

Eficiência do processamento combinado (swim up/Percoll) na remoção do vírus da diarréia viral bovina (BVDV) em sêmen bovino

Nelson Beuter Júnior¹, Andrea Giannotti Galuppo², Bruna Meyrer¹, Catarina Marcon Chiappetta¹, José Luiz Rigo Rodrigues², Cláudio Wageck Canal¹

¹Laboratório de Virologia – Faculdade de Veterinária - UFRGS

²Laboratório de Embriologia e Biotécnicas de Reprodução – Faculdade de Veterinária – UFRGS

Introdução

A possibilidade de transmissão de patógenos via gametas e embriões é grande, quando aplicado em técnicas de reprodução assistida. O crescente trânsito desse tipo de material biológico entre a comunidade internacional, agrava esta situação.

Sobre o BVDV

O vírus da diarréia viral bovina (BVDV) é um dos patógenos com alto potencial de disseminação por meio destas técnicas.

O BVDV pertence à família *Flaviviridae*, gênero *pestivirus*. Trata-se de um vírus RNA esférico (40-60nm), que possui capsídeo icosaédrico e envelopado. A expressão gênica, bem como a sua replicação ocorrem no citoplasma celular. Os bovinos são seu hospedeiro natural.

As infecções por BVDV podem ser agudas ou persistentes (animais PI), e em geral, apresentam alta taxa de morbidade e baixa mortalidade. A doença provoca imunossupressão dos animais infectados, sendo comum a progressão de infecções secundárias (de origem viral e bacteriana). Em fêmeas prenhes, podem ocorrer diversos efeitos, dependendo do período da gestação em que ocorrer a infecção.

Naturalmente, as infecções originam-se de cepas não-citopáticas (ncp) do vírus. A forma citopática (cp) ocorre pela mutação do vírus ncp. A superinfecção de animais PI por cepas cp leva a Doença das Mucosas, a qual é fatal.

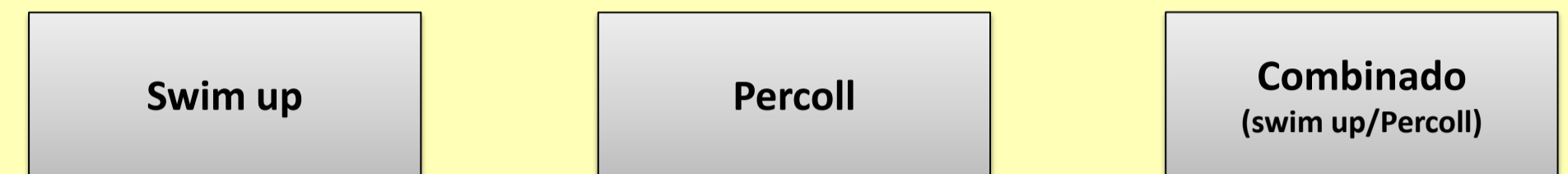
Objetivo

Verificar a eficiência do uso combinado de técnicas de processamento (swim up/Percoll) do sêmen bovino na remoção de BVDV desta matriz.

Materiais e métodos

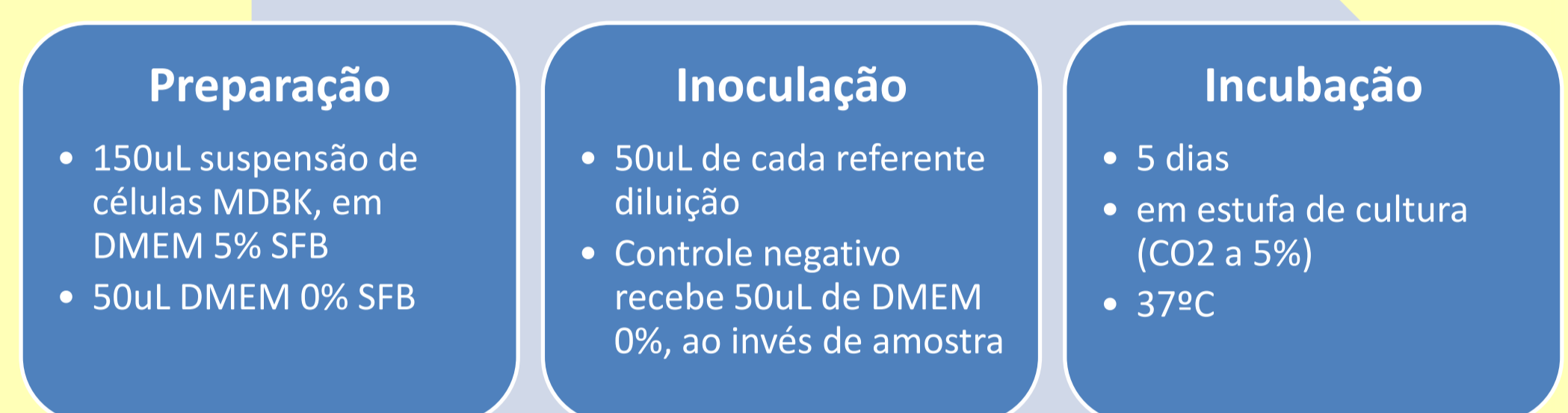
A metodologia básica, consistiu das seguintes etapas:

