A. Della-Porta e H. A. Westbury. (2000) Virulent Newcastle Disease in Australia: Molecular Epidemiological Analysis of Virus Isolated Prior to and During the Outbreaks of 1998-2000. Virus Research. 77: 51-60.
14. Fenner, F., P. A. Bachmann, E. P. J. Gibbs, F.A. Murphy, M. J. Studdert e D. O. White (1992) Virologia Veterinária. Editorial Acribia, S.A. Espanha. 691 pp.
15. Griffiths, A. J. F., J. H. Miller, D. T. Suzuki, R. C. Lewantin e W. M. Gelbert (1996) An Introduction to Genetic Analysis. 6^o Edition. Freeman. EUA. 916 pp
16. Hirsh, D. C e Y. C. Zee (2002) Veterinary Microbiology. Blackwell Science. EUA. 479 pp.
17. Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky e T.J. White (1990) PCR Protocols. Guide to Methods and Applications. Academic Press, Inc. 482 pp.

18. Katarina, R. S., A. K. Tiwari, T. Nanthakumar e P. P. Goswami. (2002) One-Step RT-PCR for the Detection of Infectious Bursal Disease Virus in Clinical Samples. Veterinary Research Communications. 25: 429-436.
19. Ke, G. M., H. J. Liu, M. Y. Lin, J. H. Chen, S. S. Tsai e P. C. Chang (2001) Molecular characterization of Newcastle disease viruses isolated from recent outbreaks in Taiwan. Journal of Virology Methods. 97: 1-11.
20. Kho. C. L., M. L. Mohd-Azmi, S. S. Arshad e K. Yussof (2000) Performance of an RT-nested PCR for detection of Newcastle disease virus. Journal of Virological Methods. 86:71-83.
21. Latchman, D. (1997) Basic Molecular and Cell Biology. 3th Edition. BJM. EUA. 298 pp.
22. Lee, T. C., K. Yusoff, S. Nathan e W. S. Tan. (2006) detection of Virulent Newcastle Disease Virus using a Phase-Capturing Dot Blot Assay. Journal of Virology Methods.
23. Liang, R., D. J. Cao, J. Q. Li, J. Chen, X. Guo, F. F. Zhuang e M. X. Duan. (2002) Newcastle Disease Outbreaks in Western China Were Caused by the Genotypes VIIa and VIII. Veterinary Microbiology. 87: 193-203.
24. Lima, N. e M. Mota (2003) Biocnologia. Fundamentos e Aplicações. Lidel. Lisboa. 494 pp.
25. Lodish, H., A. Berk, S. L. Zipursky, P. Mtsudaira, D. Baltimore e J. Darnell (2000) Molecular Cell Biology. 4th Edition. W. H. Freeman and Company. EUA. 1084 pp.

26. Manson, P. e J. Mutsvangwa (2003) African International Course on Serological Diagnostic techniques. The Theoretical Background. Harare-Zimbabwe.
27. Mapaco, L. P. (2005) Avaliação dos títulos de anti-corpo contra o vírus da doença de Newcastle, em galinhas do sector familiar vacinados com estirpe I-2. Caso de estudo: Distrito de Manjacaze. Tese de Licenciatura. 80pp. Maputo. Universidade Eduardo Mondlane.
28. Mishra, S., J. M. Katarina, K. C. Verma e R. L. Sah. (2000) Response of Chickens to Infection with Newcastle Disease Virus Isolated from a Guinea Fowl. Tropical Animal Health and Production. 32: 277-284.
29. Murphy, F.A., E. P. J. Gibbs, M. J. Studdert e M. C. Horzinek (s/a). Veterinary Virology. 3th Edition. Academic Press. EUA. 629 pp.
30. OIE (2002). Newcastle Disease Disponível em http://www.oie.int/eng/maladies/fiches/a_a160.htm. Pesquisado a 10.11.06..
31. OIE (2004) Newcastle Disease. Manual of Diagnostic Test and vaccines for Terrestrial Animals. 5th Edition. Disponível em <http://www.oie.int/eng/norms/MMANUAL/00038.htm>. Pesquisado a 10.11.06.
32. Peeters, B. P. H., O. S. Leeuw, I. Verstegen, G. Koch e A. L. J. Gielkens. (2000) Generation of a recombinant Chimeric Newcastle Disease Virus Vaccine that Allows Serological Differentiation Between Vaccinated and Infected Animals. Vaccine. 19: 1616-1627.
33. Pelczar Jr., M. J, E. C. S. Chan e N. R. Krieg. (1997) Microbiologia. Conceitos e Aplicações. 2th Edition. Vol. 1. Makron Books. Lisboa. 593 pp.

