

TÉCNICAS DE IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO VIRAL

Data de submissão: 17/12/2024

Data de aceite: 02/01/2025

Adriana Moraes da Silva

<http://lattes.cnpq.br/8915531681172346>

Ana Maria de Souza Almeida

Maria Luiza Ribeiro Silva

<http://lattes.cnpq.br/6189950926334865>

Wilia Marta Elsner Diederichsen de Brito

<http://lattes.cnpq.br/7605775995731168>

1 | INTRODUÇÃO

A identificação definitiva do agente possibilita a escolha do melhor protocolo de tratamento, facilita a definição das ações preventivas e de controle a serem implementadas, muitas vezes impedindo a disseminação do agente e até mesmo uma possível epidemia, contribui para o desenvolvimento de vacinas e para a definição de aspectos patogênicos e epidemiológicos (GYARMATI, 2008, SHIA et al. 2023).

A detecção de agentes virais pode ser realizada com o uso de métodos diretos ou indiretos. A microscopia eletrônica é o

único método que permite a observação da partícula viral. Os demais métodos diretos detectam a presença do antígeno viral, ácidos nucleicos, proteínas ou pela visualização de efeitos citopatogênicos em cultivo celular. Já os métodos indiretos detectam anticorpos específicos contra o vírus (FLORES, 2007).

Como rotina para o diagnóstico viral, são utilizadas técnicas de diagnóstico sorológico ou isolamento viral, consideradas técnicas padrão, que, todavia, não permitem a caracterização de tipos e subtipos virais. Além disso, o isolamento viral apresenta como desvantagem a necessidade de material clínico bem conservado, já que exige a presença da partícula viral viável (TAKIUCHI et al., 2001, LIU et al., 2022).

A biologia molecular melhorou significativamente os métodos de diagnóstico em virologia, a descoberta e rápida implementação de novas técnicas tem sido beneficiada pelo intenso desenvolvimento de técnicas moleculares (DEVIKA et al., 2024). Estas técnicas permitem a caracterização genotípica

e antigênica de agentes virais proporcionando melhor entendimento da patogênese dos diferentes tipos e subtipos, além de ser um instrumento seguro para o entendimento da etiologia e epidemiologia molecular das enfermidades (AKTER et al., 2024, FANEYE et al., 2024). A recente revolução molecular de métodos laboratoriais tem sido um importante instrumento na detecção de novos patógenos presentes na virologia clínica (HOFFMAN et al., 2009; WANG et al., 2024).

Para a caracterização viral podem ser utilizadas várias técnicas, as mais comuns a serem utilizadas são: técnicas sorológicas com anticorpos monoclonais (AcMs), (SOUZA et al., 2002; DUAN et al., 2024), análise de restrição por endonucleases (REA) ou “restriction fragment length polymorphism” (RFLP), (D’ARCE et al., 2002), reação em cadeia da polimerase (PCR) (BHAD et al., 2024) ou sequenciamento genômico (DELHON et al., 2003; Balakrishnan et al., 2024).

Não basta técnicas seguras e eficazes, para todos os tipos de diagnósticos, os resultados dependem em grande parte da qualidade do material a ser analisado. A coleta e acondicionamento são críticos para o sucesso do diagnóstico (KENNEDY, 2005; FLORES, 2007). Para as técnicas sorológicas o soro deve ser mantido refrigerado evitando crescimento bacteriano e permitindo a manutenção dos anticorpos (KENNEDY, 2005). A temperatura de armazenamento é um ponto crucial para o cultivo celular, alguns vírus são extremamente lábeis a temperatura, como também apresentam sensibilidade a pH, químicos e exposição a condições ambientais (FLORES, 2007).

Em vista do exposto, a utilização de técnicas que permitem a detecção e caracterização de agentes com rapidez e eficácia é cada vez mais necessária. Seja para o rápido diagnóstico e aplicação do correto protocolo de tratamento, ou para o melhor conhecimento molecular epidemiológico e etiopatogênico dos agentes virais, visando o aprimoramento de medidas de controle e o desenvolvimento de vacinas mais eficazes.

2 | TÉCNICAS DE ROTINA PARA DIAGNÓSTICO VIRAL

O isolamento viral em cultivo celular (ICC) é indispensável para a obtenção dos agentes virais oriundos de espécimes clínicos. É um dos métodos mais sensíveis de detecção viral, disponibiliza o agente para estudos posteriores e tem implementação e execução relativamente simples (FLORES, 2007; LAPOSOVA et al., 2017). Normalmente são utilizadas culturas de células primárias derivadas de rim de macaco, canino, felino, bovino ou células embrionárias de camundongo e galinha entre outras (FLINT et al., 2000; GAO et al., 2025).

É um método demorado, podendo levar 1 a 3 semanas, sendo esta a principal restrição em comparação aos outros, além disso, somente detecta vírus que estejam viáveis, não sendo aplicável a todos. Podem ocorrer contaminações bacterianas, fúngicas ou até mesmo vírus adventícios (KENNEDY, 2005; FLORES, 2007). Para alguns vírus é

necessário cultivo em ovo embrionado e não em cultivo celular como método de isolamento e crescimento viral (KENNEDY, 2005).

Os vírus quando infectam as células, promovem sua destruição, infectam novas células produzindo mais alterações e possibilitando a visualização destas alterações no tapete celular, os chamados efeitos citopáticos (ECP). Pode ocorrer como ECP o arredondamento e/ou separação das células da superfície da placa ou garrafa de cultivo, lise celular, tumefação nuclear, formação de sincícios, corpúsculos de inclusão e vacuolização do citoplasma. Alguns vírus, no entanto, fazem a multiplicação em cultivo celular sem produzir efeito citopático, nestes casos o uso não é recomendado (FLINT et al., 2000; GAO et al., 2025).

Posteriormente ao isolamento viral, mesmo sem ECP, é necessário fazer a identificação definitiva do antígeno. Normalmente são utilizadas as técnicas de imunofluorescência (IFA) ou imunoperoxidase (IPX) para a detecção do antígeno viral (BRUM & WEIBLEN, 2007). Já no método diagnóstico da raiva, não é realizado o ICC, faz-se a IFA a partir da amostra seguida da prova biológica (inoculação em camundongos). A IFA é realizada com corantes fluorescentes o mais usado é o isotiocianato de fluoresceína (FICT), um componente de coloração amarela, quimicamente ligado ao anticorpo sem afetar a reatividade. Quando colocado frente à luz ultravioleta em microscópio específico ocorre emissão de luz verde visível a 525nm. Pode ser realizada de forma direta para detecção de antígeno ou na forma indireta para mensurar anticorpos (TIZART, 2019).

