

**Maria Emília de Oliveira**

**VARIABILIDADE GENÉTICA DE AMOSTRAS  
BRASILEIRAS DE HERPESVÍRUS BOVINO 1 E 5**

**Belo Horizonte - 2005**

**Maria Emília de Oliveira**

**VARIABILIDADE GENÉTICA DE AMOSTRAS  
BRASILEIRAS DE HERPESVÍRUS BOVINO 1 E 5**

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Microbiologia

**Orientador: Maurício Resende**

**Co-orientador: Nivaldo da Silva**

**Belo Horizonte - 2005**

Dedico este trabalho a minha querida mãe Natércia, que dedicou sua vida em função da família.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Maurício Resende, por me dado a oportunidade de crescer cientificamente e pela imprescindível ajuda para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Nivaldo da Silva pelas sugestões dadas no projeto, que foram essenciais para realização deste trabalho.

À Prof. Erna Kroon pela ajuda durante a execução dos experimentos e pelos conselhos na qualificação desta tese.

À Cristina, secretária do curso de pós-graduação, pela atenção e paciência durante todos estes anos de pós.

Ao Professor Ary Corrêa Júnior pela ajuda nas fotografias de cultivo celular.

Aos professores e funcionários do Departamento de Microbiologia, por toda colaboração.

Ao Flavio Guimarães da Fonseca e à Prof. Patrícia Cisalpino pela revisão deste trabalho e muito boa vontade em me ajudar.

Às minhas queridas companheiras do LEVECÊ, Adriana, Elisa, Érica, Fabíola, Fabiana, Josiane, Karina, Rosiany que durante todo este tempo agüentarem meu “bom” humor. Obrigada pela companhia e inúmeros momentos que passamos juntas. Em especial a Fabíola e Fabiana que participaram ativamente da execução e finalização deste trabalho.

À Adriana e ao Johnny pela grande ajuda na finalização deste trabalho.

À Tânia Mara por me ensinar tudo que sei de cultivo celular e pela valiosa ajuda dentro e fora do laboratório.

À Marília pela amizade e pelo delicioso pão de queijo.

Aos amigos do Laboratório de Vírus por toda ajuda e agradável convivência.

À minha família, meu porto seguro. Em especial ao seu Francisco e à Terezinha, minha eterna gratidão por tudo que fizeram e fazem por mim. Sem vocês jamais teria chegado aonde cheguei.

À Dinha, por sempre me apoiar, aconselhar e por ter “deixado” a Biologia para mim.

À Betânia com quem pude contar dentro e fora do laboratório. A você meu muito obrigado por toda ajuda nos experimentos, e principalmente pelo apoio na finalização deste trabalho. Para aonde quer que a vida me leve terei você sempre em meu coração.

À Neila, Lemuel, Juliete e Diana, pela amizade e por sempre me abrigarem.

À Marina e Chico, pela amizade e boa companhia.

À Fernanda, João, Zózimo e Pompéia que sempre me acolhem com muito carinho.

A todos meus amigos pelos momentos felizes que passamos juntos.

## SUMÁRIO

<b>1 - LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>i</b>
<b>2 - LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>iv</b>
<b>3- LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>vii</b>
<b>4. RESUMO.....</b>	<b>xi</b>
<b>5. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>13</b>
<b>6 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>16</b>
<b>6.1 – O herpesvírus bovino 1 e herpesvírus bovino 5 .....</b>	<b>17</b>
<b>6.2 – A estrutura da partícula viral.....</b>	<b>20</b>
<b>6.3 – A estrutura do genoma.....</b>	<b>21</b>
<b>6.4 – As proteínas virais.....</b>	<b>21</b>
<b>6.5 - A Glicoproteína B.....</b>	<b>22</b>
<b>6.6 – O ciclo reprodutivo.....</b>	<b>23</b>
<b>6.7 - Doenças e sinais clínicos.....</b>	<b>26</b>
<b>6.8 - Transmissão e Epidemiologia.....</b>	<b>27</b>
<b>6.9 - Diagnóstico.....</b>	<b>28</b>
<b>6.10 - Prevenção e Controle.....</b>	<b>29</b>
<b>7 – OBJETIVOS.....</b>	<b>32</b>
<b>7.1 - Objetivo Geral.....</b>	<b>33</b>
<b>7.2 - Objetivos Específicos.....</b>	<b>33</b>
<b>8 - MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>34</b>
<b>8.1 - Amostras Virais.....</b>	<b>35</b>
<b>8.2 - Cultivo Celular e Multiplicação Viral.....</b>	<b>37</b>
<b>8.3 - Extração do DNA Genômico dos Isolados.....</b>	<b>37</b>
<b>8.4 - Extração do DNA Genômico das Amostras Clínicas.....</b>	<b>39</b>
<b>8.5 - Quantificação do DNA.....</b>	<b>39</b>
<b>8.6 - Amplificação do Gene que Codifica para a Glicoproteína .....</b>	<b>39</b>
<b>8.7 - Fragmentação do Produto da PCR com Enzima de Restrição.....</b>	<b>44</b>
<b>8.8 - Purificação do Produto da PCR.....</b>	<b>44</b>
<b>8.9 - Clonagem dos Produtos de PCR.....</b>	<b>45</b>
<b>8.10 - Triagem dos Plasmídios Recombinantess.....</b>	<b>45</b>

8.11 - Obtenção do DNA Plasmidial em Pequena Escala.....	46
8.12 - Sequenciamento.....	46
8.13 - Análise Computacional das Sequências.....	47
8.14 - Construção de árvores filogenéticas.....	48
9 – RESULTADOS.....	49
9.1 - Multiplicação viral em Células MDBK.....	50
9.2 - Extração do DNA.....	53
9.3 - Amplificação do Gene que Codifica para a Glicoproteína B.....	55
9.4 - Fragmentação do produto da PCR com enzima de restrição.....	58
9.5 - Clonagem.....	59
9.6 - Análise das Sequências de Nucleotídeos.....	61
9.7 - Análise das Sequências Inferidas de Aminoácidos.....	72
9.8 - Análise filogenética.....	80
10 - DISCUSSÃO.....	83
11 - CONCLUSÕES.....	94
12 -REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96
13 -ANEXOS.....	120

## **1. LISTA DE FIGURAS**

## 1. LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1:</b> Desenho esquemático da organização estrutural do BHV.....	<b>20</b>
<b>FIGURA 2:</b> Diagrama representando o ciclo de replicação de um herpesvírus típico.....	<b>25</b>
<b>FIGURA 3:</b> Desenho esquemático do posicionamento dos OI na seqüência do gene que codifica para gB da amostra Cooper.....	<b>41</b>
<b>FIGURA 4:</b> Efeito citopático da amostra BH 80 (BHV-1) isolada de swab nasal, 24 horas após infecção em células MDBK.....	<b>51</b>
<b>FIGURA 5:</b> