

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

DESENVOLVIMENTO DE IMUNOENSAIO PARA CONFIRMAÇÃO DA INFECÇÃO  
DE *Mogiana Tick Virus* (MGTV) EM BOVINOS EM FAZENDAS DA REGIÃO DO  
TRIÂNGULO MINEIRO.

GUILHERME BRANDÃO MAMEDE

Monografia apresentada à Coordenação do  
Curso de Biotecnologia, da Universidade  
Federal de Uberlândia, para obtenção do  
grau de Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia - MG

Novembro - 2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
CURSO BIOTECNOLOGIA

DESENVOLVIMENTO DE IMUNOENSAIO PARA CONFIRMAÇÃO DA INFECÇÃO  
DE *Mogiana Tick Virus* (MGTV) EM BOVINOS EM FAZENDAS DA REGIÃO DO  
TRIÂNGULO MINEIRO.

GUILHERME BRANDÃO MAMEDE

DR. JONNY YOKOSAWA

MA. MAYARA GARCIA POLLI

Monografia apresentada à Coordenação do  
Curso de Biotecnologia, da Universidade  
Federal de Uberlândia, para obtenção do  
grau de Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia - MG

Novembro – 2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
CURSO BIOTECNOLOGIA

DESENVOLVIMENTO DE IMUNOENSAIO PARA CONFIRMAÇÃO DA INFECÇÃO  
DE *Mogiana Tick Virus* (MGTV) EM BOVINOS EM FAZENDAS DA REGIÃO DO  
TRIÂNGULO MINEIRO.

GUILHERME BRANDÃO MAMEDE

DR. JONNY YOKOSAWA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS (ICBIM)

MA. MAYARA GARCIA POLLI

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS (ICBIM)

Homologado pela coordenação do Curso  
de Biotecnologia em \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_.

DR. NILSON NICOLAU JÚNIOR

Uberlândia - MG  
Novembro – 2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
CURSO BIOTECNOLOGIA

DESENVOLVIMENTO DE IMUNOENSAIO PARA CONFIRMAÇÃO DA INFECÇÃO  
DE *Mogiana Tick Virus* (MGTV) EM BOVINOS EM FAZENDAS DA REGIÃO DO  
TRIÂNGULO MINEIRO.

GUILHERME BRANDÃO MAMEDE

Aprovado pela Banca Examinadora em:

Nota:

---

Prof. Dr. Jonny Yokosawa

Uberlândia, 28 de novembro de 2023

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU  
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

M264 2023	<p>Mamede, Guilherme Brandão, 2000- Desenvolvimento de imunoensaio para confirmação da infecção de Mogiana Tick Virus (MGTV) em bovinos em fazendas da região do Triângulo Mineiro [recurso eletrônico] / Guilherme Brandão Mamede. - 2023.</p> <p>Orientador: Jonny Yokosawa. Coorientador: Mayara Garcia Polli. Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Uberlândia, Graduação em Biotecnologia. Modo de acesso: Internet. Inclui bibliografia. Inclui ilustrações.</p> <p>1. Biotecnologia. I. Yokosawa, Jonny, 1966-, (Orient.). II. Polli, Mayara Garcia, 1995-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Graduação em Biotecnologia. IV. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 60</p>
--------------	---

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091  
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
 Coordenação do Curso de Graduação em Biotecnologia - Uberlândia  
 Av. Pará, 1720, Bloco 2E, Sala 205 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902  
 Telefone: (34)3225-8441 - www.ibttec.ufu.br - cbiotec@ibttec.ufu.br



## ATA DE DEFESA - GRADUAÇÃO

Curso de Graduação em:	Biotecnologia		
Defesa de:	Trabalho de conclusão de curso - GBT094		
Data:	28/11/2023	Hora de início:	09:30
Matrícula do Discente:	11911BTC009		
Nome do Discente:	Guilherme Brandão Mamede		
Título do Trabalho:	Desenvolvimento de imunoenensaio para confirmação da infecção da Mogiana tick virus (MGTV) em bovinos em fazendas da região do Triângulo Mineiro		
A carga horária curricular foi cumprida integralmente?	<input checked="" type="checkbox"/> Sim ( ) Não		

Reuniu-se no Anfiteatro/Sala 211, bloco 2E, Campus Umuarama, da Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Curso de Graduação em Biotecnologia, assim composta: Rodrigo da Costa Maia (PPGIPA - ICBIM/UFU); Anna Laura de Jesus Gomes (PPGIPA - ICBIM/UFU); Jonny Yokosawa - ICBIM/UFU, orientador do candidato.