Utilizando o mesmo princípio da IFA, a IPX também é utilizada para detecção de antígenos, com a diferença que os anticorpos são marcados com enzima, a mais utilizada é a *horseradish peroxidase* (HRPO ou peroxidase), visualizada com adição de substrato cromogênico, que dará coloração marrom sendo visualizada em microscopia comum (BRUM & WEIBLEN, 2007).

Com custo ainda elevado na Medicina Veterinária, os testes tipo ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) são realizados em microplacas de 96 cavidades com leitura no leitor de ELISA. Também podem ser utilizados dispositivos descartáveis, os quais não necessitam de laboratórios especializados podendo ser executados na clínica, mesmo assim o custo é elevado (BRUM & WEIBLEN, 2007; TIZART, 2019). Existem somente detecta vírus que estejam viáveis comerciais para a detecção de anticorpos ou para detecção de antígeno, o princípio da técnica é semelhante ao da IPX, tendo antígeno ou anticorpo marcado com enzima, que será revelado com o uso de substrato (FLORES, 2007).

A soroneutralização (SN) é uma técnica bastante difundida em virologia, o princípio da técnica é baseado na ação neutralizante de anticorpos (Ac) presentes no soro. Além de fazer a detecção de Ac permite a sua titulação. Em placas de 96 orifícios, faz-se a diluição do soro a ser testado, e incuba-se com vírus e célula. Quando houver Ac no soro, as células estarão intactas e quando apresentar ECP é indicativo da ausência de AC, pois não haverá

a neutralização dos vírus (BRUM & WEIBLEN, 2007; TIZART, 2019).

Para agentes com capacidade hemaglutinante podem ser usadas as técnicas de hemaglutinação (HA) para detecção de antígeno e teste de inibição da hemaglutinação (HI) para detecção de anticorpos, usadas para diagnóstico de Influenza e Doença de Newcastle. A imunodifusão em gel de ágar (IDGA) para detecção de anticorpos para anemia infecciosa eqüina, leucose enzoótica bovina, artrite-encefalite caprina e língua azul. Também é possível fazer a detecção de anticorpos pela fixação de complemento (FC) (MURPHY et al. 1999; FLINT et al., 2000; FLORES, 2007; ZHANG et al., 2024).

3 I TÉCNICAS DE IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO VIRAL

A variação na apresentação clínica das viroses, a ocorrência de síndromes distintas associadas com o mesmo agente ou, ainda, a ocorrência de manifestações clínicas semelhantes produzidas por diferentes vírus, fazem com a identificação e caracterização dos agentes infecciosos seja essencial para o seu diagnóstico.

3.1 Detecção de antígenos virais com anticorpos monoclonais (AcMs)

Anticorpos monoclonais (AcMs) tem sido produzido para vários antígenos, incluindo os antígenos virais. Para identificação e caracterização de tipos e subtipos virais, mapeamento de epítomos neutralizantes, estudos da biologia e das interações do vírus com o sistema imunológico além da aplicação em diversas técnicas de diagnóstico (WINKELMANN et al., 2007).

O uso dos anticorpos monoclonais para detecção de antígenos virais é normalmente realizado nas técnicas de imunofluorescência (IFA) ou imunoperoxidase (IPX), apresentando boa sensibilidade, especificidade, rapidez, custo baixo e facilidade de execução (FLORES, 2007).

Para produzir anticorpos monoclonais, linfócitos B são removidos do baço de animal (normalmente camundongo) no qual o antígeno do anticorpo desejado tenha sido previamente inoculado. Esses linfócitos são então «fundidos» com células de mieloma (tumores de linfócitos B), que tem a capacidade de se reproduzir em cultura, indefinidamente. As células resultantes dessa fusão são denominadas de hibridomas (WARD, 1999). Anticorpos monoclonais derivados de hibridomas são puros e específicos, podem ser utilizados como reagentes padrão e são obtidos em grande quantidade (TIZARD, 2009).

3.1.1 Produção do antígeno e imunização de camundongos

Para a produção de antígeno viral, o vírus de interesse, previamente caracterizado, deverá ser multiplicado em cultivo celular. Quando o efeito citopático atingir 80 - 90 % do tapete celular (20-24 horas após a inoculação) o sobrenadante deve ser coletado e centrifugado (12.000 g por 15 - 30 minutos a 4°C). Após o sobrenadante é descartado e

o sedimento centrifugado a 65.000 g por 2 horas a 4°C, resuspendido em Meio Essencial Mínimo (MEM) e estocado em freezer a -80°C (KREUTZ et al., 2000; OLDONI et al., 2004; WINKELMANN et al., 2007; GIANNELLI et al., 2024).

Camundongos são imunizados nos dias 0, 14, 28, 42 e 56 dias, com a mistura de antígeno e adjuvante de Freund por via intraperitoneal. (KREUTZ et al., 2000; OLDONI et al., 2004; WINKELMANN et al., 2007).

Após a imunização, é realizada a titulação de anticorpos no soro dos camundongos, que são estimulados com nova aplicação intraperitoneal de vírus concentrado, 3 dias antes do sacrifício e remoção do baço (KREUTZ et al., 2000; OLDONI et al., 2004).

3.1.2 Fusão celular, seleção e triagem de hibridoma

Após o sacrifício e retirada do baço, os esplenócitos são misturados no mieloma, para realização da fusão celular. A fusão celular é induzida com 50% de PEG (polyethylene glycol) por 1 minuto a 37°C seguido por adição de meio RPMI, distribuídas em placas de 96 orifícios. A expansão dos hibridomas é detectada entre 7 – 10 dias após a fusão. O sobrenadante de cada hibridoma é testado por IFA ou IPX em células infectadas e não infectadas (KREUTZ et al., 2000; OLDONI et al., 2004; LIU et al., 2024).

3.1.3 Produção de líquido ascítico

As colônias de hibridomas que secretam AcMs para o antígeno são clonadas, expandidas, testadas novamente para a produção de AcMs e estocadas em nitrogênio líquido (WINKELMANN et al., 2007; VIDYANI et al., 2024). Para cada AcMs é produzido líquido ascítico em camundongos BALB/c. Primeiro os camundongos recebem via intraperitoneal adjuvante e entre 6 -7 dias após são injetados com aproximadamente 10⁶ células hibridomas. Após 10 dias o fluído ascítico é coletado, clarificado por baixa centrifugação (3.000 g, 10 minutos), titulado e estocado a -80°C (KREUTZ et al., 2000; OLDONI et al., 2004).

3.1.4 Caracterização dos AcMs

Os AcMs devem ser caracterizados com relação à classe e subclasse de imunoglobulinas, normalmente por kit comercial. O título é testado pela titulação no sobrenadante de hibridomas e do líquido ascítico. Espectro de reatividade dos AcMs é testado frente a um painel de isolados de campo do vírus. Atividade neutralizante é investigada pela técnica de soroneutralização e a especificidade por *Western Blot* (WINKELMANN et al., 2007).

3.2 Reação da polimerase em cadeia (PCR)

É um método para amplificação “*in vitro*” de segmentos de DNA. Considerado excelente meio para caracterização de ácidos nucleicos, principalmente por sua sensibilidade e especificidade (GYARMATI, 2008; ZUMAILA et al., 2024). Permite a detecção de quantidades mínimas do material genético do agente, pode ser aplicada em qualquer material clínico ou em tecidos incluídos em parafina. Também apresenta como vantagem a rapidez, universalidade de agentes, capacidade de detecção com vírus inviáveis e pode ser adaptado para detecção de subtipos virais na mesma reação (FLORES, 2007).

Outra vantagem da PCR é que não há necessidade de isolar previamente o fragmento a ser amplificado, basta conhecer as extremidades da sequência e escolher os *primers* adequados (MALAJOVICH, 2004). Foi demonstrado por MEYER et al. (2003) em animais naturalmente infectados, que a reação de PCR foi capaz de detectar o vírus em maior número de amostras e por um período maior. Para o diagnóstico de agentes onde é difícil o cultivo celular, vírus com crescimento lento em culturas celulares, para vírus com antígenos com grande diversidade antigênica ou quando a quantidade de antígenos é baixa, os resultados obtidos com PCR são excelentes (TRABULSI & ALTERTHUM, 2005).

A PCR envolve a extração do ácido nucleico da amostra para posterior amplificação do material genético (KENNEDY, 2005). Métodos para extrair ácido nucleico são numerosos e variam em complexidade. A primeira etapa é a ruptura ou lise celular, liberando os componentes citoplasmáticos e/ou nucleares, sem que haja ruptura dos fragmentos de DNA/RNA. Pode ser realizada com digestão enzimática ou solução salina hipotônica. A segunda etapa consiste na desnaturação ou inativação de restos celulares e proteínas celulares, entre as mais importantes destas estão as enzimas nucleases degradativas, DNases e RNases. Também é usada solução fenol/clorofórmio/álcool isoamílico para desnaturar ainda mais as nucleases e coagular proteínas. Após a desnaturação ou inativação é necessária a separação do DNA/RNA das proteínas. Esta etapa é baseada em extração por solvente, precipitação e/ou centrifugação, pode ser realizada com o método com fenol, mais usado, centrifugação com cloreto de cério e também por precipitação do DNA/RNA com cloreto de lítio (WALKER & RAPLEY, 1999).

A amplificação é baseada no processo cíclico que mimetiza a replicação do DNA, a cada ciclo o número de moléculas de DNA é duplicado. No termociclador após “n” ciclos teremos 2ⁿ moléculas de DNA, garantindo a sensibilidade da técnica, aliado ao fato de que somente serão amplificadas as sequências reconhecidas pelos *primers* utilizados na reação (COSTA et al., 2008).

Um ciclo de PCR envolve 3 etapas: desnaturação, anelamento e extensão. A fita dupla do DNA alvo é desnaturada através da elevação da temperatura para 92 a 95°C. Na etapa de anelamento, a temperatura é rapidamente reduzida para 35 a 60°C, dependendo essencialmente do tamanho e sequência do *primer* utilizado, permitindo a hibridização

DNA-DNA de cada *primer* com as sequências complementares que flanqueiam a região alvo. Em seguida, a temperatura é elevada para 72°C para que a enzima DNA polimerase realize a extensão a partir de cada terminal 3' dos *primers*. Esta extensão envolve a adição de nucleotídeos utilizando como molde a sequência alvo, de maneira que uma cópia desta sequência é feita no processo. Uma vez que a quantidade de DNA da sequência alvo dobra a cada ciclo, a amplificação segue uma progressão geométrica de maneira que, depois de apenas 20 – 30 ciclos são produzidos mais de um milhão de vezes a quantidade inicial da sequência alvo (MURRAY, et al., 2005; ANTONINI et al., 2004; SCHAEFER, 2006; COSTA et al., 2008).

O produto resultante da amplificação, *amplicon*, é identificado por eletroforese em agarose através da comparação do tamanho de peso molecular da banda com o marcador de peso molecular (*ladder*), pode também ser identificado após digestão com enzimas de restrição ou pelo sequenciamento de nucleotídeos (KENNEDY, 2005).

PCR é um método prático e também versátil. Foram desenvolvidas técnicas para amplificação de genoma RNA, detectado quando convertido em cDNA; diversas sequências de ácidos nucleicos podem ser detectadas simultaneamente pelo uso de *cocktail* de *primers*; a técnica pode ser mais sensível e específica pelo uso de *nested*; ou a amplificação pode ser menos específica para detectar genomas divergentes ou características parciais, neste caso podem ser utilizados *primers* inespecíficos (KENNEDY, 2005; TSONGALIS & SILVERMAN, 2006; READ et al., 2000; CHAUHAN et al., 2024).

A PCR *multiplex* foi desenvolvida para amplificação de múltiplos modelos na mesma reação, permitindo a pesquisa de mais de um subtipo ou de organismos diferentes (BELÁK, 2007; PURWANTO et al., 2024). Por exemplo, análise de *swabs* nasal para determinação do agente da síndrome respiratória bovina, em uma única reação (BELÁK, 2007), reduzindo o tempo de análise e principalmente o custo, o que torna a técnica mais acessível.

Para este teste utiliza-se mais de um par de *primers*, obtendo-se mais de um resultado ao mesmo tempo. Apesar da economia de tempo e reagentes, pode haver competição entre os *primers*, a temperatura de anelamento deve ser a mesma para que se obtenha resultado satisfatório (COSTA et al., 2008), pois a diferença de tamanho dos *primers*, de temperatura de anelamento e de concentração de sal pode afetar negativamente a reação (GYARMATI, 2008).

3.2.1 RT-PCR

A RT-PCR apresenta grande sensibilidade, especificidade e rapidez na detecção e quantificação viral, tornou-se indispensável para o diagnóstico de importantes patógenos virais humanos e animais. Há desenvolvimento de RT-PCR para importantes doenças epizooticas de notificação á Organização Mundial de Saúde Animal (OMSA) como febre aftosa, peste suína clássica, gripe aviária e doença de Newcastle, todas enfermidades

causadas por vírus com genoma RNA (HOFFMAN et al., 2009; KUMAR et al., 2024).

Além do diagnóstico para vírus a RT-PCR é amplamente utilizada para verificar a expressão gênica pela detecção de RNAm e montagem de bancos de cDNA. Neste método primeiro ocorre a síntese de uma fita de DNA com o uso da enzima transcriptase reversa e tendo como molde uma fita de RNA. É produzida uma fita híbrida de DNA-RNA, posteriormente o RNA é removido por RNases e a molécula de DNA serve de molde para a amplificação por PCR (COSTA et al., 2008).

Para a RT-PCR o *mix* para a reação é constituído pelo RNA-molde, solução de dNTPs e a enzima DNA polimerase RNA dependente (transcriptase reversa - RT); *primer* de DNA e o tampão da enzima, este *mix* é incubado por 1 hora em temperatura superior a 37°C (usualmente a 42°C), produzindo o DNA complementar (cDNA). Após o término da reação de transcrição reversa com produção do cDNA, este servirá como com molde para o segundo teste, sendo iniciada nova reação (MURRAY, et al., 1995; SCHAEFER, 2006; SAID et al., 2024).

3.2.2 *Nested PCR*

Esta variação da PCR permite reduzir ou eliminar produtos da PCR não desejados, aumentando a sensibilidade e especificidade da reação (SCHAEFER, 2006). É realizada a primeira reação com um par de *primers* para amplificação da região de interesse, chamados *primers* externos. Após é realizada nova reação, com o produto do primeiro ciclo como molde, empregando par de *primers* complementares à sequência interna amplificada pelo primeiro par de *primers* (COSTA et al., 2008). Isto permite que produtos espúrios com sequências internas irrelevantes sejam retirados no segundo ciclo (SCHAEFER, 2006).

Também pode ser realizada na forma de semi *nested*, onde apenas um *primer* é desenhado para a região interna do produto, utilizando um dos *primers* da primeira reação para completar o par, fazendo a amplificação de uma extremidade. Caso sejam empregados os métodos de *Nested* ou semi-*nested* PCR é recomendado que o primeiro e o segundo ciclo de amplificação sejam terminados por volta de 20 ciclos (ao invés dos habituais 30-35 ciclos). Esta modificação diminui a chance de gerar fragmentos de alto peso molecular não desejados ou DNA degradado (COSTA et al., 2008).

3.2.3 *PCR Real-time (PCR em tempo real)*

PCR em tempo real tem boa aceitação por ser mais rápida que a PCR tradicional, mais sensível, com melhor reprodutibilidade e menor risco de contaminação (READ et al., 2000; MACKAY, 2004). Permite o monitoramento da quantificação de DNA amplificado a cada ciclo, com a utilização de sondas fluorescentes que hibridizam internamente aos *primers* na sequência a ser amplificada (HOFFMANN et al., 2009; LI te al., 2024). Os métodos baseados na PCR em tempo real forneceram uma quantificação dinâmica

superior aos métodos anteriores, aumentando a objetividade da interpretação (KRENKE et al., 2005).

A cada ciclo de síntese, o fluorocromo é liberado da sonda e essa liberação é captada e medida na forma de intensidade luminosa (BRUM & WEIBLEN, 2007). O sinal emitido é captado e quantificado por *software* acoplado em um computador, desta forma o resultado pode ser acompanhado em cada ciclo, reduzindo o tempo de realização (FLORES, 2007). À medida que os ciclos são finalizados ocorre a formação de um gráfico, com os ciclos no eixo das abcissas (X) e a indicação logarítmica de intensidade de luz no eixo das ordenadas (Y) (COSTA et al., 2008).

Existem diferentes tipos químicos de fluorescência para PCR real time, os mais utilizados são corantes fluorescentes (SYBR Green), sonda TaqMan, Molecular Beacons, LUX, Scorpions (GYARMATI, 2008).

A técnica é bastante rápida, pois os ciclos são realizados em capilares que permitem rapidez no aquecimento e no resfriamento, diminuindo o tempo entre cada uma das etapas do ciclo (TRABULSI & ALTERTHUM, 2005).

Uma desvantagem na PCR em tempo real é a capacidade restrita de *multiplex*. A amplificação e detecção simultânea de diferentes agentes ou subtipos do mesmo é limitada, pelo número de grupamentos fluorescentes que o equipamento tem capacidade de detectar (MACKAY, ARDEN & NITSCHKE, 2002). No entanto, BELÁK (2007) relata o desenvolvimento de uma PCR tempo real *multiplex* com resultado satisfatório na detecção do vírus respiratório sincicial bovino e coronavírus respiratório bovino.

3.3 Análise por restrição enzimática (REA)

A técnica de análise de restrição enzimática vem sendo utilizada na caracterização de DNA viral. Os produtos originados após a restrição enzimática, são fragmentos do DNA viral com diferentes tamanhos, possibilitando a diferenciação entre os subtipos de um vírus que apresentam diferenças na sequência do DNA (SHAEFER, 2006; ZHANG et al., 2024).

As enzimas utilizadas para a REA são isoladas de bactérias e denominadas conforme o gênero e espécie da bactéria, a primeira enzima de restrição isolada foi da bactéria *Haemophilus influenzae*, cepa d, subtipo II, sendo denominada de *HindII*. As sequências de nucleotídeos reconhecidas pelas enzimas são palíndromos (sequência de nucleotídeos que apresentam a mesma cadeia no sentido 5' para 3' ou 3' para 5'), normalmente os palíndromos reconhecidos pelas enzimas de restrição têm 4 ou 6 pares de bases (WALKER & RAPLEY, 1999). As enzimas de restrição quebram as ligações entre os nucleotídeos de uma cadeia de DNA por dentro, pois são capazes de incisar o DNA em sítios específicos (MALAJOVICH, 2004).

A avaliação dos diversos padrões de digestão possibilita a produção de um mapa de restrição obtidos de fragmentos de DNA, este mapa é denominado polimorfismo

do comprimento de fragmentos de restrição ou RFLPs - *Restriction Fragment Length Polymorphism*. A análise rotineira de RFLP pode ser realizada com sondas gênicas marcadas (*Southern*) para detectar fragmentos gênicos específicos ou simplesmente pela separação em eletroforese e visualização sob luz UV (WALKER & RAPLEY, 1999).

Diferentes enzimas produzirão um diferente padrão de fragmentos de digestão, a partir da mesma amostra de DNA genômico ou tipos ou subtipos virais podem ser diferenciados com o uso de única enzima. Com a enzima *Bam*HI, por exemplo, é possível fazer a diferenciação entre o herpesvírus bovino (BoHV) tipo 1 e 5. A enzima cliva o BoHV-1 em nove sítios e o BoHv-5 em 16 locais (BRUM & WEIBLEN, 2007). D'ARCE et al. (2002) com a utilização das enzimas *Bst*EII, *Hind*III, *Ban*HI, *Eco*RI e *Pst*I evidenciou a diferença entre o BoHV-1 e 5, com a enzima *Hind*III caracterizou os subtipos do BoHV-1 e com a *Bst*EII evidenciou e subtipos de BoHV-5.

3.4 Clonagem

A clonagem molecular é o processo de construção de moléculas de DNA recombinante e da sua propagação em hospedeiros apropriados que possibilitam a seleção do DNA recombinante. Após a incorporação de um fragmento de DNA no vetor, esse fragmento pode ser clonado, constituindo uma coleção de clones. A essa coleção dá-se o nome de biblioteca de DNA (MALAJOVICH, 2004).

Inicialmente somente era possível a produção de biblioteca de DNA, hoje, com o isolamento da enzima transcriptase reversa é possível produzir bibliotecas de cDNA, oriundas de clones de mRNA ou vírus de genoma RNA (WALKER & RAPLEY, 1999).

Os procedimentos básicos para a clonagem, iniciam com o isolamento de DNA ou RNA de células ou tecidos; com síntese de cDNA (para RNA) ou digestão de DNA genômico pela clivagem com enzimas de restrição, este fragmento deverá ser inserido no vetor para amplificação em centenas de cópias. E após a obtenção dos clones, estes devem ser identificados por processo de triagem para isolamento e manipulação do DNA clonado. A identificação dos clones pode ser realizada por análise do padrão de restrição (RFLP), sequenciamento de DNA, hibridação de ácidos nucleicos, PCR e análise de produtos gênicos por reconhecimento imunológico (WALKER & RAPLEY, 1999; FMRP-USP, 2007; MALAJOVICH, 2004; NAYAKA et al., 2024).

Os principais vetores são os plasmídeos, fagos, cosmídeos, vírus, bacteriófagos e fagomídeos. A escolha do vetor depende da sua facilidade de manipulação e do tamanho do fragmento de DNA. Os plasmídeos e os fagos transportam fragmentos de DNA pequenos, sendo por isso apropriado para genomas pequenos. Pelo contrário, os cosmídeos podem transportar até 45 kb (WALKER & RAPLEY, 1999; FMRP-USP, 2007).

No diagnóstico viral a clonagem pode ser usada para fazer o mapeamento e identificação de genes e das proteínas por eles codificadas, com o uso da biblioteca de

DNA recombinante. Produtos obtidos de PCR podem ser purificados e clonados para posterior seqüenciamento.

3.5 Seqüenciamento do genoma viral

O seqüenciamento tornou-se uma ferramenta importante no diagnóstico viral, particularmente nos protocolos baseados na amplificação de ácido nucléico via PCR. Na medicina veterinária seqüenciamento parcial tem sido usado para detectar mutações nos agentes virais. No vírus da Parvovirose canina ocorreram mutações que foram detectadas pelo seqüenciamento e nova vacina foi produzida (MURPHY, et al., 1999). O seqüenciamento está sendo utilizado para a análise das amostras de Influenza A H1N1, em todo o mundo. No Brasil o seqüenciamento do vírus H1N1, detectou uma pequena alteração em relação a amostras de outros países.

O uso da seqüência de DNA para pesquisa de algum agente depende da pureza do DNA usado e da fidelidade do procedimento. A preparação de amostras de DNA para seqüenciamento é importância para a obtenção de seqüências de boa qualidade para análise. Muitas vezes somente a extração, amplificação por PCR e purificações convencionais não são suficientes e uma padronização é necessária, evitando-se assim erros e perdas dos procedimentos (Embrapa, 2007).

No final da década de 70 foram desenvolvidos dois métodos de seqüenciamento do DNA. O método da clivagem química, denominado método Maxam e Gilbert, ocorre em três etapas, onde o DNA alvo é marcado radioativamente em uma das extremidades, dividido em quatro alíquotas e tratado com produtos químicos que produzem clivagens base-específica. Produz uma série de fragmentos de tamanhos diferentes, que são separados por eletroforese e após autorradiografia a seqüência do DNA é determinada com base nas posições dos fragmentos (WALKER & RAPLEY, 1999; CUTT et al., 2024).

O método didesoxi ou método de Sanger, mais utilizado, é baseado na produção de uma série de fragmentos de DNA por cópia enzimática da seqüência alvo, utilizando a DNA polimerase e incorporação de didesoxinucleotídeos (ddNTP), realizadas em quatro reações individuais, cada uma com um dos didesoxis, produzindo fragmentos de diferentes tamanhos, separados por eletroforese (WALKER & RAPLEY, 1999; PANDA et al., 2024). A leitura da seqüência é feita de baixo para cima.

O aprimoramento das metodologias uniu PCR e seqüenciamento, sendo chamada de seqüenciamento por ciclo ou automatizado. As reações podem ser realizadas em único tubo, com terminadores (ddNTP) marcados por corantes, com emissão em diferentes comprimentos de onda. Já com automação de equipamentos que desenvolver a técnica de forma parcial ou total e leitura computadorizada por laser (WALKER & RAPLEY, 1999; MALAJOVICH, 2004; PANDA et al., 2024; CUTT et al. 2024).

4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

Muitas técnicas laboratoriais para identificação e caracterização viral já foram desenvolvidas e estão disponíveis, entretanto ainda são de custo muito elevado o que dificulta sua utilização a campo. Desta forma, laboratórios de diagnóstico não utilizam rotineiramente tais técnicas, estando, atualmente, restritas a laboratórios especializados e que atuam com pesquisa. Entretanto, quanto maior a difusão e aprimoramento, maiores as chances destas técnicas chegarem ao produtor com preços acessíveis.

REFERÊNCIAS

1. Akter S, Rahman MS, Islam MR, Akther M, Anjume H, Marjia M, Rahaman MM, Hossain MA, Sultana M. Development of recombinant proteins for vaccine candidates against serotypes O and A of Foot-and-Mouth Disease virus in Bangladesh. *Access Microbiol*. 2024 Jun 24;6(6):000713.v4. doi: 10.1099/acmi.0.000713.v4. PMID: 39045246; PMCID: PMC11261717.
2. ANTONINI, S. R. C.; MENEGHIN, S. P. URASHIMA, A. S. **Técnicas básicas de biologia molecular**. 2004. 57p. [apostila] Disponível em: http://www.ufsm.br/petagonomia/apostilas/apostilacurso_molecular_ufscar.pdf. Acesso em: 02/08/2009.
3. BELÁK, S. Molecular diagnosis of viral diseases, present trends and future aspects. A view from the OIE Collaborating Centre for the Application of Polymerase Chain Reaction Methods for Diagnosis of Viral Diseases in Veterinary Medicine. **Vaccine** v.25, p. 5444-5452, 2007.
4. Bhad PG, Mondal S, Badigannavar AM. Molecular tagging of seed size using MITE markers in an induced large seed mutant with higher cotyledon cell size in groundnut. *3 Biotech*. 2024 Feb;14(2):56. doi: 10.1007/s13205-023-03909-0. Epub 2024 Jan 29. PMID: 38298555; PMCID: PMC10825088.
5. BRUM, M. C. S. & WEIBLEN, R. Detecção, indentificação e quantificação de vírus. IN: FLORES, E. F. **Virologia Veterinária**. Santa Maria: Ed. da UFSM. p. 59-86. 2007.
6. Chauhan G, Arya M, Kumar V, Verma D, Sharma M. An improved protocol for metagenomic DNA isolation from low microbial biomass alkaline hot-spring sediments and soil samples. *3 Biotech*. 2024 Jan;14(1):34. doi: 10.1007/s13205-023-03824-4. Epub 2024 Jan 6. PMID: 38188309; PMCID: PMC10769977.
7. COSTA, M.M.; BOTTON, S.A.; CRUZ, I.B.M.; KREWER, C.C. Curso de biologia molecular para iniciantes: **O ABC da biologia molecular**. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS. 2008. 75p. [Apostila]
8. Cutts Z, Patterson S, Maliskova L, Taylor KE, Ye CJ, Dall'Era M, Yazdany J, Criswell LA, Fragiadakis GK, Langelier C, Capra JA, Sirota M, Lanata CM. Cell-Specific Transposable Element and Gene Expression Analysis Across Systemic Lupus Erythematosus Phenotypes. *ACR Open Rheumatol*. 2024 Nov;6(11):769-779. doi: 10.1002/acr2.11713. Epub 2024 Aug 14. PMID: 39143499; PMCID: PMC11557995.
9. D'ARCE, R. C. F.; ALMEIDA, R. S.; SILVA, T. C.; FRANCO, A. C.; SPILKI, F.; ROEHE, P. M.; ARNS, C. W.. Restriction endonuclease and monoclonal antibody analysis of Brazilian isolates of bovine herpesviruses types 1 and 5. **Veterinary Microbiology**, v. 88, p. 315-324, 2002.
10. DEHLON, G.; MORAES, M.P.; LU, Z; AFONSO, C.L.; FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; KUTISH, GF; ROCK, DL. Genome of bovine herpesvirus 5. **Journal of Virology**, v. 77, p. 10339-10347, 2003.

11. Devika PP, Alex S, Soni KB, Sindura KP, Ayisha R, Manju RV. Nano-PCR for the early detection of tomato leaf curl virus. *3 Biotech*. 2024 Jan;14(1):5. doi: 10.1007/s13205-023-03842-2. Epub 2023 Dec 6. PMID: 38074290; PMCID: PMC10700262.

12. Duan J, Zhang N, Liu S, Li J, Gong P, Wang X, Li X, Zhang X, Tang B, Zhang X. The Detection of Circulating Antigen Glutathione S-Transferase in Sheep Infected with *Fasciola hepatica* **with Double-Antibody Sandwich Signal Amplification Enzyme-Linked Immunosorbent Assay**. *Animals (Basel)*. 2024 Feb 3;14(3):506. doi: 10.3390/ani14030506. PMID: 38338149; PMCID: PMC10854876.

13. EMBRAPA. Pesquisa e desenvolvimento. **Resultados da Pesquisa** 2007. <http://www.cnpa.embrapa.br/resultados/2007/resultados.html>. Acesso em: 10/08/2009.

14. Faneye AO, Motayo BO, Mustafa A, Odiabo G. Diversity of HBV genotypes and their association with precore/basal core mutations among HBsAg-positive patients in Ibadan, Nigeria. *Access Microbiol*. 2024 Nov 7;6(11):000821.v3. doi: 10.1099/acmi.0.000821.v3. PMID: 39525359; PMCID: PMC11542583.

15. FLINT, S. J.; ENQUIST, W. L.; KRUG, R. M.; RACANIELLO, V. R.; SKALKA, A. M. **Principles of virology: Molecular biology, pathogenesis, and control**. Washington, D.C: ASM Press. 2000, 804 p.

16. FLORES, E. F. Diagnóstico Laboratorial das infecções viricas. IN: FLORES, E. F. **Virologia Veterinária**. Santa Maria: Ed. da UFSM. p. 295-326. 2007.

17. FMRP-USP. **Apostila didática: Princípios e aplicações das principais metodologias em Biologia Celular e Molecular**. Departamento de Biologia Celular Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. 2007. 103 p. [Apostila].

18. Giannelli C, Necchi F, Palmieri E, Oldrini D, Ricchetti B, Papathanasiou MM, Kis Z, Kontoravdi C, Campa C, Micoli F. Quality by Design Framework Applied to GMMMA Purification. *AAPS J*. 2024 Mar 8;26(2):32. doi: 10.1208/s12248-024-00902-0. PMID: 38459151.

19. GYARMATI, P. **Implementation of Molecular Detection Techniques in the Field of Veterinary Virology**. [on line]. 2008. 40 f. Doctoral Thesis. Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science Department of Biomedical Sciences and Veterinary Public Health – Uppsala. Disponível em: <http://diss-epsilon.slu.se/archive/00001885/01/Thesis1028.pdf>. Acesso em: 10/08/2009.

20. HOFFMANN, B.; BEER, M.; REID, S. M.; MERTENS, P.; OURA, C. A. L.; VAN RIJN, P. A.; MAREK J. SLOMKA, M. J.; BANKS, J.; BROWN, I. H.; ALEXANDER, D. J.; KING, D. P. Review of RT-PCR technologies used in veterinary virology and disease control: Sensitive and specific diagnosis of five livestock diseases notifiable to the World Organisation for Animal Health. **Veterinary Microbiology**. *In Press*. Disponível em: http://www.science-direct.com/science?_ob=PublicationURL&_tokey=%23TOC%235190%239999%23999999999%2399999%23FLA%23&_cdi=5190&_pubType=J&view=c&_auth=y&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=718e9ad0e10ba3958eb8270eb61c0d02. Acesso em: 03/08/2009.

21. Jia XX, Wang YY, Zhang WZ, Li WG, Bai LL, Lu JX, Ma CF, Wu Y. A rapid multiplex real-time PCR detection of toxigenic *Clostridioides difficile* **directly from fecal samples**. *3 Biotech*. 2023 Feb;13(2):54. doi: 10.1007/s13205-022-03434-6. Epub 2023 Jan 19. PMID: 36685319; PMCID: PMC9849642.

22. KENNEDY, M. Methodology in diagnostic virology. **Veterinary Clinics Exotic Animal Practice**. v. 8, p.7-26, 2005.

23. KRENKE, B.E.; EKENBERG, S.; FRACKMAN, S.; HOFFMANN, K.; SPRECHER, C. L.; STORTS, D. R. Development of a novel, fluorescent, two primers approach to quantitative PCR. **Profiles inDNA**, Promega Corporation, v.8, n.1, p.3-5, 2005. Disponível em: http://www.promega.com/profiles/801/ProfilesInDNA_801_03.pdf. Acesso em 24/08/2009.
24. KREUTZ, L.C. ; DONIS, R. ; GIL, L. H. V. ; LIMA, M. ; HOFFMAN, A. N. ; GARCEZ, D. C. ; FLORES, E. F. ; WEIBLEN, R. Production and characterization of monoclonal antibodies to brazilian isolates of bovine viral diarrhea virus. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 33, p. 1459-1466, 2000.
25. Kumar R, Gupta N, Sharma SK, Kishan G, Srivastava N, Khan ZA, Kumar A, Baranwal VK. Mixed infection of two mandariviruses identified by high-throughput sequencing in Kinnow mandarin and development of their specific detection using duplex RT-PCR. *3 Biotech*. 2024 Jun;14(6):170. doi: 10.1007/s13205-024-04011-9. Epub 2024 May 31. PMID: 38828101; PMCID: PMC11143089.
26. Li S, Huo X, Mu Y, Liu X, Wu J, Chen Y, Wang Y. TaqMan-based real-time polymerase chain reaction for the detection of feline chaphamaparvovirus. *3 Biotech*. 2024 Mar;14(3):61. doi: 10.1007/s13205-024-03917-8. Epub 2024 Feb 7. PMID: 38344284; PMCID: PMC10850043.
27. Liu V, McGrath K, Albert J, Mayer AP, Busz M, Birchler M, Tang H, Jiang Y. Screening Non-neutralizing Anti-idiotypic Antibodies Against a Drug Candidate for Total Pharmacokinetic and Target Engagement Assay. *AAPS J*. 2024 Jan 24;26(1):18. doi: 10.1208/s12248-024-00892-z. PMID: 38267774.
28. Liu X, Li S, Liu X, Wang R, Xie X, Wu H, Wang Y. Establishment of SYBR green I-based quantitative real-time polymerase chain reaction for the rapid detection of a novel Chaphamaparvovirus in cats. *3 Biotech*. 2022 Apr;12(4):91. doi: 10.1007/s13205-022-03150-1. Epub 2022 Mar 14. PMID: 35308811; PMCID: PMC8918419.
29. MACKAY, I. M. Real- time PCR in the microbiology laboratory. **Clinical. Microbiology and Infection**. v. 10, p. 190-212, 2004.
30. MACKAY, I. M.; ARDEN, K. E. & NITSCHKE, A. Real- time PCR in virology. **Nuclei Acids Research**. v. 30, p. 1292-1305, 2002.
31. MALAJOVICH, M. A. M. . *Biotecnologia*. 1. ed. Rio de Janeiro: Axcel Books do Brasil Editora Ltda, 2004. 344 p.
32. MEYER, A.D.; CORTEZ, A.; SOARES, R.M.; PITUCO, M.E.; OKUDA, L.; LEOMIL, H.; CASTRO, A.M.M.G.; RICHTZENHAIN, L.J. Comparação das técnicas de isolamento viral e nested PCR Na detecção do BHV-1 em sêmen bovino experimentalmente e naturalmente contaminado **Arquivos do Instituto Biológico**, v.70(2), p.123-126, 2003.
33. MURPHY, F. A.; GIBBS, E. P. J.; HORZINEK, M. C.; STUDDERT, M. J. **Veterinary virology**. 3 ed. San Diego: Academic Press. 1999, 629 p.
34. MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. **Manual of clinical microbiology**. 6 ed. Washington, DC: ASM Press:. 2005, 1482 p.
35. Nayaka SN, Mondal F, Ranjan JK, Roy A, Mandal B. Bottle gourd IC-0262269, a super-susceptible genotype to tomato leaf curl Palampur virus. *3 Biotech*. 2024 Jan;14(1):8. doi: 10.1007/s13205-023-03838-y. Epub 2023 Dec 8. PMID: 38074288; PMCID: PMC10709538.

