

Benedito Rodrigues da Silva Neto
(Organizador)

Pesquisa Científica e Tecnológica em Microbiologia



Benedito Rodrigues da Silva Neto
(Organizador)

Pesquisa Científica e Tecnológica em Microbiologia



2019 by Atena Editora
Copyright © Atena Editora
Copyright do Texto © 2019 Os Autores
Copyright da Edição © 2019 Atena Editora
Editora Chefe: Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira
Diagramação: Lorena Prestes
Edição de Arte: Lorena Prestes
Revisão: Os Autores



Todo o conteúdo deste livro está licenciado sob uma Licença de Atribuição Creative Commons. Atribuição 4.0 Internacional (CC BY 4.0).

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores. Permitido o download da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

Conselho Editorial

Ciências Humanas e Sociais Aplicadas

Profª Drª Adriana Demite Stephani – Universidade Federal do Tocantins
Prof. Dr. Álvaro Augusto de Borba Barreto – Universidade Federal de Pelotas
Prof. Dr. Alexandre Jose Schumacher – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso
Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Antonio Gasparetto Júnior – Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais
Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília
Prof. Dr. Constantino Ribeiro de Oliveira Junior – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Cristina Gaio – Universidade de Lisboa
Prof. Dr. Deyvison de Lima Oliveira – Universidade Federal de Rondônia
Prof. Dr. Edvaldo Antunes de Faria – Universidade Estácio de Sá
Prof. Dr. Eloi Martins Senhora – Universidade Federal de Roraima
Prof. Dr. Fabiano Tadeu Grazioli – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões
Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Profª Drª Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionele delle Figlie de Maria Ausiliatrice
Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense
Profª Drª Keyla Christina Almeida Portela – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso
Profª Drª Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. Marcelo Pereira da Silva – Universidade Federal do Maranhão
Profª Drª Miranilde Oliveira Neves – Instituto de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará
Profª Drª Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Rita de Cássia da Silva Oliveira – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Sandra Regina Gardacho Pietrobon – Universidade Estadual do Centro-Oeste
Profª Drª Sheila Marta Carregosa Rocha – Universidade do Estado da Bahia
Prof. Dr. Rui Maia Diamantino – Universidade Salvador
Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande
Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

Ciências Agrárias e Multidisciplinar

Prof. Dr. Alexandre Igor Azevedo Pereira – Instituto Federal Goiano
Prof. Dr. Antonio Pasqualetto – Pontifícia Universidade Católica de Goiás
Profª Drª Daiane Garabeli Trojan – Universidade Norte do Paraná
Profª Drª Diocléa Almeida Seabra Silva – Universidade Federal Rural da Amazônia
Prof. Dr. Écio Souza Diniz – Universidade Federal de Viçosa
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
Profª Drª Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Prof. Dr. Jorge González Aguilera – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Júlio César Ribeiro – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Profª Drª Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas

Ciências Biológicas e da Saúde

Prof. Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto – Universidade Federal de Goiás
Prof. Dr. Edson da Silva – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri
Profª Drª Elane Schwinden Prudêncio – Universidade Federal de Santa Catarina
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria
Prof. Dr. José Max Barbosa de Oliveira Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
Profª Drª Magnólia de Araújo Campos – Universidade Federal de Campina Grande
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Profª Drª Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande

Ciências Exatas e da Terra e Engenharias

Prof. Dr. Adélio Alcino Sampaio Castro Machado – Universidade do Porto
Prof. Dr. Alexandre Leite dos Santos Silva – Universidade Federal do Piauí
Profª Drª Carmen Lúcia Voigt – Universidade Norte do Paraná
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Fabrício Menezes Ramos – Instituto Federal do Pará
Prof. Dr. Juliano Carlo Rufino de Freitas – Universidade Federal de Campina Grande
Profª Drª Neiva Maria de Almeida – Universidade Federal da Paraíba
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)	
P474	<p>Pesquisa científica e tecnológica em microbiologia [recurso eletrônico] / Organizador Benedito Rodrigues da Silva Neto. – Ponta Grossa, PR: Atena Editora, 2019.</p> <p>Formato: PDF Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader Modo de acesso: World Wide Web Inclui bibliografia ISBN 978-85-7247-772-7 DOI 10.22533/at.ed.727191111</p> <p>1. Microbiologia – Pesquisa – Brasil. I. Silva Neto, Benedito Rodrigues da.</p> <p style="text-align: right;">CDD 579</p>
Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422	

Atena Editora
Ponta Grossa – Paraná - Brasil
www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br

APRESENTAÇÃO

A microbiologia é um vasto campo que inclui o estudo dos seres vivos microscópicos nos seus mais variados aspectos como morfologia, estrutura, fisiologia, reprodução, genética, taxonomia, interação com outros organismos e com o ambiente além de aplicações biotecnológicas. Como uma ciência básica a microbiologia utiliza células microbianas para analisar os processos fundamentais da vida, e como ciência aplicada ela é praticamente a linha de frente de avanços importantes na medicina, agricultura e na indústria.

De forma integrada e colaborativa a nossa proposta apoiada e certificada pela editora Atena é apresentar aqui a obra “Pesquisa científica e tecnológica em microbiologia” contendo trabalhos e pesquisas desenvolvidas em diversos institutos do território nacional contendo análises de processos biológicos embasados em células microbianas ou estudos científicos na fundamentação de atividades microbianas com capacidade de interferir nos processos de saúde/doença.

A microbiologia como ciência iniciou a cerca de 200 anos, entretanto os avanços na área molecular como a descoberta do DNA elevou a um novo nível os estudos desses seres microscópicos, além de abrir novas frentes de pesquisa e estudo, algumas das quais pretendemos demonstrar nesse primeiro volume da obra “Pesquisa científica e tecnológica em microbiologia”. Sabemos na atualidade que os microrganismos são encontrados em praticamente todos os lugares, e a falta de conhecimento que havia antes da invenção do microscópio hoje não é mais um problema no estudo, principalmente das enfermidades relacionadas aos agentes como bactérias, vírus, fungos e protozoários.

Acreditamos no potencial dessa obra em primeiro lugar pela qualidade dos trabalhos aqui apresentados, e em segundo pelo campo em potencial para futuras novas discussões, haja vista que enfrentamos a questão da resistência dos microrganismos à drogas, identificação de viroses emergentes, ou reemergentes, desenvolvimento de vacinas e principalmente a potencialização do desenvolvimento tecnológico no estudo e aplicações de microrganismos de interesse.

Temas ligados à pesquisa e tecnologia microbiana são, deste modo, discutidos aqui com a proposta de fundamentar o conhecimento de acadêmicos, mestres e todos aqueles que de alguma forma se interessam pela saúde em seus aspectos microbiológicos. Portanto a obra propõe uma teoria bem fundamentada nos resultados práticos obtidos em alguns campos da microbiologia, abrindo perspectivas futuras para os demais pesquisadores de outras subáreas da microbiologia.

Assim desejo a todos uma ótima leitura!

Benedito Rodrigues da Silva Neto

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	1
ANÁLISE DA CONTAMINAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE MÁQUINAS E FERRAMENTAS PRESENTES EM UM LABORATÓRIO DE MECÂNICA	
Francisco Angelo Gurgel da Rocha Priscylla Cinthya Alves Gondim Liane Raquel Alves dos Santos Vitoria Fernandes Cabral Dantas	
DOI 10.22533/at.ed.7271911111	
CAPÍTULO 2	14
ANALISE DO EFEITO ANTIMICROBIANO DO EXTRATO AQUOSO DO ALHO (<i>Allium sativum</i> L.) SOBRE O CRESCIMENTO DAS BACTÉRIAS <i>Staphylococcus aureus</i> E <i>Escherichia coli</i>	
Karine Ferreira Lopes Dayane Nair Rocha de Souza Débora Luiz de Barros Estefânia Isabel Pereira Ana Paula Gonçalves Coelho Glaysen Martins de Oliveira Suzanne Ramos Mota Andrea Amélia Silva Vieira	
DOI 10.22533/at.ed.7271911112	
CAPÍTULO 3	22
CAMUNDONGOS BALB/C INFECTADOS COM A CEPA 66985 DO VÍRUS DA DENGUE PELA VIA INTRAVENOSA EXIBE DANO NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL	
Natália Gedeão Salomão Kíssila Rabelo Tiago Fajardo Póvoa Ada Maria de Barcelos Alves Simone Morais da Costa Antonio José da Silva Gonçalves Juliana Fernandes Amorim da Silva Adriana de Souza Azevedo Priscilla Conrado Guerra Nunes Carlos Alberto Basílio-de-Oliveira Rodrigo Panno Basílio-de-Oliveira Luiz Henrique Medeiros Geraldo Celina Garcia Fonseca Flávia Regina Souza Lima Ronaldo Mohana-Borges Emiliana Mandarano Silva Flávia Barreto dos Santos Edson Roberto Alves Oliveira Marciano Viana Paes	
DOI 10.22533/at.ed.7271911113	
CAPÍTULO 4	44
CARACTERIZAÇÃO DE UM PEPTÍDEO ANTAGONISTA PRODUZIDO POR <i>Bacteroides fragilis</i> ISOLADO DE PÁCIENTE COM INFECÇÃO INTRA-ABDOMINAL	
Marcela Nascimento Pinheiro Braga Natália Rocha Guimarães Jamil Silvano Oliveira Simone Gonçalves dos Santos	

Marcelo Porto Bemquerer
Paula Prazeres Magalhães
Luiz de Macêdo Farias

DOI 10.22533/at.ed.7271911114

CAPÍTULO 5 55

DESENHO VACINAL PARA O ZIKA VÍRUS COM O USO DA IMUNOINFORMÁTICA

Esther Santos Santana
Fabiano Ricardo Fontes Santos
Daniela Droppa-Almeida

DOI 10.22533/at.ed.7271911115

CAPÍTULO 6 68

ANÁLISE EPIDEMIOLÓGICA DE CANDIDEMIA EM PACIENTES SUBMETIDOS À INTERNAÇÃO NO HOSPITAL DAS CLÍNICAS EM GOIÂNIA - GO

Lucas Daniel Quinteiro de Oliveira
Maria do Rosário Rodrigues Silva
Benedito Rodrigues da Silva Neto

DOI 10.22533/at.ed.7271911116

CAPÍTULO 7 82

ENTEROCOCCUS SP ISOLATED FROM AQUATIC ENVIRONMENT : RESISTANCE TO TOXIC METALS

Luciana Furlaneto-Maia
Gabriela Batista Gomes Bravo
Sharise Beatriz Roberto
Naiara de Oliveira Batista
Alex Kiyomassa Watanabe
Márcia Cristina Furlaneto

DOI 10.22533/at.ed.7271911117

CAPÍTULO 8 98

ESTUDO DA COMUNIDADE LIQUÊNICA DA UEMG – IBIRITÉ: ANÁLISE MORFOLÓGICA E ECOLÓGICA COMO CARACTERIZAÇÃO DA POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA

Letícia Maria Soares Azevedo
Camila Mara dos Reis
Daniela de Oliveira Costa
Reisila Simone Migliorini Mendes
Marisa Cristina da Fonseca Casteluber

DOI 10.22533/at.ed.7271911118

CAPÍTULO 9 108

KLEBSIELLA PNEUMONIAE: A NOVA AMEAÇA RESISTENTE

Luana Marcela Andrade de Santana
Nathalia Santos Silva
Karla Bárbara Calú Barreto
Dayane dos Santos
Daniel Guimarães Ribeiro
Isana Carla Leal Souza

DOI 10.22533/at.ed.7271911119

CAPÍTULO 10 112

OCORRÊNCIA DE *FASCIOLA HEPATICA* NA REGIÃO DA CAMPANHA GAUCHA/RS

Brenda Luciana Alves da Silva
Mikalele Simas Santos
Marcele Ribeiro Corrêa
Fernanda Lucero Rodrigues
Gustavo Freitas Lopes
Lourdes Caruccio Hirschmann
Anelise Afonso Martins

DOI 10.22533/at.ed.72719111110

CAPÍTULO 11 117

PROPRIEDADES RELACIONADAS À SEGURANÇA MICROBIOLÓGICA DE LINHAGENS DE *Staphylococcus aureus* ISOLADAS DE QUEIJO ARTESANAL

Jéssica Lee de Freitas
Bianca Aguiar Alves
Celso Tadeu Barbosa dos Santos
Alessandra Barbosa Ferreira-Machado
Aline Dias Paiva

DOI 10.22533/at.ed.72719111111

CAPÍTULO 12 126

Staphylococcus aureus: UMA VISÃO GERAL DOS MECANISMOS DE VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA

Glauciane Vieira Damasceno
Elane Rodrigues Oliveira
Patrícia Vieira de Oliveira
Bruno Luis Lima Soares
Gabrielle Damasceno Evangelista Costa
Adrielle Zagmignan
Cristiane Santos Silva e Silva Figueiredo
Rita de Cássia M. de Miranda
Luís Cláudio Nascimento da Silva

DOI 10.22533/at.ed.72719111112

CAPÍTULO 13 140

ENTEROBACTÉRIAS PRODUTORAS DE BETA-LACTAMASE DE ESPECTRO AMPLIADO (ESBL) EM COPROCULTURA DE PACIENTES AMBULATORIAIS

Daniela Cristiane da Cruz Rocha
Érica Kássia Sousa Vidal
Karina Lúcia Silva da Silva
Débora de Castro Costa
Anderson Nonato do Rosario Marinho

DOI 10.22533/at.ed.72719111113

CAPÍTULO 14 153

PERFIL FENOTÍPICO E GENOTÍPICO DE UMA CEPA DE *Escherichia coli* MULTIRRESISTENTE A ANTIBIÓTICOS, ISOLADA DO LAGO ÁGUA PRETA, BELÉM, PARÁ

Ícaro Rainyer Rodrigues de Castro
Jorianne Thyeska Castro Alves
Alyne Cristina Sodré Lima
Vitória Almeida Gonçalves de Moura
Carla Thais Moreira Paixão
Wana Lailan Oliveira da Costa
Adriedson Jameson Chaves de Alcântara
Carlos Leonardo de Aragão Araújo

Larissa Maranhão Dias
Artur Luiz da Costa da Silva
Adriana Ribeiro Carneiro Folador
DOI 10.22533/at.ed.72719111114

CAPÍTULO 15 168

DESENVOLVIMENTO, PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO DE PCR EM TEMPO REAL PARA O DIAGNÓSTICO ESPECÍFICO DE *PSEUDOCOWPOXVIRUS* – PCPV EM BOVINOS

Érica Eustáquia de Freitas Passos
Giliane de Souza Trindade
Antônio Augusto Fonseca Júnior

DOI 10.22533/at.ed.72719111115

CAPÍTULO 16 180

VERIFICAÇÃO DA TEMPERATURA DE DISTRIBUIÇÃO DE REFEIÇÕES QUENTES OFERTADAS EM UMA INSTITUIÇÃO DE LONGA PERMANÊNCIA PARA IDOSOS E A CORRELAÇÃO COM O CRESCIMENTO MICROBIOLÓGICO

Eliane Costa Souza
Déborah Maria Tenório Braga Cavalcante Pinto
Ismaell Avelino de Sousa Sobrinho
Andressa Lima dos Santos
Julia Dayane de Miranda Vasconcelos Cardoso
Mirelly Raylla dos Santos
Mateus Oliveira Santana

DOI 10.22533/at.ed.72719111116

CAPÍTULO 17 188

A DIVERSIDADE DA CLASSIFICAÇÃO DE RNAS NÃO-CODIFICADORES EM BACTÉRIAS

Amanda Carvalho Garcia

DOI 10.22533/at.ed.72719111117

CAPÍTULO 18 202

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL FERMENTATIVO DE LEVEDURAS ISOLADAS DE FRUTAS VISANDO A PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE XILOSE

Rosimeire Oenning da Silva
Sinésio de Novaes Junior
Meirielen Nascimento Serpa
Italo Andrey Souza Inácio Lima
Raquel Aparecida Loss

DOI 10.22533/at.ed.72719111118

SOBRE O ORGANIZADOR 214

ÍNDICE REMISSIVO 215

DESENVOLVIMENTO, PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO DE PCR EM TEMPO REAL PARA O DIAGNÓSTICO ESPECÍFICO DE *PSEUDOCOWPOXVIRUS* – PCPV EM BOVINOS

Érica Eustáquia de Freitas Passos

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte – Minas Gerais

Giliane de Souza Trindade

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte – Minas Gerais

Antônio Augusto Fonseca Júnior

Auditor Fiscal Federal Agropecuário, Laboratório Nacional Agropecuário, Pedro Leopoldo – Minas Gerais

RESUMO: O Brasil apresenta uma forte atuação na comercialização mundial de carnes, liderando o *ranking* mundial como o maior exportador de carne bovina e detentor de uns dos maiores rebanhos do mundo. Por esta razão, qualquer doença disseminada que resulte em prejuízos ou que imponham restrições ao comércio de animais e aos produtos impacta desfavoravelmente toda a economia nacional. As doenças causadas por *Parapoxvirus* (PPV) possuem grande importância no cenário da pecuária brasileira, tanto pela possibilidade de gerar intensos prejuízos econômicos, quanto pela alta vulnerabilidade humana. Considerando os inúmeros casos descritos de infecções causados por PPV no país e por apresentarem sintomatologia clínica

semelhante com as causadas pelo vírus da febre aftosa, torna-se imprescindível o desenvolvimento de diagnósticos laboratoriais bem estruturados e aptos para detecção rápida e específica, proporcionando a diferenciação do agente etiológico. Neste trabalho são relatados procedimentos da validação do método de PCR em tempo real para detecção do *Pseudocowpoxvirus* (PCPV) em bovinos. Foram analisados os parâmetros de Limite de detecção (LD), Sensibilidade em matriz, Repetibilidade, Robustez, Reprodutibilidade e Especificidade analítica. Os resultados obtidos foram avaliados estatisticamente através da Análise de Variância - ANOVA em que a determinação das variâncias dos erros foi utilizada para a verificação da aceitabilidade do sistema de medidas. A aplicabilidade do método diferencial de q-PCR foi demonstrada através da análise de amostras clínicas. O método validado apresentou adequação para seus respectivos propósitos de uso.

PALAVRAS CHAVE: *Pseudocowpoxvirus*; Diagnóstico molecular diferencial; q-PCR; Validação; Bovinos.

ABSTRACT: Brazil has a strong presence in the world meat trade, leading the world ranking as the largest beef exporter and holder of one of the largest herds in the world. For this reason, any widespread disease that results in damage

or imposes restrictions on trade in animals and products adversely impacts the entire national economy. The diseases caused by Parapoxvirus (PPV) are of great importance in the Brazilian livestock scenario, both for the possibility of generating intense economic losses and for the high human vulnerability. Considering the numerous cases of infections caused by PPV in the country and because they present clinical symptoms similar to those caused by foot-and-mouth disease virus, it is essential to develop well-structured laboratory diagnoses capable of rapid and specific detection, providing differentiation of the disease. etiological agent. This work reports the validation procedures of the real time PCR method for detection of Pseudocowpoxvirus (PCPV) in cattle. The Limit of Detection (LD), Matrix Sensitivity, Repeatability, Robustness, Reproducibility and Analytical Specificity parameters were analyzed. The obtained results were statistically evaluated by Analysis of Variance - ANOVA in which the error variance determination was used to verify the acceptability of the measurement system. The applicability of the differential q-PCR method was demonstrated by analysis of clinical samples. The validated method was suitable for its respective use purposes.

KEYWORDS: *Pseudocowpoxvirus*; Differential molecular diagnosis; Q-PCR; Validation; Cattle.

1 | INTRODUÇÃO

Vulgarmente denominada Paravaccinia ou “Nódulo do ordenhador”, a infecção humana por *Pseudocowpox virus* é de origem laboral e acidental observada em ordenhadores e veterinários. Geralmente, acontece através do contato com lesões no úbere de animais infectados, manipulação da carcaça de animais contaminados ou através da transmissão indireta via equipamentos de ordenha, objetos contaminados, bezerros em lactação, moscas, pastagens dentre outros. Os sinais clínicos desaparecem espontaneamente sem cicatrizes, na maioria dos casos, os nódulos são anelares e ocasionalmente acometem a face (Iketani *et al.*, 2002; Lederman *et al.*, 2013). As espécies pertencentes ao gênero *Parapoxvirus* atualmente descritas são o *Orf virus* (ORFV) endêmico em ovinos e caprinos, o *Bovine papular stomatitis virus* (BPSV) e o *Pseudocowpox virus* (PCPV) que infectam principalmente bovinos. O *Parapoxvirus of red deer in new Zealand* (PVNZ) é uma espécie recém-definida do gênero e, até o momento, significativo para a infecção de cervídeos (Abrahão *et al.*, 2010; Scagliarini *et al.*, 2011). Em vários estados brasileiros, episódios de doenças infecciosas provocadas por PCPV, BPSV e ORFV, são frequentemente relatados em ruminantes e humanos (Oliveira *et al.*, 2012; Sardi *et al.*, 2012; Cargnelutti *et al.*, 2014; Nascimento, 2016). Nas últimas décadas, episódios envolvendo coinfeções em bovinos e em humanos também foram registrados em território nacional. A origem e o significado de coinfeções na patogenia das doenças não são totalmente elucidados e, na atualidade, a frequência das coinfeções no Brasil, é também desconhecida, mas encontra-se sob vigilância (Abrahão *et al.*, 2010; Canal *et al.*,

2012; Campos *et al.*, 2011; Alves *et al.*, 2016; Nascimento *et al.*, 2016; Sant'ana *et al.*, 2013;).

2 | MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Amostras

Para a realização deste trabalho, foram utilizadas amostras de tecido epitelial de língua bovina provenientes de animais sem o histórico de infecções. O plasmídeo foi construído a partir do alinhamento de sequências de genomas completos do PCPV disponíveis no *GenBank*, considerando as regiões de pareamento dos iniciadores e a porção interna amplificada. As sequências específicas para os alvos dos iniciadores foram enviadas para IDT (Estados Unidos) para síntese do gene sintético e inserção no plasmídeo pUCIDT (Amp), da IDT (*Integrated DNA Technologies*). A partir do estoque do CPS na concentração inicial de 0,1 ng/μL, foram realizadas diluições seriadas na base dez em água deionizada estéril tratada com dietilpirocarbonato (DPEC). As diluições do CPS obtidas foram adicionadas às amostras negativas de tecido epitelial de língua bovina, obtendo então, amostras sabidamente positivas, para a realização dos ensaios de verificação de desempenho e validação dos métodos de q-PCR. As amostras clínicas foram obtidas através de crostas ou de epitélio de lesões orais de animais infectados, procedentes de vários estados brasileiros, enviados ao Laboratório de Biologia Molecular – LBM/ LANAGRO-MG para a realização do processo identificação, detecção e confirmação por diagnóstico molecular. As amostras diagnosticadas positivamente para *Parapoxvirus* foram selecionadas e submetidas à análise molecular pelo método de q-PCR desenvolvido, com a finalidade de avaliar o desempenho do método em escala experimental.

2.2 Extração de ácidos nucleicos – DNA

O processo de extração foi realizado utilizando o Kit *DNeasy Blood and Tissue* (Qiagen, Alemanha) conforme as orientações descritas no protocolo fornecido pelo fabricante.

3 | PADRONIZAÇÃO DOS MÉTODOS

3.1 Seleção de Oligonucleotídeos para os métodos de q-PCR

Os iniciadores e as sondas utilizados na q-PCR de PCPV foram desenhados pelo Dr. Antônio Augusto Fonseca Júnior, Auditor Fiscal Federal do Laboratório de Biologia Molecular do LANAGRO/MG. As regiões mais divergentes mencionadas na literatura de Hautaniemi e colaboradores, 2010 foram selecionados. Os iniciadores

foram desenhados após alinhamento das sequências de genomas completos de *Parapoxvirus* disponíveis no *GenBank*. As sequências consenso foram submetidas ao programa *Primer3 Plus* para o desenho dos oligonucleotídeos utilizando os parâmetros automáticos para PCR convencionais ou para q-PCR (Untergasser *et al.*, 2007).

3.2 Controles utilizados nos métodos de q-PCR

Para todos os grupos de reações efetuadas, foram utilizados os controles negativo (CN) compostos pela matriz adicionada de todos os componentes que a acompanham, exceto o agente infeccioso a ser diagnosticado. Os controles positivos (CP), que foram as diluições do plasmídeo, o controle branco (CBR) composto apenas pelos reagentes utilizados na reação, o controle de extração (CBE) contendo apenas água tratada com DPEC. Foi utilizado como controle interno (CI) a q-PCR para detecção de β -actina, que serviu como gene normalizador do método validado.

3.3 Padronização dos ensaios de q-PCR

Todas as reações de padronização foram realizadas com base em uma curva de diluição seriada na base cinco do controle positivo em água tratada com DPEC nas concentrações variando de 10^{-1} (0,1ng/ μ L) a 10^{-6} (0,000032ng/ μ L) em duplicata. A curva de diluição foi submetida a quatro padronizações diferentes para avaliar as melhores concentrações dos iniciadores, de $MgCl_2$, a temperatura mais adequada de T_m e o reagente comercial *Master mix* mais adequado. Os testes iniciais para padronizar as concentrações dos iniciadores foram realizados utilizando o *Master mix* (*Melt Doctor™ HRM Master Mix*) e detecção por *SYBR® Green*. Foram analisadas três concentrações diferentes para a definição do melhor protocolo. As reações de padronização que apresentaram os melhores valores de sensibilidade e eficiência foram submetidas ao processo de verificação de desempenho. Todos os testes de padronização da q-PCR foram compostas por *Master Mix*, $MgCl_2$ 25mM (Promega), um par de iniciadores, sonda *TaqMan®* (ou *SYBR® Green*) e água livre de DNase totalizando um volume total por tubo ou poço de 23 μ L. Os testes de padronização da q-PCR foram submetidas à ciclagem para amplificação do gene alvo no equipamento CFX96™ *Real-Time System* (BIO-RAD USA) ou no equipamento *RotorGene* (Qiagen, Alemanha) dependendo da disponibilidade de cada um dos equipamentos.

3.4 Sequenciamento

Os resultados gerados pelos métodos de q-PCR positivos para PCPV foram sequenciados para a confirmação. As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando o *kit Big Dye Terminator* (*Life Technologies*, Estados Unidos) em termociclador *Veriti* (*Life Technologies*, Estados Unidos) com ciclagem recomendada pelo fabricante. Os resultados do sequenciamento foram armazenados na forma de

cromatogramas processados automaticamente pelo equipamento mencionado. Os eletroferogramas foram analisados utilizando o *software Bioedit*. As sequências foram submetidas ao *BLAST* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para identificação de acordo com o valor e a identidade.

4 | ETAPAS DA VALIDAÇÃO

4.1 Curva de sensibilidade

A curva de sensibilidade foi determinada para todas as reações dos métodos. Essa etapa foi essencial para avaliar a funcionalidade dos iniciadores, do plasmídeo, a eficiência das reações, do *Tm* e da sensibilidade analítica conforme anteriormente definida. Para esse experimento, as diluições seriadas do CPS (0,1ng/ μ L) foram realizadas a partir da diluição 1×10^{-1} (0,01ng/ μ L) foram realizadas três diluições na base dez (1×10^{-2} ao 1×10^{-4}) e, sequencialmente, foram realizadas quatro diluições na base cinco (1×10^{-5} a 1×10^{-8}) em duplicatas. As concentrações das diluições do CPS utilizados nas curvas de sensibilidade estão descritas na TABELA 1.

Reação	Concentrações dos pontos da curva de sensibilidade							
PCPV	base 10				base 5			
	1×10^{-1}	1×10^{-2}	1×10^{-3}	1×10^{-4}	1×10^{-5}	1×10^{-6}	1×10^{-7}	1×10^{-8}
	0,01 ng	0,001 ng	0,1 pg	0,01 pg	0,002 pg	0,4 fg	0,08 fg	0,0016 fg

Tabela 1- Concentrações de cada diluição do CPS utilizados nas curvas de sensibilidade

4.2 Limite de Detecção – LD

O limite de detecção (LD) foi calculado da seguinte maneira: as amostras de tecido epitelial de língua bovina foram fracionadas em nove fragmentos de aproximadamente 25 mg. O CPS na concentração inicial de 0,1ng/ μ L foi diluído sucessivamente para as concentrações descritas detalhadamente na TABELA 1. Para cada suspensão obtida de CPS, foram separadas duas alíquotas, sendo que a uma delas foi adicionado à amostra de língua bovina. O DNA de ambas as alíquotas (na presença e na ausência da matriz) foi extraído. Os ácidos nucleicos foram submetidos ao método q-PCR em duplicatas. Todos os controles (CP, CN, CBE, CEE, CBR) foram utilizados em todas as etapas descritas acima. Durante a etapa do cálculo do LD foi possível calcular a eficiência da q-PCR. A partir das diluições em série, traçou-se uma curva padrão para que o programa defina a eficiência (entre 90 e 110%), o R^2 (maior do que 0,99) e o *Slope* da curva padrão, que deve ser de

aproximadamente – 3,32, indicando uma reação de PCR com 100% de eficiência.

4.3 Sensibilidade em matriz

Simultaneamente com o cálculo do LD foi avaliado o efeito da interferência da matriz (amostras) na q-PCR. Utilizamos as sete diluições do CPS para contaminação das amostras negativas. Então, realizamos os ensaios em duplicata, com alíquotas contendo somente as diluições do CPS e alíquotas contendo a matriz contaminada com as diluições do CPS.

5 | VERIFICAÇÃO DE DESEMPENHO

5.1 Repetibilidade e Robustez

Para a análise da repetibilidade dos métodos de q-PCR, foram utilizadas as sete parcelas experimentais definidas a partir do LD. O DNA dessas amostras foi extraído e analisado em triplicata. A etapa de extração do DNA e a realização dos ensaios foram realizadas em três dias diferentes utilizando o mesmo equipamento de termociclagem. Um segundo analista realizou a etapa de extração e os ensaios utilizando as mesmas amostras e os mesmos critérios para avaliar as possíveis variações no teste. A robustez do método é a medida de sua capacidade em não ser afetado por variações nas condições do experimento. Para a avaliação da robustez das reações envolvidas neste método foi escolhida a variável equipamento. Os equipamentos selecionados para a realização da robustez do método de q-PCR foram: O CFX96™ *Real-Time System* (BIO-RAD, USA) e o *RotorGene* (Qiagen, Alemanha). As reações foram realizadas utilizando o mesmo protocolo padrão em equipamentos diferentes, acima citados, em dias diferentes, no mesmo laboratório pelo mesmo analista. A avaliação dos resultados foi realizada utilizando o critério de coeficiente de variação (CV) a partir dos valores de média e desvio padrão dos *Ct* obtidos. Os resultados foram representados em porcentagem com tolerância de até 30% de variação.

5.2 Reprodutibilidade

Para avaliar a reprodutibilidade do método de q-PCR, foram utilizadas as sete parcelas experimentais definidas a partir do LD. A extração foi realizada e as análises foram feitas em triplicata. O teste de reprodutibilidade foi realizado com a finalidade de avaliar as possíveis diferenças entre os resultados obtidos, utilizando dois tipos diferentes de reagentes *Master mix* e dois tipos diferentes de equipamentos termocicladores para os ensaios de q-PCR. Para execução do experimento, foram utilizados o *Real Q-PCR Master mix 2x Kit - Ampliqon®* e o equipamento *RotorGene* (Qiagen, Alemanha). Os *Ct* obtidos foram usados para a comparação dos resultados. Os valores foram representados em porcentagem com tolerância de até 30% de

variação.

5.3 Especificidade Analítica

Foram analisadas, juntamente com o controle positivo, 80 amostras sabidamente negativas provenientes de animais sem histórico de infecção. O objetivo foi avaliar a capacidade do método q-PCR desenvolvido em discernir o DNA alvo dos outros componentes da matriz que possam ser detectados no ensaio.

5.4 Especificidade Analítica pelo critério de Exclusividade

Para a realização deste teste, selecionamos previamente doze amostras positivas para outros agentes virais, sendo uma amostra clínica positiva para BoHV, cinco amostras clínicas positivas para VACV, três amostras clínicas positivas para BVDV e três amostras positivas para FMDV (Titulação viral). O objetivo foi avaliar a exclusividade do método q-PCR em detectar somente o gene alvo de PCPV com a ausência de reatividade cruzada.

5.5 Análise Estatística e critérios de aceitação do método q-PCR

Os valores de *Cycle threshold* (*Ct*) obtidos na Verificação de Desempenho foram avaliados em triplicata para cada ensaio realizado, considerando as variações das q-PCR, dos dias, dos analistas, dos equipamentos e dos reagentes para Análise de Variância – ANOVA. A determinação das variâncias dos erros das medidas em repetibilidade e reprodutibilidade foram utilizadas para a verificação da aceitabilidade do sistema de medidas de acordo com o Manual de verificação de desempenho de métodos para diagnóstico molecular de doenças infecciosas na rede nacional de laboratórios agropecuários do Ministério da Agricultura (Fonseca Jr. *et al.*, 2014; MAPA, 2011).

6 | UTILIZAÇÃO DOS MÉTODOS DE DETECÇÃO Q-PCR EM AMOSTRAS CLÍNICAS

O desempenho do método q-PCR foi avaliado utilizando 44 amostras clínicas de crostas ou do epitélio de lesões orais bovinas. As amostras são provenientes de várias regiões brasileiras que foram enviadas ao Laboratório de Biologia Molecular - LBM / LANAGRO/MG para a realização do diagnóstico molecular, abrangendo diversas doenças vesiculares, incluindo FMDV. As amostras positivas para o gênero *Parapoxvirus* foram previamente selecionadas para execução deste experimento.

6.1 Confirmação dos resultados

Para confirmar os resultados positivos gerados pelo método q-PCR foi realizado o sequenciamento de todas as amostras positivas para PCPV, por meio das amplificações obtidas pela PCR convencional.

7 | RESULTADOS

7.1 Limite de Detecção – LD

Conforme os resultados obtidos, foi determinada como o limite de detecção para o método de q-PCR para detecção do PCPV, a diluição 1×10^{-5} [0,002 pg/ μ L], utilizando detecção por *SYBR® Green*. Os resultados obtidos foram satisfatórios apresentando valores de Eficiência, *Slope* e de R^2 adequados para os critérios de aceitabilidade para o método. O mesmo teste de LD foi realizado utilizando a detecção por sonda *TaqMan®*, porém os resultados foram insatisfatórios apresentando valores de Eficiência, *Slope* e R^2 inadequados.

7.2 Sensibilidade em matriz e controle interno

O efeito da interferência da matriz na q-PCR foi avaliado simultaneamente com as análises para a determinação do LD. A comparação entre as duas curvas permitiram a avaliação da perda de eficiência do método q-PCR quando o DNA alvo se encontra diluído no material genético da matriz. Os resultados foram úteis para avaliar o comportamento das reações e suas particularidades utilizando uma matriz bovina homogênea permitindo a comparação entre os *Ct* das curvas. Observa-se que o DNA da matriz exerce influência no desempenho da q-PCR. Portanto, assume-se o efeito de matriz nas reações do método.

As reações para a detecção da β -*actina* foram realizadas em todas as amostras de tecido epitelial de língua bovina utilizadas neste trabalho. Os resultados foram positivos, demonstrando boa extração de DNA e com ausência de inibidores na reação (dados não mostrados).

7.3 Repetibilidade

A repetibilidade foi avaliada através da medida de concordância ou conformidade entre resultados utilizando um mesmo método, o mesmo equipamento CFX96™ *Real-Time System* (BIO-RAD, USA) e o mesmo processo de extração dado às amostras, variando os analistas, em três dias diferentes. A repetibilidade do método foi estimada através dos resultados de coeficiente de variação (CV), a partir dos valores de média e desvio padrão dos valores *Ct* obtidos em cada ensaio. A partir dos *Ct* obtidos em cada replicata, foi realizada a análise de variância (ANOVA), onde é possível verificar os valores de variância dos ensaios realizados. De acordo com os resultados obtidos nesta análise, concluiu-se que os sistemas de medida executados pelos dois analistas são semelhantes, apresentando uma variância total no erro de análise de 4,82%. A variância entre os analistas foi de 0% e entre os dias foi de 1,18%. A alta porcentagem de variância observada, entre as parcelas experimentais, é um resultado normal, que confirma a existência de variações entre as parcelas, o que é intrínseco da extração do DNA e, também ao fato da dosagem

de DNA adicionada nas PCRs, não ser mensurada. A análise dos resultados obtidos foi realizada através do coeficiente de variação (CV), a partir dos valores de média e desvio padrão dos *Ct* com tolerância de até 30% de variação.

7.4 Robustez e Reprodutibilidade

Para a realização dos experimentos, foram utilizados como variações o equipamento e o reagente *Master mix*. As amostras foram analisadas em triplicata, em três dias diferentes pelo mesmo analista utilizando o *Real Q-PCR Master mix Kit - Ampliqon®* e o equipamento *RotorGene* (Qiagen, Alemanha). Os resultados dos *Ct* obtidos foram usados para a comparação entre os resultados obtidos utilizando o equipamento *CFX96™ Real-Time System* (BIO-RAD, USA) e o *Master Mix Quantifast* (Qiagen). A análise dos resultados obtidos foi realizada através do coeficiente de variação (CV), a partir dos valores de média e desvio padrão dos *Ct* com tolerância de até 30% de variação. Os testes de robustez e reprodutibilidade tiveram a finalidade de verificar as possíveis diferenças entre os resultados obtidos através de variações deliberadas para os ensaios de q-PCR.

Os resultados obtidos foram satisfatórios nos experimentos realizados. A variância total do erro de análise da reprodutibilidade foi de 3,01%, entre os dias a variância foi de 0% e entre os reagentes *Master mix* a variância foi de 19,71%. A variância do total do erro de análise da robustez foi de 4,77%, a variância entre as diluições foi de 0% e a variância entre os equipamentos foi de 2,76%. Os resultados alcançados comprovam a capacidade do método de q-PCR de manter seu desempenho analítico inalterado por variações nas condições do experimento. Vale ressaltar que, a alta porcentagem de variância observada entre as parcelas experimentais, é um resultado normal, confirmando a existência de variações entre as parcelas, o que é intrínseco da extração do DNA e, também ao fato da dosagem de DNA adicionada nas PCRs, não ser mensurada.

7.5 Especificidade Analítica

Para avaliar a especificidade dos métodos de q-PCR foram analisadas oitenta amostras negativas de tecido epitelial de língua bovina juntamente com o controle positivo. O objetivo foi verificar a capacidade dos métodos desenvolvidos em discernir o DNA alvo dos outros componentes da matriz. Os resultados de especificidade obtidos pela análise realizada em q-PCR e detecção por sonda *TaqMan®* mostraram amplificação somente do controle positivo. Nas demais amostras não houve amplificações, conforme o esperado. O teste certifica a capacidade do método q-PCR em discernir o DNA alvo dos outros componentes da matriz. No experimento utilizando a detecção por *SYBR® Green*, diversas amplificações inespecíficas foram observadas, evidenciando uma característica limitante relacionado ao sistema de detecção. Portanto, entre as duas químicas de detecção avaliadas, a detecção por a

sonda *TaqMan*[®] apresentou o melhor resultado para o método q-PCR.

7.6 Especificidade Analítica pelo critério de Exclusividade

Para a realização dos testes de especificidade analítica por exclusão utilizamos amostras positivas para outros agentes virais. Foi previamente selecionado um total de doze amostras positivas sendo: uma amostra positiva de BoHV, cinco amostras positivas de VACV, três amostras positivas de BVDV e três amostras positivas de FMDV. As amostras positivas foram analisadas utilizando o método q-PCR desenvolvido, com a finalidade de avaliar a sua capacidade em detectar somente a sequência alvo de PCPV e excluir as outras sequências virais. Os resultados obtidos neste experimento mostraram ampliações na amostra de BoHV com um *Ct* de 39,92 e em três amostras de VACV com *Ct* de 39,39 ; 39,72 e 38,00 no final da reação. Nas outras oito amostras analisadas, não foi observado amplificação. Os resultados concluem que, para o método q-PCR desenvolvido, o valor máximo aceitável do *Ct* é de 37,00. Valores de *Ct* acima desse valor serão considerados inespecíficos para o diagnóstico de PCPV. Portanto, este critério deverá ser obrigatório para a conclusão final de um diagnóstico utilizando este método q-PCR.

8 | UTILIZAÇÃO DOS MÉTODOS Q-PCR PARA ANÁLISE EM AMOSTRAS CLÍNICAS

O desempenho dos métodos q-PCR foram avaliados utilizando quarenta e quatro amostras clínicas bovinas. As amostras com o resultado positivo para o gênero *Parapoxvirus* foram previamente selecionadas e reanalisadas, desta vez, utilizando os métodos q-PCR para a detecção específica de PCPV, desenvolvidos neste trabalho. As mesmas amostras foram submetidas também aos métodos de q-PCR específica para o BPSV, com a finalidade de obter um resultado complementar. O desempenho do método q-PCR demonstrado na rotina do Laboratório de Biologia Molecular - LBM / LANAGRO – MG foi bastante satisfatória proporcionando um resultado rápido e específico para PCPV. As cinco amostras que apresentaram resultado positivo para PCPV foram sequenciadas para a confirmação dos resultados obtidos.

9 | CONCLUSÃO

No processo de validação, o método desenvolvido apresentou resultados bem sucedidos para os critérios de sensibilidade, robustez, repetibilidade, reprodutibilidade e especificidade analítica. O método q-PCR apresentou também, resultados bem sucedidos quando utilizados para a análise de amostras clínicas, demonstrando aptidão para o uso em rotina laboratorial. De acordo com os resultados da análise de especificidade analítica, realizada para o método de q-PCR, o valor máximo aceitável

do *Ct* é de 37,00. Amplificações que apresentarem *Ct* acima desse valor devem ser consideradas inespecíficas para o diagnóstico de PCPV. Este é um critério obrigatório para a conclusão final de um diagnóstico utilizando o método q-PCR validado neste trabalho. O método q-PCR para detecção de PCPV foi utilizado em escala experimental na rotina laboratorial com a utilização de quarenta e quatro amostras clínicas com o diagnóstico positivo para o gênero *Parapoxvirus*. O teste alcançou resultados satisfatórios e específicos demonstrando a capacidade do método em determinar a espécie viral estudada com rapidez, precisão e especificidade. Os resultados bem sucedidos da validação permitiram a inclusão do método de q-PCR para detecção diferencial do PCPV no Laboratório de Biologia Molecular - LBM / LANAGRO – MG com capacidade e competência para emitir diagnósticos oficiais específicos e precisos.

REFERÊNCIAS

ABRAHÃO, J. S. *et al.* Human Vaccinia virus and Pseudocowpox virus co-infection: clinical description and phylogenetic characterization, **Journal of Clinical Virology**, v.: 48, n.:1, p.: 69-72, 2010.

ALVES, A. P. *et al.* Occurrence of *Pseudocowpox virus* associated to *Bovine viral diarrhea virus-1*, Brazilian Amazon, **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, V.: 49, p.: 70–75, 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Guia de Validação e Controle de Qualidade Analítica**, MAPA, 2011.

CAMPOS, R. K. *et al.* Assessing the variability of Brazilian vaccinia virus isolates from a horse exanthematic lesion: Coinfection with distinct viruses. **Archives of Virology**, v.: 156, n.: 2, p.: 275-283, 2011.

CANAL, C. W; DIEHL, D. G. **Virologia Veterinária**: In: Flores, E. F. 2ªed. Editora: UFSM, p.: 571-603, 2012.

CARGNELUTTI, J. F. *et al.* Pseudovaríola e estomatite papular em bovinos no Estado de Rondônia, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.: 44, n.: 3, p.: 479-485, 2014.

FONSECA, Jr. A. A; GOUVÊA, M. V; ZARONI, M. M. H. **Manual de Verificação de Desempenho de Métodos para Diagnóstico Molecular de doenças Infeciosas na Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários**: Ministério da agricultura pecuária e abastecimento. Secretaria de defesa agropecuária. Coordenação-geral de apoio laboratorial. 1ª ed. Brasília: Mapa/SDA/CGAL: Biblioteca Nacional de Agricultura – BINAGRI, 2014.

HAUTANIEMI, M. *et al.* The genome of pseudocowpoxvirus: comparison of a reindeer isolate and a reference strain, **Journal General Virology**, v.: 91, p.: 1560-1576, 2010.

IKETANI, Y. *et al.* Persistent parapoxvirus infection in cattle, **Microbiology and Immunology**, v.: 46, p.: 285-91, 2002.

LEDERMAN, E.R. *et al.* An Investigation of a Cluster of Parapoxvirus Cases in Missouri, Feb–May 2006: Epidemiologic, Clinical and Molecular Aspects, **Animals (Basel)**, v.: 3, n.: 1, p.: 142-157, 2013.

NASCIMENTO, L. M. Detection of pseudocowpox virus in water buffalo (*Bubalus bubalis*) with vesicular disease in the state of São Paulo, Brazil, in 2016. **Veterinary Quarterly**, v.: 37, n.: 1, p.: 16-22, 2016.

NASCIMENTO, L. M. *et al.* Detection of multiple viral infections in cattle and buffalo with suspected vesicular disease in Brazil. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.: 28, n.: 4, p.: 377 – 381, 2016.

OLIVEIRA, C. H. *et al.* Multifocal cutaneous ORF virus infection in goats in the Amazon region, Brazil. **Vector borne and a zoonotic diseases**, v.: 12, n.: 2, p.: 336-40, 2012.

SANT'ANA, F. J. *et al.* Coinfection by Vaccinia virus and an Orf virus-like parapoxvirus in an outbreak of vesicular disease in dairy cows in midwestern Brazil. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.: 25 n.: 2. p.: 267-272, 2013.

SARDI, I. S. *et al.* Primeiro relato do vírus Orf em rebanhos caprinos do semi-árido brasileiro. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v.: 71. n.: 3, p.: 597-600, 2012.

SCAGLIARINI, A. *et al.* Parapoxvirus infections of red deer, Italy, **Emerging Infectious Diseases**, v.: 17, n.: 4. p.: 684-7, 2011.

UNTERGASSER, A. *et al.* Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3, **Nucleic Acids Research**, v.: 35, p.: 71-74, 2007.