Iniciando os trabalhos, o presidente da mesa, Dr. Jonny Yokosawa, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato, agradeceu a presença do público, e concedeu ao discente a palavra, para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do curso.

A seguir o senhor presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o candidato. Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o candidato:

( X ) Aprovado Nota [90]

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Jonny Yokosawa, Professor(a) do Magistério Superior**, em 28/11/2023, às 10:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo da Costa Maia, Usuário Externo**, em 28/11/2023, às 10:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Anna Laura de Jesus Gomes, Usuário Externo**, em 28/11/2023, às 11:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://www.sei.ufu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **4959615** e o código CRC **B2DDDB40**.

Dedico este trabalho a meus pais, cuja crença em mim o tornou possível. Dedico também à minha avó Zaíra, que não pôde estar aqui para acompanhar o fim deste ciclo.

## AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos a todos que contribuíram para a realização deste presente trabalho. Primeiramente, devo agradecer à minha família, em especial meus pais, irmãos e minha tia-avó que trilharam toda essa jornada junto a mim, o apoio de vocês foi fundamental.

Estendo minha gratidão à equipe do Lamice, que sempre me auxiliou quando precisei. Em especial meu orientador e minha coorientadora pela paciência, pelos aprendizados e por terem feito tudo isso ser possível. Obrigado pelos conselhos, críticas construtivas e pelo encorajamento ao longo desses meses.

Agradeço, também, aos meus amigos que compartilharam essa jornada comigo, com apoio e incentivo primorosos para o processo. Bem como a todos os professores e professoras que estiveram presentes na minha trajetória, vocês foram essenciais.

Não posso deixar de expressar minha gratidão pela Universidade Federal de Uberlândia, instituição de ensino que me concedeu a oportunidade e ambiente propícios à pesquisa. Este trabalho é resultado do apoio coletivo que recebi, e sou grato a todos que, de alguma forma, contribuíram para o meu crescimento acadêmico e pessoal.

Por fim, não posso deixar de agradecer em especial ao meu professor de biologia do ensino médio, Fernando Borella. Suas aulas foram uma verdadeira fonte de inspiração, com notável amor e dedicação ao que faz. Esse sonho se tornou realidade porque alguém, com tanto empenho, me mostrou que ele era possível. Muito obrigado por acreditar e por compartilhar tanto conhecimento!

## RESUMO

Em 2011, um vírus isolado de gado infestado por carrapatos *Rhipicephalus microplus* no Brasil, denominado Mogiana tick vírus (MGTV), foi identificado. Em 2014, o MGTV foi associado ao grupo Jingmenvirus, uma subdivisão dos *Flavivirus* descoberta na China. Carrapatos, membros da família *Ixodidae*, são os principais vetores desses vírus, sendo considerados os segundos maiores transmissores de doenças causadas por patógenos pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Além de afetar humanos, os carrapatos causam danos significativos à criação de gado no Brasil, com estimativas de prejuízos diretos e indiretos somando por volta de 3,2 bilhões de dólares anuais, logo compreender aspectos sanitários associados a esse parasitismo se torna essencial. Essa proposta envolve o uso do teste Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA), com a proteína viral 2 do MGTV como antígeno, visando diagnóstico rápido e preciso em soros bovinos. A eficácia deste método é sujeita a confirmação pelo *western blotting*, uma técnica de transferência de proteínas para detecção de ligações antígeno-anticorpo.

**Palavras-chave:** Mogiana tick virus, carrapato, *western blotting*.

## **ABSTRACT**

In 2011, a virus isolated from cattle infested with *Rhipicephalus microplus* ticks in Brazil, named Mogiana tick virus (MGTV), was identified. In 2014, MGTV was associated with the Jingmenvirus group, a subdivision of *Flavivirus* discovered in China. Ticks, members of the *Ixodidae* family, are the main vectors of these viruses, being considered the second-largest transmitters of diseases caused by pathogens by the World Health Organization (WHO). In addition to affecting humans, ticks cause significant damage to cattle farming in Brazil, with estimates of direct and indirect losses amounting to around 3.2 billion dollars annually, making it essential to understand sanitary aspects related to this parasitism. This proposal involves the use of the Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) test, with the viral protein 2 of MGTV as an antigen, aiming for rapid and accurate diagnosis in bovine sera. The effectiveness of this method is subject to confirmation by western blotting, a protein transfer technique for detecting antigen-antibody binding.

**Keywords:** Mogiana tick virus, tick, western blotting

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. Revisão da Literatura.....	1
1.2. Justificativa.....	4
1.3. Objetivo .....	4
1.3.1. Objetivo Geral.....	4
1.3.2. Objetivos Específicos.....	4
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	5
2.1. Seleção das amostras de soro bovino .....	5
2.2. Géis de Policarilamida para <i>Western Blotting</i> .....	5
2.3. <i>Western Blotting</i> .....	6
2.5. Imunodeteccção.....	7
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	8
4. CONCLUSÃO .....	11
5. REFERÊNCIAS .....	11

## LISTA DE FIGURAS

1. Tiras contendo: 6x His; 16042; 28.....	9
2. Tiras contendo: 20012; 42; 514.....	9
3. Tira contendo: 522.....	9
4. Panorama geral das tiras.....	11

## **LISTA DE TABELAS**

1. Relação dos soros selecionados.....5
2. Disposição das amostras nos poços dos géis.....6

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Revisão da Literatura

As tecnologias disponíveis permitiram que cada vez mais vírus novos fossem descobertos a partir de uma diversidade de amostras. Entretanto, classificá-los quanto à sua taxonomia tem se revelado um desafio, especialmente ao nível de família e espécie. Embora existam algumas características que possam ser observadas, como suas propriedades fenotípicas, estratégias de replicação, estrutura do vírion e aspectos clínicos e epidemiológicos, as orientações sobre a classificação dos mesmos em novos grupos não são tão assertivas. Tais orientações são cedidas pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV), órgão que autoriza a classificação taxonômica dos vírus (SIMMONDS; AIEWSAKUN, 2018).

No ano de 2011 no Brasil, um novo vírus isolado de amostras de gado infectado por carrapatos da espécie *Rhipicephalus microplus* foi detectado. Denominado Mogiana tick vírus (MGTV), este patógeno causou incerteza nos pesquisadores quanto à sua classificação (VILLA *et al.*, 2017). Inicialmente, ele foi considerado um membro divergente pertencente ao gênero *Flavivirus*, o maior gênero da família *Flaviviridae* e que conta com mais de 70 vírus dentre eles o vírus da dengue, da febre amarela e da hepatite C. Isso se deve ao fato que, dentre outras características semelhantes, possuem as proteínas não estruturais dos *Flavivirus* NS3 e NS5, diretamente relacionadas com replicação do genoma e processamento do RNA (MARUYAMA *et al.*, 2014; PASCOAL *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2020).

Em 2014, foi descrito um novo grupo dentro dos *Flavivirus*, os Jingmenvirus, descobertos na região de Jingmen, China. Após pesquisas e caracterização, o MGTV passou a integrar esse grupo, agora com suas demais características bem representadas (PASCOAL

*et al.*, 2019; QIN *et al.*, 2019; VILLA *et al.*, 2017). Em suma, os Jingmenvirus são compostos por vírus segmentados e multicomponentes que possuem alguma relação evolutiva com vírus não segmentados do gênero *Flavivirus*. Além disso, também são conhecidos por serem um grupo diverso, com presença global e com grande disposição de hospedeiros (VILLA *et al.*, 2017).

Um dos membros desse grupo é o *Jingmen tick virus* (JMTV), com grande potencial patogênico à humanos, pois já foi relacionado a casos fatais de febre hemorrágica da Crimeia-Congo além de comumente provocar sintomas como dor de cabeça, febre e mialgia (JIA *et al.*, 2019). Em estudos, foi identificado hospedando carrapatos das espécies *Amblyomma javanense*, *A. testudinarium*, *Haemaphysalis campanulata*, *H. flava*, *H. hystricis*, *H. inermis*, *H. longicornis*, *H. parva*, *Hyalomma marginatum*, *Ixodes granulatus*, *I. ricinus*, *I. sinensis*, *Rhipicephalus bursa*, *R. geigy*, *R. microplus*, *R. sanguineus* e *R. turanicus*. Além de ter sido identificado na China, Laos, Japão, França, Guiné, Brasil, Trindade e Tobago, Antilhas Francesas e Turquia (KOBAYASHI *et al.*, 2021; WU *et al.*, 2023). Por fim, sua alta similaridade com o MGTV sugere que são da mesma espécie viral, o que pode indicar níveis semelhantes de patogenicidade, mesmos hospedeiros e amplitude geográfica (LADNER *et al.*, 2016; SOUZA *et al.*, 2018).

Outro vírus desse grupo é o *Alongshan virus* (ASLV), que também compartilha alta similaridade com JMTV. Em 2017, na China, um programa de vigilância intensificada confirmou pelo menos 86 pacientes, entre 24 a 77 anos, infectados com ASLV. Entre os sintomas mais comuns descritos foram dor de cabeça e febre, entretanto houve indivíduos que apresentaram fadiga, depressão, coma, perda de apetite, náusea, mialgia e petéquias. O período de internação foi de aproximadamente 14 dias e todos os pacientes conseguiram se recuperar. Mais uma vez, o comportamento patogênico reforça a importância desse grupo como um caso de saúde pública (WANG *et al.*, 2019).

O principal vetor desses vírus, os carrapatos, pertencem à classe Arachnida, ordem Parasitiformes, são ectoparasitas e hematófagos obrigatórios. Apenas a família Ixodida possui mais de 700 membros espalhados por todo o planeta. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), tais artrópodes são os segundos maiores transmissores de doenças causadas por patógenos, atrás somente de mosquitos (VANDEGRIFT; KAPOOR, 2019).

O Brasil é um dos maiores produtores de bovinos do mundo, com rebanho ultrapassando 218 milhões de animais em 2020 além de uma produção leiteira de 35 bilhões de litros (IBGE 2022), o que denota sua importância como um capital nacional. Dentre os principais problemas encontrados, em relação a sanidade animal, está o parasitismo pelo *Rhipicephalus microplus*, uma espécie amplamente difundida no país. Sendo que as consequências diretas e indiretas causadas por esse carrapato na bovinocultura são de aproximadamente 3,24 bilhões de dólares por ano no Brasil (ANDREOTTI et al., 2018; GRISI et al., 2014).

Efeitos espoliativos causados pelo parasitismo por carrapato se somam a possibilidade de transmissão de doenças como a tristeza parasitária bovina, além disso, com a crescente preocupação com a emergência de novos patógenos, faz-se necessário o desenvolvimento de métodos para diagnóstico rápido, preciso e acessível para os mesmos. Logo, a partir do momento em um teste diagnóstico é considerado viável, com eficiente especificidade e sensibilidade se torna possível identificar a infecção e iniciar o tratamento no menor tempo possível para facilitar a cura do paciente ou do animal, evitar possíveis complicações e impedir a dispersão dos vetores e da doença.

Uma metodologia sugerida por CUNHA (2023) foi baseada na utilização de um teste ELISA que tem como antígeno a proteína viral 2 do MGTV. Nessa proposta, soros bovinos

de distintas fazendas da região do Triângulo Mineiro foram utilizados segundo o método. A proposta deste projeto foi confirmar a eficácia e eficiência dos resultados prévios do ELISA a partir do método *western blotting*. Segundo a literatura, é um método eficiente e acessível e consiste na transferência de proteínas de um gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sódio (SDS), submetido a uma eletroforese (SDS-PAGE), para uma membrana adsorvente. Essa, por sua vez, passa por um teste de imunodeteção a partir do uso de anticorpos primários e secundários, que servem de sondas para revelar se houve alguma ligação antígeno-anticorpo (KURIEN; SCOFIELD, 2005).

## **1.2. Justificativa**

Os carrapatos são responsáveis por prejuízos de bilhões de dólares na economia brasileira ao interferirem diretamente na cadeia produtiva bovina. Com a descoberta recente do MGTV é necessária maior investigação da sua interação com estes animais e seus potenciais riscos à saúde do animal e ao seu caráter econômico. Paralelamente, já foram descritos casos de infecção humana por vírus do mesmo grupo e com alta similaridade ao MGTV, o que torna também um caso de saúde pública.