36. OLDONI, I.; WEIBLEN, R.; ILKELMANN, M. A.; FLORES, E. F. Production and characterization of monoclonal antibodies to brazilian bovine herpesvirus type 5. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 37, p. 213-221, 2004.
37. Purwanto DS, Khoeri MM, Tafroji W, Margaretha Kaligis SH, Wilar R, Johnson Kepel B, Raranta HPT, Gaghiwu L, Hammerschmidt S, Ervina WF, Safari D. Nasopharyngeal carriage rate, serotype distribution, and antimicrobial profiles of *Streptococcus pneumoniae* among patients with acute respiratory tract infection in Manado, North Sulawesi, Indonesia. *Access Microbiol*. 2024 Mar 15;6(3):000703.v4. doi: 10.1099/acmi.0.000703.v4. PMID: 38725588; PMCID: PMC11077345.
38. READ, S. J.; BURNETT, D. & FINK, C.G. Molecular techniques for clinical diagnostic. *Virology. Journal of Clinical Pathology*. v. 53, p. 502–506 , 2000.
39. Said R, Hernández-Losa J, Jenni R, de Haro RSL, Moline T, Zouari S, Blel A, Rammeh S, Derouiche A, Ouerhani S. An insight into the diagnostic, prognostic, and taxanes resistance of double zinc finger and homeodomain factor's expression in naïve prostate cancer. *3 Biotech*. 2024 Apr;14(4):106. doi: 10.1007/s13205-024-03941-8. Epub 2024 Mar 10. PMID: 38476644; PMCID: PMC10925581.
40. SCHAEFER, R. **Técnicas em Biologia Molecular**. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2006. 24p. [Apostila]
41. SOUZA V.F.; MELO S.V.; ESTEVES P.A.; SCHMIDT C.S.; GONÇALVES D.A.; SCHAEFER R.; SILVA T.C.; ALMEIDA R.S.; VICENTINI F.; FRANCO A.C.; OLIVEIRA E.A.; SPILKI F.R.; WEIBLEN R.; FLORES E.F.; LEMOS R.A.. ALFIERI A.A., PITUCO E.M. E ROEHE P.M. Caracterização de herpesvírus bovinos tipos 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5) com anticorpos monoclonais. **Pesquisa Veterinária Brasileira** v. 22, p. 13-18, 2002.
42. TAKIUCHI, E. ; ALFIERI, A. F. , ALFIERI, A. A. Herpesvírus bovino tipo 1: Tópicos sobre a infecção e métodos de diagnóstico. **Semina Ciências Agrárias**, Londrina / PR, v. 22, n. 2, p. 203-209, 2001.
43. TIZARD. I. R. **Imunologia Veterinária: uma introdução**. 10 ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2019. 587p.
44. TRABULSI, L. R. & ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 718 p.
45. TSONGALIS, G. J. & SILVERMAN, L. M. Molecular diagnostic: A historical perspective. **Clínica Chimica Acta**. v. 369, p. 188-192, 2006.
46. Vidyani A, Sibarani CI, Widodo B, Purbayu H, Thamrin H, Miftahussurur M, Setiawan PB, Sugihartono T, Kholili U, Maimunah U. Diagnosis and Management of Hepatic Hydrothorax. *Korean J Gastroenterol*. 2024 Feb 25;83(2):45-53. doi: 10.4166/kjg.2023.107. PMID: 38389460.
47. WALKER, M. R. & RAPLEY, R. Guia de rotas na tecnologia do gene. 1 ed. São Paulo: Atheneu. 1999. 334p.
48. Wang Y, Wang Y, Bi Z, Liu Y, Meng C, Zhu J, Liu G, Li C. Simultaneous detection of novel goose parvovirus and novel duck reovirus by SYBR Green I-based duplex real-time quantitative polymerase chain reaction. *3 Biotech*. 2024 Nov;14(11):288. doi: 10.1007/s13205-024-04139-8. Epub 2024 Nov 3. PMID: 39502793; PMCID: PMC11532324.

49. WARD, P. A. Monoclonal Antibody Production. Committee on Methods of Producing Monoclonal Antibodies, Institute for Laboratory Animal Research, National Research Council, NATIONAL ACADEMY PRESS, Washington, DC, 1999, 60 p. Disponível em: http://www.nap.edu/openbook.php?record_id=9450&page=R9. Acesso em: 05/08/2009.
50. WINKELMANN, E. R.; SILVA, L. F.; MAYER, S. V.; MAZZUTTI, K. C.; WEIBLEN, R. FLORES, E. F. Produção e caracterização de anticorpos monoclonais contra uma cepa do herpesvírus bovino tipo 1 defectiva na glicoproteína C (gC). **Ciência Rural**. v.37, n. 4, p. 1066-1072, 2007.
51. Zhang J, Zhao H, Zou B, Li H, Dong S, Guan J, Wang C, Li W, Liu Y, Chen Y, Rasheed N, He J. Cryo-EM structure and functional analysis of the chromatin remodeler RSF. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun*. 2024 Jun 1;80(Pt 6):125-134. doi: 10.1107/S2053230X24004655. Epub 2024 May 31. PMID: 38818823; PMCID: PMC11189100.
52. Zhang Z, Guo K, Chu X, Liu M, Du C, Hu Z, Wang X. Development and evaluation of a test strip for the rapid detection of antibody against equine infectious anemia virus. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2024 Dec;108(1):85. doi: 10.1007/s00253-023-12980-9. Epub 2024 Jan 8. PMID: 38189948; PMCID: PMC10774152.
53. ZUKUROV, J. P. L. **Metodologias de seqüenciamento da molécula de DNA**. BioMol web 2007. Disponível em: http://www.biomolweb.kit.net/pages_html/sequencing.html. Acesso em: 03/07/2009.
54. Zumaila F, Jeevalatha A, Biju CN. Genetic diversity, mating type and pathogenicity of two *Phytophthora species infecting black pepper in India*. *3 Biotech*. 2024 Jan;14(1):1. doi: 10.1007/s13205-023-03843-1. Epub 2023 Dec 2. PMID: 38050620; PMCID: PMC10693541.