34. Pham, H. M., S. Konnai, T. Usui, K. S. Chang, S. Murata, M. Mase, K. Ohashi e M. Onuma. (2005) Rapid Detection and Differentiation of Newcastle Disease Virus by Real-Time PCR with Melting-Curve Analysis. Archives of Virology. 150: 2429-2438.
35. Roy, P. e A. T. Venugopalan. (1999) Dot-Enzyme Linked Immunosorbent Assay for Demonstration of Newcastle Disease Virus Infection. Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases. 22: 27-31.
36. Seal, B. S., D. J. King e J. D. Bennett. (1995) Characterization of Newcastle Disease Virus Isolates by Reverse Transcription PCR Coupled to Direct Nucleotide Sequencing and Development of Sequence Database for Pathotype Prediction and Molecular Epidemiological Analysis. Journal of Clinical Microbiology. 33: 2624-2630.
37. Seal, B. S., D. J. King e H. S. Sellers. (2000) The Avian Response to Newcastle Disease Virus. Developmental & Comparative Immunology. 24: 257-268.
38. Soares, P. B. M., C. Demétrio, L. Sanfilippo, A. H. N. Kawanoto, L. Brentano e E. L. Durigon (2005) Standardization of a duplex RT-PCR for the detection of Influenza A and Newcastle disease viruses in migratory birds. Journal of Virological Methods. 123: 125-130.
39. Sousa, R. L. M., H. J. Montassier e A. A. Pinto (2000) Detection and Quantification of Antibodies to Newcastle Disease Virus in Ostrich and Rhea Sera Using Liquid Phase Blocking Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. Vol. 7. Nº6. pp 940-944.
40. Stäuber, N., K. Brechtbühl, L. Bruckner e M. A. Hofmann (1995) Detection of Newcastle disease virus in poultry vaccines using Polymerase Chain Reaction and direct sequencing of amplified cADN. Vaccine. Vol. 13. Nº 4; 360-364.

41. Tiwari, A.K., R. S. Kataria, T. Nanthakumar, B. B. Dash e G. Desai (2004) Differential detection of Newcastle disease virus strains by degenerate *primers* based RT-PCR. Comparative Immunology Microbiology & Infectious Diseases. 27: 163-169.

42. Xu, H., J. Lohr e M. Greiner. (1997). The Selection of ELISA Cut-off Points for Testing Antibody to Newcastle Disease by Two-Graph Receiver Operating Characteristic (TG-ROC) Analysis. Journal of Immunological Methods. 208: 61-64.

ANEXOS

ANEXOS

Anexo 1

Preparação de soluções

Água DEPC

DEPC

1000 ml água MiliQ (água bidestilada)

Incubar a mistura em banho Maria a 37°C durante a noite para posterior autoclavagem.

TBE 1X

121,14 g Tris

61,83 g Ácido bórico

14,63 g EDTA

Volume final de 1000 ml, pH = 8,3

Anexo 2

Extracção do ARN total pelo Método TRIZOL

Pipetou-se 750 µl do reagente TRIZOL para um tubo de microcentrifuga. Adicionou-se 250 µl da amostra de líquido amniótico ou vacina e mistura-se bem.

Incubou-se por 5 minutos à temperatura ambiente.

Adicionou-se 200 µl de clorofórmio. Fechou-se bem o tubo e agitou-se vigorosamente à mão durante 15 segundos. Incubou-se por 3 minutos à temperatura ambiente.

Centrifugou-se a 14 000 rpm por 15 minutos numa microcentrifuga refrigerada a 4°C. A mistura separou-se numa fase inferior rosa, uma interfase e uma fase superior aquosa (onde se encontrava o ARN).

Transferiu-se a fracção aquosa para um tubo de microcentrifuga limpo. Adicionou-se 500 µl de isopropanol e mistura-se por inversão ligeira do tubo.

Incubou-se à temperatura ambiente, por 10 minutos.

Centrifugou-se a 14 000 rpm por 10 minutos numa microcentrifuga refrigerada 4°C.