Esse estudo é parte de um projeto maior que visa compreender melhor a infecção deste patógeno. Para isso, a proposta foi realizar o teste *western blotting* para entender a viabilidade do ELISA como um possível método de diagnóstico da infecção do vírus.

## **1.3. Objetivo**

### **1.3.1. Objetivo Geral**

Avaliar em amostras de soros bovinos previamente diagnosticados positivos em testes ELISA o potencial uso do método *western blotting* no desenvolvimento de diagnóstico laboratorial.

### **1.3.2. Objetivos Específicos**

- Selecionar soros que apresentaram maior índice ELISA para serem testados por *western blotting*;
- Avaliar se o conjugado com proteína A funciona como um bom conjugado na detecção de antígenos presentes os soros que foram positivos previamente no ELISA;
- Confirmar viabilidade do ELISA como diagnóstico para MGTV;

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Seleção das amostras de soro bovino

A partir de testes ELISA previamente realizados no laboratório, foram obtidos resultados para 122 soros bovinos. Estes, por sua vez, foram coletados em três fazendas distintas na região do Triângulo Mineiro. Do montante, os soros com índice ELISA com resultado maior que um foram considerados positivos, dentre eles foram selecionados os dois soros de maior índice de cada fazenda. Assim, selecionou-se:

Localização	Amostras	
<b>Glória</b>	20012	16042
<b>Lago Verde</b>	28	42
<b>Capim branco</b>	514	522

Tabela 1 - Relação dos soros selecionados

### 2.2. Géis de Poliacrilamida para *Western Blotting*

Foram montados 2 géis de poliacrilamida 14% para o protocolo de *Western Blotting*. Para o gel de separação, foram utilizados: 1560 µL de Tris-HCl pH 8,8; 56 µL de dodecilsulfato de sódio (SDS); 2800 µL de acrilamida; 1543 µL de água destilada; 34 µL de persulfato de amônia (PSA) 10% e 7 µL de tetrametiletilenodiamina (temed). Em seguida foram submetidos à agitação breve e 30 minutos de incubação na estufa à 37 °C.

Para o gel de empilhamento de poliacrilamida 5%, foram utilizados: 250 µL de Tris-HCl pH 6,8; 20 µL de SDS; 330 µL de acrilamida; 1400 µL de água destilada; 17,5 µL de PSA

e 5 µL de temed. Também experienciaram agitação breve e incubação na estufa à 37 °C por 30 minutos.

Com o gel devidamente montado no equipamento de eletroforese, de acordo com as instruções do fabricante, e com uso de tampão adequado. A disposição dos poços, 12 por gel, ficou da seguinte maneira:

	P.1	P.2	P.3	P.4	P.5	P.6	P.7	P.8	P.9	P.10	P.11	P.12
<b>Gel 1</b>	Page Ruler	VP2	Pet	-	VP2	Pet	-	VP2	Pet	-	VP2	Pet
<b>Gel 2</b>	-	VP2	Pet	-	VP2	Pet	-	VP2	Pet	-	VP2	Pet

Tabela 2 - Disposição das amostras nos poços dos géis

Assim que foi finalizada a eletroforese, os poços um ao três do primeiro gel foram destacados do restante do material e corados à parte com *coomassie blue* 0,2% em ácido acético:metanol (50:10). Também foi feito o dimensionamento da área total de ambos os géis (Gel 1: 63 cm<sup>2</sup>; Gel 2: 72 cm<sup>2</sup>). Por fim, houve a marcação na parte inferior direita dos mesmos para identificar a sua frente.

### 2.3. Western Blotting

Identificado o sucesso da eletroforese pelo fragmento corado, foi realizada, então a remoção do gel de empilhamento dos géis não corados. Em seguida, os géis de separação, com sua frente já demarcada, foram mergulhados em tampão de transferência de proteína (metanol 20%, tris 25 mM, glicina 192 mM) por um período de 15 minutos.

Paralelamente, as membranas de *polyvinylidene fluoride* (PVDF) separadas para o teste foram dimensionadas e recortadas de modo a cobrir a área previamente mensurada dos géis. Depois, foram mergulhadas por um período de dez segundos em metanol 100%, lavadas com água

destilada por cinco minutos e, então, mergulhadas no tampão de transferência (metanol 20%, tris 25 mM, glicina 192 mM) por dez minutos.

Após os tratamentos, o equipamento de *eletroblotting* foi devidamente montado a partir das instruções do fabricante, com uso de tampão adequado (metanol 20%, tris 25 mM, glicina 192 mM) e acondicionado em baixa temperatura. A transferência ocorreu em uma hora e meia (90 minutos) à 100 V.

Concluída a transferência, as membranas foram retiradas do *eletroblotting*, mergulhadas em PBS 1x e, depois de secas ao ar livre, foram divididas em oito tiras, a partir da mensuração da distância entre os poços realizadas no gel, e foram devidamente mensuradas e individualmente demarcadas a partir da identificação do soro a ser utilizado em cada tira. Por fim, foram devidamente acondicionadas em papel filme na geladeira.

## **2.5. Imunodeteção**

Após remover o papel filme das tiras de membrana, estas foram mergulhadas em metanol 100% e, então, lavadas em água destilada por período de 5 minutos. Para evitar a ocorrência de ligações inespecíficas, foi utilizado o tampão de bloqueio (leite em pó desnatado 0,5% em PBS). O cálculo do volume de tampão foi realizado a partir da relação 1 mL/cm<sup>2</sup>, a área mensurada das tiras foi 22,5 cm<sup>2</sup>.

Então, as tiras foram incubadas com o tampão na estufa por um período de uma hora à 37 °C. Após, foram lavadas brevemente com tampão de lavagem (PBS-T) e depois submetidas a uma lavagem por mais cinco minutos.

Para o anticorpo primário, foram utilizados 11,25 µL a 1:100 dos soros bovinos previamente selecionados acrescido de 1113,75 µL de PBS1x-T. Paralelamente, em uma das membranas (6xHis) foi utilizado 0,56 µL a 1:2000 de anticorpo monoclonal anti-6xHis, acrescido de 1124,44 µL de PBS1x-T, no lugar do soro bovino. O volume utilizado para ambos

foi calculado a partir da razão de 50  $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ , considerando a área das membranas. Então, foram devidamente incubados em estufa por uma hora à 37 °C.

Após, as tiras foram submetidas a uma lavagem breve com PBS-T seguidas de mais duas lavagens de dez minutos cada.

Para o anticorpo secundário, foram utilizados 1,13  $\mu\text{L}$  a 1:1000 de proteína A-peroxidase (HRP), acrescido de 1123,84  $\mu\text{L}$  de PBS2x-T, nas membranas tratadas com soro bovino. Paralelamente, foram utilizados 2,25  $\mu\text{L}$  a 1:5000 de  $\alpha$ -IgG de camundongo conjugado com peroxidase, acrescido de 1122,75  $\mu\text{L}$  de PBS1x-T, na membrana incubada com anticorpo monoclonal anti-6xHis. O volume utilizado para ambos foi calculado a partir da razão de 50  $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ , considerando a área das membranas. Para o PBS2x-T foram utilizados 10 mL de PBS2x e 10  $\mu\text{L}$  de *Tween* 20. Então, foram devidamente incubados em estufa por uma hora à 37 °C.

Então, as tiras foram submetidas a uma lavagem breve com PBS-T seguida de mais três lavagens de dez minutos cada.

Por fim, as tiras foram acomodadas em um recipiente onde foram acrescentados 5 mL de 3,3'-diaminobenzidina (DAB) 10x e 45 mL de *stable peroxide substrate buffer* (SPSB). Após alguns minutos a reação já era visível a olho nu.

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Relativo às reações observáveis, temos que a tira de controle positivo (6x His), tratada com anti-6xHis e  $\alpha$ -IgG de camundongo conjugado com peroxidase, apresentou uma banda bem nítida e delimitada na região esperada. Por outro lado, as tiras tratadas com os soros 16042, 42 e 522 apresentaram uma mancha vertical, fraca e sem forma definida. Paralelamente, nas tiras tratadas com os soros 20012, 28 e 514 praticamente não era possível observar reação alguma.



