

XVIII MET

Encontro Nacional sobre Metodologias e Gestão
de Laboratórios e V Simpósio sobre Procedimentos Analíticos
e a Rastreabilidade dos Resultados na Agropecuária

TRABALHOS
APRESENTADOS

**O mundo atrás
da bancada**

**28 de outubro
a 1º de novembro
2013**

Hotel Pestana
Salvador - Bahia



Implementação da técnica de RT-PCR em tempo real para diagnóstico viral no Laboratório de Virologia da Embrapa Uva e Vinho

Marcos Fernando Vanni, Thor Vinícius Martins Fajardo, Osmar Nickel
Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS. e-mail: marcos.vanni@embrapa.br; thor.fajardo@embrapa.br;
osmar.nickel@embrapa.br

Ferramentas de diagnóstico são amplamente usadas visando à detecção viral e incluem testes biológicos e métodos sorológicos, ambos com baixo custo e simplicidade, porém menor sensibilidade. Testes moleculares (RT-PCR) são bastante sensíveis, entretanto, inadequados para análise de muitas amostras (pois requerem avaliação em géis). A RT-PCR em tempo real, com sondas específicas marcadas com fluoróforos, vem ganhando espaço no diagnóstico viral em função das vantagens sobre outras técnicas, sobretudo a RT-PCR. O objetivo do trabalho foi avaliar a eficiência e o impacto da implantação da RT-PCR em tempo real para a detecção de 12 vírus de videira (GLRaV-1, -2, -3, -4 e -5, GVA, GVB, GVD, GRSPaV, GFkV, GFLV, GRVfV) e 4 de macieira/pereira (ASGV, ASPV, ACLSV, ApMV) no Laboratório de Virologia da Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves-RS. Os oligonucleotídeos, as sondas e as reações de RT-PCR em tempo real foram descritos previamente ou desenvolvidos em pesquisa conduzida neste laboratório. RNAs totais de videira e macieira/pereira, sadia e infectada, foram usados em ensaios do tipo presença/ausência, utilizando-se o kit TaqMan Master Mix One-Step RT-PCR e o termociclador StepOnePlus Real-time PCR System (Applied Biosystems). Foram indexadas amostras provenientes de quatro origens: amostras provenientes do programa de limpeza clonal e de experimentos conduzidos pelo laboratório; amostras de rotina e prestação de serviço de diagnóstico para terceiros. A implantação da técnica de RT-PCR em tempo real pelo Lab. de Virologia ocorreu em março/2011 e junho/2012, tendo sido desenvolvidas reações em 123 e 46 placas (de 96 poços), para a detecção de vírus de videira e macieira, respectivamente. Foi possível detectar de maneira precisa todos os vírus acima citados em várias amostras infectadas e provenientes das quatro origens. A técnica de RT-PCR em tempo real encontra-se estabelecida no Lab. de Virologia, substituindo, com vantagens em procedimento rotineiro, outras técnicas diagnósticas. A implementação da RT-PCR em tempo real incrementou a qualidade da indexação de patógenos virais, pois agregou rapidez, confiabilidade, especificidade e aplicabilidade a análise das amostras. O custo da reação de diagnose por esta técnica era um ponto negativo para sua implantação, entretanto, este custo vem se reduzindo gradualmente.