Removeu-se o isopropanol sem perturbar o sedimento.

Lavou-se o sedimento com 1 ml de etanol a 75% e centrifugou-se a 11 000 rpm, por 5 minutos a 4°C.

Removou-se o etanol sem perturbar o sedimento e seca-se o sedimento ao ar livre.

Ressuspendeu-se o ARN em 10 µl de DEPC-ddH₂O.

Uma parte do ARN foi usado na síntese do ADNc e outra foi conservada para o seu posterior uso a -70°C.

Anexo 3

Síntese de ADN complementar usando SuperScript™ III para RT-PCR (Reverse Transcriptase)

I. Tratamento com DNase

Prepararam-se 9 tubos eppendorfs nos quais, separadamente, fizeram-se diluições misturando-se 5 µl de amostras de ARN extraído com 3 µl de água DEPC.

Misturou-se os seguintes reagentes num tubo Eppendorf de 0.5 ml:

- 8 µl da amostra de ARN
- 1 µl de 10X DNase I buffer
- 1 µl de DNase I, Amp grade, 1U/ µl

Incubou-se os tubos por 15 minutos a temperatura ambiente.

Inactivou-se a DNase I com a adição de 1 µl de 25 mM EDTA.

Aqueceram-se os tubos no forno de hibridação por 10 minutos a 65°C.

II. Síntese de ADN complementar (RT)

Misturou-se:

- 11 µl do ARN total proveniente do processo de tratamento com DNase,
- 1 µl de oligo (dt) 20 (50 µM)
- 1 µl de 10 mM dNTP Mix-

Aqueceu-se por 5 minutos a 65° C no forno de hibridação e incubou-se em gelo por 1 minuto.

Deu-se um *short-spin* e a essa mistura adicionou-se:

- 4 µl 5X *first-strand buffer*

- 1 μ l 0,1 M DTT
- 1 μ l RNase OUT (40 units/ μ l)
- 1 μ l Super ScriptTM III RT (200 units/ μ l).

Misturou-se com a pipeta gentilmente.

Incubou-se por 45 minutos a 50°C.

Inactivou-se a reacção por aquecimento por 15 minutos a 70°C.

Anexo 4

Tabelas de resultados do PCR II padrão e do PCR II com variação das concentrações da Taq polimerase e MgCl₂.

M marcador + ADN amplificado ± Banda ténue - ADN não amplificado

PCR II padrão		
Poço	Amostras	Amplificação
	Gel à esquerda	
1	504	-
2	504	-
3	507	+
4	507	±
5	12.9	-
6	M	
7	Iz	+
8	7.10	+
9	12.9	+
	Iz	+
Gel à direita		
1	-	
2	450	±
3	RB	+
4	M	
5	452	+

PCR II: variação da [Taq] a 0,025 e 0,05 U/ μ l		
Poço	Amostras [Taq] = 0,025 U/ μ l	Amplificação
1	-	-
2	450	-
3	452	-
4	504	-
5	507	-
6	7.12	+
7	12.9	\pm
8	Iz	+
9	M	
Amostras [Taq] = 0,05 U/ μ l		
10	450	-
11	RB	-
12	452	\pm
13	504	-
14	507	\pm
15	7.12	+
16	12.9	\pm
17	Iz	+

PCR II: [Taq] = 0,05 U/ μ l, [MgCl ₂] = 0,75 mM		
Poço	Amostras	Amplificação
1	-	
2	450	-
3	452	-
4	504	-
5	M	-
6	507	-
7	7.12	+
8	12.9	\pm
9	Iz	+
10	-	

PCR II: [Taq] = 0,05 U/ μ l, [MgCl ₂] = 1 mM		
Poço	Amostras	Amplificação
1	-	
2	450	-
3	452	-
4	504	-
5	M	
6	507	-
7	7.12	+
8	12.9	±
9	Iz	+
10	-	

PCR II: [Taq] = 0,05 U/ μ l, [MgCl ₂] = 2 mM		
Poço	Amostras	Amplificação
1	-	
2	-	-
3	450	-
4	M	
5	452	+
6	507	-

PCR II: [Taq] = 0,05 U/ μ l, [MgCl ₂] = 2,25 mM		
Poço	Amostras	Amplificação
1	-	
2	450	-
3	RB	-
4	M	
5	452	+
6	507	±