Figura 1 - Da esquerda para a direita: 6x His; 16042; 28



Figura 2 - Da esquerda para a direita: 20012; 42; 514



Figura 3 - Tira 522

Apesar destes resultados, não se pode afirmar com veemência que os soros utilizados tenham sido falsos positivos para o contato com o vírus, uma vez que devemos levar em conta possíveis erros experimentais e propriedades não previstas antes.

A ausência de bandas nítidas, com exceção da tira 6xHis, pode ter ocorrido pois o conjugado proteína A-peroxidase (HRP) provavelmente não deve ter sido específico o suficiente para detectar os soros bovinos, que eram positivos, o que pode ter resultado em ligações em quantidade insuficiente para serem notadas. Isso porque esse conjugado pode ser utilizado para diversos hospedeiros, não sendo específico apenas para bovinos, como visto em MUNIZ (2023). No estudo citado, ela foi utilizada na detecção de amostras de gambá, cavalo e capivara, performando bem nos dois primeiros. Uma alternativa possível seria reavaliar o experimento com a utilização de IgG específico para bovinos para um resultado melhor.

A respeito das manchas observadas em 16042, 42 e 522, estas configuram-se como efeito de fundo, devido às ligações inespecíficas que ocorreram ao longo da membrana. A causa disso pode ter ocorrido durante a etapa do bloqueio, possivelmente o contato do bloqueio com as tiras não foi uniforme, pois não são todas que possuem o efeito de fundo e não há um padrão na forma das que o têm.

Por outro lado, no caso das tiras 28, 20012 e 514, o efeito de fundo não é observado o que implica que o bloqueio foi bem sucedido. Entretanto, a ausência de bandas ou marcações reforça uma quantidade mínima de ligações anticorpo-proteína realizadas.

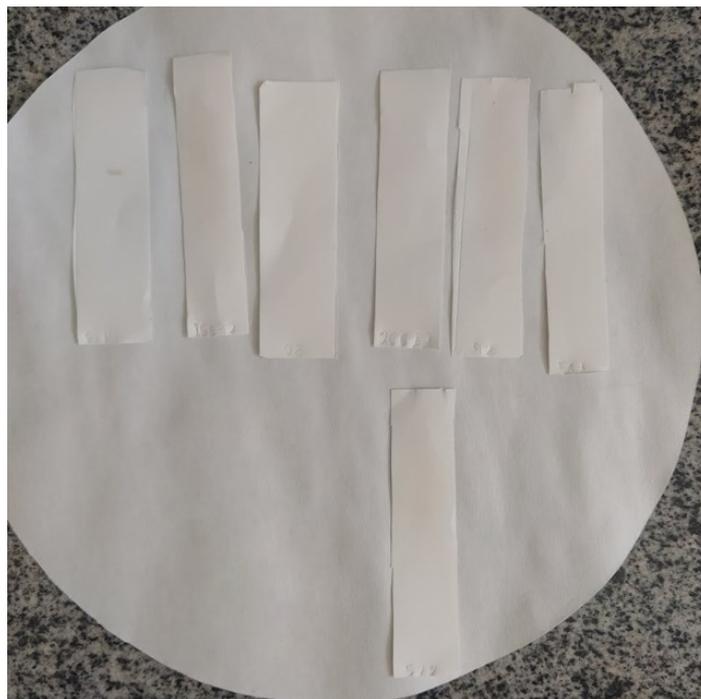


Figura 4 - Panorama geral das tiras

#### **4. CONCLUSÃO**

Entende-se que o MGTV, além de constituir um potencial risco econômico, também se configura como potencial caso de saúde pública e deve ser tratado com a devida atenção. No presente estudo, não houve a confirmação do ELISA conforme o esperado. Entretanto, devido à relevância do assunto, mais pesquisas sobre o vírus, sua transmissão e diagnóstico devem ser realizadas. Como mencionado anteriormente, uma das possibilidades seria a realização da imunodeteção com anticorpo específico para bovinos.

#### **5. REFERÊNCIAS**

CUNHA, Amanda Branquinho de Oliveira. EXPRESSÃO DA PROTEÍNA VIRAL 2 DO MOGIANA TICK VIRUS EM SISTEMA BACTERIANO E SUA OBTENÇÃO PARA UM TESTE DE DIAGNÓSTICO EM BOVINOS BASEADO EM IMUNOABSORÇÃO ENZIMÁTICA. Repositório Institucional – Universidade Federal de Uberlândia, 2023.