SOBRE O ORGANIZADOR

BENEDITO RODRIGUES DA SILVA NETO - Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade do Estado de Mato Grosso (2005), com especialização na modalidade médica em Análises Clínicas e Microbiologia (Universidade Candido Mendes - RJ). Em 2006 se especializou em Educação no Instituto Araguaia de Pós graduação Pesquisa e Extensão. Obteve seu Mestrado em Biologia Celular e Molecular pelo Instituto de Ciências Biológicas (2009) e o Doutorado em Medicina Tropical e Saúde Pública pelo Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (2013) da Universidade Federal de Goiás. Pós-Doutorado em Genética Molecular com concentração em Proteômica e Bioinformática (2014). O segundo Pós doutoramento foi realizado pelo Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Aplicadas a Produtos para a Saúde da Universidade Estadual de Goiás (2015), trabalhando com o projeto Análise Global da Genômica Funcional do Fungo *Trichoderma Harzianum* e período de aperfeiçoamento no Institute of Transfusion Medicine at the Hospital Universitätsklinikum Essen, Germany. Seu terceiro Pós-Doutorado foi concluído em 2018 na linha de bioinformática aplicada à descoberta de novos agentes antifúngicos para fungos patogênicos de interesse médico. Palestrante internacional com experiência nas áreas de Genética e Biologia Molecular aplicada à Microbiologia, atuando principalmente com os seguintes temas: Micologia Médica, Biotecnologia, Bioinformática Estrutural e Funcional, Proteômica, Bioquímica, interação Patógeno-Hospedeiro. Sócio fundador da Sociedade Brasileira de Ciências aplicadas à Saúde (SBCSaúde) onde exerce o cargo de Diretor Executivo, e idealizador do projeto “Congresso Nacional Multidisciplinar da Saúde” (CoNMSaúde) realizado anualmente, desde 2016, no centro-oeste do país. Atua como Pesquisador consultor da Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de Goiás - FAPEG. Atuou como Professor Doutor de Tutoria e Habilidades Profissionais da Faculdade de Medicina Alfredo Nasser (FAMED-UNIFAN); Microbiologia, Biotecnologia, Fisiologia Humana, Biologia Celular, Biologia Molecular, Micologia e Bacteriologia nos cursos de Biomedicina, Fisioterapia e Enfermagem na Sociedade Goiana de Educação e Cultura (Faculdade Padrão). Professor substituto de Microbiologia/Micologia junto ao Departamento de Microbiologia, Parasitologia, Imunologia e Patologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da Universidade Federal de Goiás. Coordenador do curso de Especialização em Medicina Genômica e Coordenador do curso de Biotecnologia e Inovações em Saúde no Instituto Nacional de Cursos. Atualmente o autor tem se dedicado à medicina tropical desenvolvendo estudos na área da micologia médica com publicações relevantes em periódicos nacionais e internacionais. Contato: dr.neto@ufg.br ou neto@doctor.com

ÍNDICE REMISSIVO

A

Alimentos 13, 119, 120, 124, 154, 180, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 212

Allium sativum 14, 15, 16, 19, 20, 21

Análise 4, 12, 13, 21, 58, 59, 65, 68, 76, 80, 98, 99, 102, 105, 106, 107, 114, 116, 120, 143, 150, 168, 170, 173, 174, 175, 176, 177, 187, 189, 212, 214

Antibiograma 117, 118, 121, 122, 123, 149, 156, 159, 160

Antibióticos 14, 16, 19, 20, 97, 108, 110, 119, 124, 125, 128, 129, 130, 132, 133, 141, 142, 146, 149, 150, 151, 153, 154, 155, 156, 158, 159, 160, 161, 163, 164, 166, 197

B

Bactérias 1, 4, 5, 7, 8, 14, 16, 17, 18, 19, 108, 109, 110, 111, 118, 119, 120, 121, 123, 124, 130, 132, 141, 142, 144, 148, 154, 155, 157, 158, 160, 161, 162, 180, 184, 185, 186, 188, 195, 198, 212

Bacteroides 44, 45, 46, 47, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 125

Biofilme 71, 118, 122, 124, 125, 127, 131, 132, 133, 134

Bioindicador 7, 8, 98, 107

Bioinformática 55, 57, 65, 214

Bovinos 112, 113, 114, 116, 161, 162, 168, 169, 178

C

Candida 68, 69, 70, 71, 72, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81

Candidemia 68, 69, 74, 75, 76, 77, 80, 81

Carbapenêmicos 108, 109, 149, 159

Cloranfenicol 14, 16, 17, 18

Contaminação biológica 1

D

Dengue 23, 24, 25, 28, 29, 30, 31, 35, 36, 37, 38, 57

Diagnóstico molecular diferencial 168

E

Enterococcus 8, 82, 83, 85, 86, 90, 91, 92, 93, 96, 97, 117, 118, 122

Epidemiologia 53, 68, 80, 152

Epítomos imunodominantes 55, 57, 59, 61, 64

Escherichia coli 1, 2, 4, 8, 12, 14, 15, 16, 19, 20, 46, 61, 77, 97, 109, 122, 140, 141, 143, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 164, 165, 166, 198, 199, 200, 201, 212

F

Fasciolose 112, 113, 116

G

Genética molecular 153

I

Infecção 23, 45, 56, 57, 68, 70, 71, 72, 75, 76, 78, 80, 108, 111, 115, 126, 127, 128, 131, 132, 133, 142, 149, 154, 169, 174

Infecção intra-abdominal 45

L

Laboratórios 1, 3, 9, 11, 16, 174, 178

Líquén 98, 100, 102, 107

M

Microbiologia 44, 55, 68, 76, 82, 102, 107, 117, 120, 125, 151, 152, 153, 167, 187, 204, 214

Microrganismos patogênicos 1, 2, 11, 12

Modelo murino 23

O

Oportunista 68, 70, 126, 127

P

Parabacteroides 44, 45, 46, 47

Peptídeos 44, 55, 57, 59, 122, 124, 131, 132

Poluição 98, 99, 100, 101, 103, 104, 105, 106

Proteínas recombinantes 55, 64, 65

Pseudocowpoxvirus 168, 169, 178

Q

q-PCR 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178

Quatro tamises 112, 113, 114, 116

R

Resistência 12, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 68, 70, 71, 74, 80, 97, 108, 109, 110, 119, 121, 123, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 140, 141, 142, 146, 147, 149, 150, 152, 153, 154, 155, 156, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 189, 204

Resistência antimicrobiana 15, 131, 141, 160

Rotinas de higienização 1, 5, 9, 11, 12

Rotinas de Higienização 1, 6

S

Serviços de Saúde para Idosos 180

Sistema nervoso central 23

Staphylococcus aureus 8, 14, 15, 16, 19, 20, 21, 117, 118, 119, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 130, 134, 135, 136, 137, 138, 139

Substância antagonista 44, 45

V

Validação 168, 170, 177, 178, 198

Z

Zika vírus 55, 58, 64, 65, 66

Agência Brasileira do ISBN
ISBN 978-85-7247-772-7



9 788572 477727