1. Infecção experimental do sêmen bovino, com cepa BVDV NADL (cp)
2. **Processamento do sêmen**, por uma das três seguintes formas:



3. Titulação viral em cultivo celulares usando placa 96 poços (TCID₅₀).

A técnica de titulação viral consistiu em três etapas:



Após o período de incubação, foram realizadas as leituras das placas. A leitura consiste em verificar a presença de efeito citopático no cultivo celular, presente em cada um dos poços da placa. O título de cada amostra foi calculado pelo método de Reed & Muench (19...), com base no número de poços POSITIVOS para efeito de vírus.

Resultados

O vírus BVD apresenta um efeito citopático característico, como mostra a figura 1.

A tabela 1 apresenta os títulos obtidos nas quintuplicatas, para cada um dos processamentos, e a figura 2 apresenta graficamente estes dados.

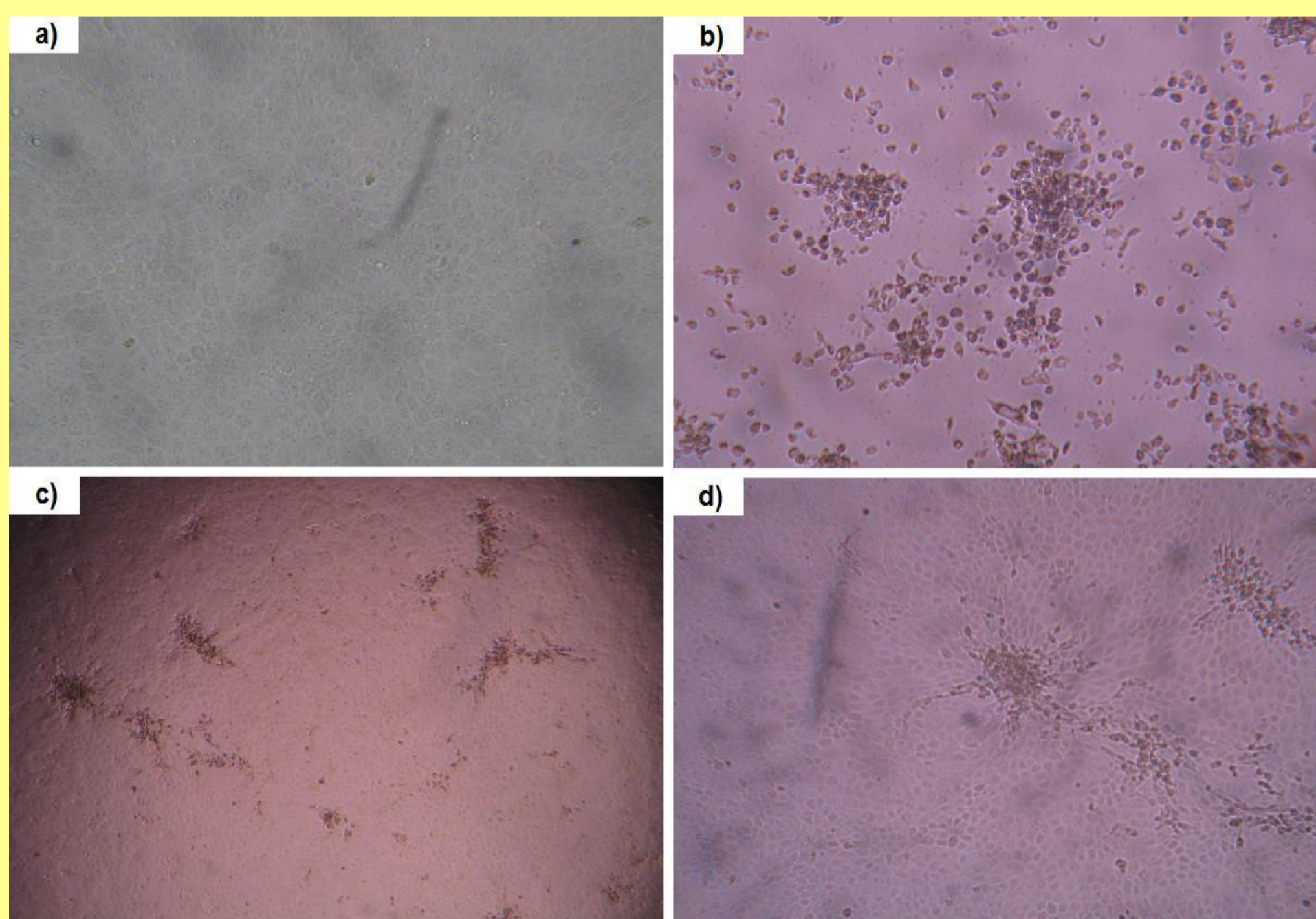


Fig. 1: Observação do efeito citopático (ecp) de BVDV em célula MDBK: a) controle negativo; b) ecp forte (aumento 100x); c) início de ecp (aumento 10x); d) início de ecp (aumento 100x).

O swim up apresentou-se como o processamento menos eficiente na remoção de vírus do sêmen bovino. O processamento com Percoll apresentou índices razoáveis, entretanto, observou-se respostas ainda melhores quando realizado o processamento combinado swim up/Percoll, onde os títulos ficaram abaixo do limite de detecção, para 4 das 5 amostras analisadas.

Tabela 1: Resultados das titulações (TCID₅₀)

TITULAÇÕES	SWIM UP	PERCOLL	COMBINADO	CONTROLE NEGATIVO
1ª	3,97	2,10	<LD	<LD
2ª	3,73	2,97	<LD	<LD
3ª	2,87	1,87	<LD	<LD
4ª	3,30	2,73	<LD	<LD
5ª	4,30	3,30	<LD	<LD

Nota: LD (Limite de Detecção) = 10^{1,80}

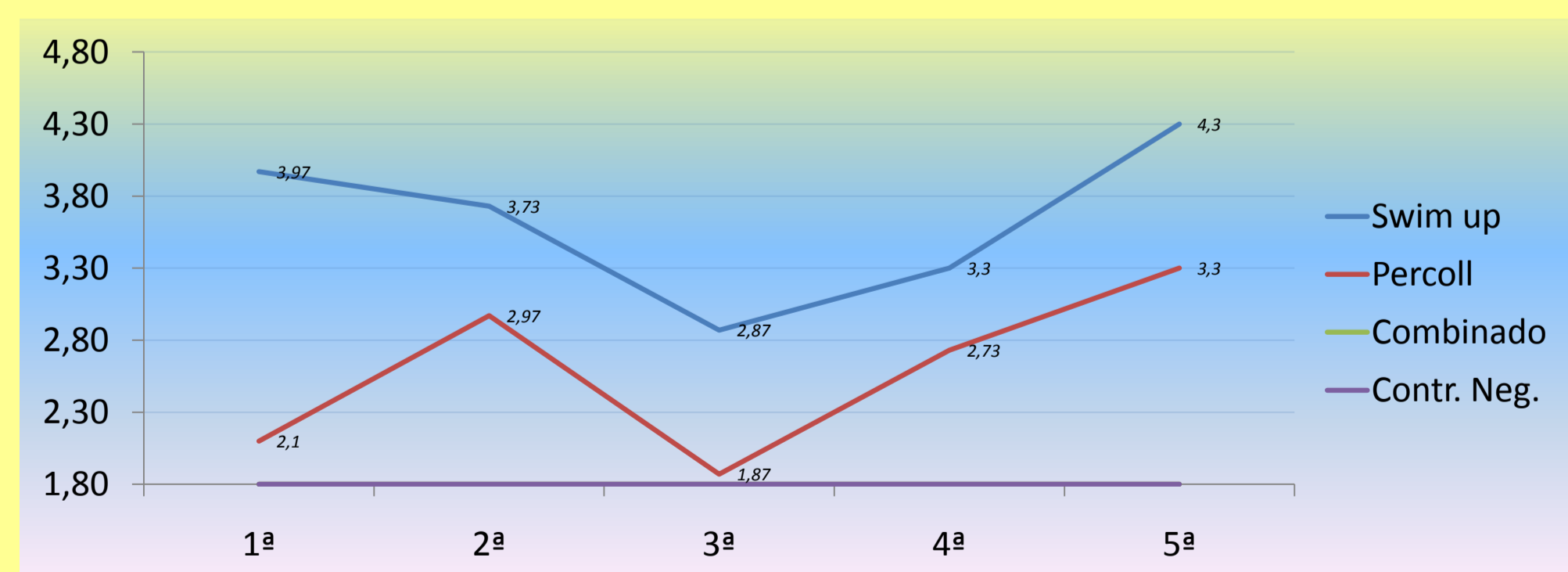


Figura 2: Representação gráfica dos resultados das titulações (TCID₅₀)

Conclusões

Conclui-se que o processamento por swim up/Percoll combinados foi a técnica mais eficiente na remoção do BVDV do sêmen bovino e pode ser utilizada para diminuir a sua transmissão através das técnicas de reprodução animal assistida.

Agradecimentos

Aos colegas dos laboratórios de Virologia e de Embriologia, da Faculdade de Veterinária – UFRGS.