DE OLIVEIRA PASCOAL, Jamile et al. Detection and molecular characterization of Mogiana tick virus (MGTV) in Rhipicephalus microplus collected from cattle in a savannah area, Uberlândia, Brazil. Ticks and tick-borne diseases, v. 10, n. 1, p. 162-165, 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.10.002>

IBGE. Rebanho de Bovinos (Bois e Vacas). 2022. Disponível em:

<https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/bovinos/br>. Acesso em: 20 de novembro de 2023.

IBGE, 2022. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção da Pecuária. Disponível em:

<https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html?=&t=resultados>. Acesso: 24 de agosto de 2022.

GRISI, L., LEITE, R.C., MARTINS, J.R.S., BARROS, A.T.M., ANDREOTTI, R., CANÇADO, P.H.D., LEON, A.A.P., PEREIRA, J.B., VILLELA, H.S. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. Braz. J. Vet. Parasitol. v. 23, p. 150-156, 2014.

<https://doi.org/10.1590/S1984-29612014042>

JIA, NA et al. Emergence of human infection with Jingmen tick virus in China: A retrospective study. EBioMedicine, v. 43, p. 317-324, 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.04.004>

KOBAYASHI, Daisuke et al. Detection of jingmenviruses in Japan with evidence of vertical transmission in ticks. Viruses, v. 13, n. 12, p. 2547, 2021. <https://doi.org/10.3390/v13122547>

KURIEN, Biji T.; SCOFIELD, R. Hal. Western blotting. Methods, v. 38, n. 4, p. 283-293, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2005.11.007>

LADNER, Jason T. et al. A multicomponent animal virus isolated from mosquitoes. Cell host & microbe, v. 20, n. 3, p. 357-367, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.07.011>

MARUYAMA, Sandra Regina et al. Characterisation of divergent flavivirus NS3 and NS5 protein sequences detected in Rhipicephalus microplus ticks from Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 109, p. 38-50, 2013. <https://doi.org/10.1590/0074-0276130166>

MUNIZ, Ana Paula Mendes et al. Evaluation of a mimotope of the Rickettsia outer membrane protein A (OmpA) as an antigen in enzyme-linked immunosorbent assay to detect rickettsiosis in capybaras (Hydrochoerus hydrochaeris), horses (Equus caballus), and opossums (Didelphis sp.). Experimental and Applied Acarology, v. 89, n. 2, p. 317-327, 2023. <https://doi.org/10.1007/s10493-023-00776-5>

QIN, Xin-Cheng et al. A tick-borne segmented RNA virus contains genome segments derived from unsegmented viral ancestors. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 111, n. 18, p. 6744-6749, 2014. <https://doi.org/10.1073/pnas.1324194111>

SIMMONDS, Peter; AIEWSAKUN, Pakorn. Virus classification—where do you draw the line?. Archives of virology, v. 163, p. 2037-2046, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00705-018-3938-z>

SOUZA, William Marciel de et al. Viral diversity of Rhipicephalus microplus parasitizing cattle in southern Brazil. Scientific reports, v. 8, n. 1, p. 16315, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34630-1>

VANDEGRIFT, Kurt J.; KAPOOR, Amit. The ecology of new constituents of the tick virome and their relevance to public health. Viruses, v. 11, n. 6, p. 529, 2019. <https://doi.org/10.3390/v11060529>

VILLA, Erika C. et al. Complete coding genome sequence for Mogiana tick virus, a Jingmenvirus isolated from ticks in Brazil. Genome announcements, v. 5, n. 18, p. 10.1128/genomea.00232-17, 2017. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00232-17>

WANG, Ze-Dong et al. A new segmented virus associated with human febrile illness in China. *New England Journal of Medicine*, v. 380, n. 22, p. 2116-2125, 2019.

<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1805068>

WU, Zhen et al. Jingmen tick virus: an emerging arbovirus with a global threat. *Msphere*, v. 8, n. 5, p. e00281-23, 2023. <https://doi.org/10.1128/msphere.00281-23>

ZHANG, Xu et al. The discovery of segmented flaviviruses: implications for viral emergence. *Current opinion in virology*, v. 40, p. 11-18, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2020.02.001>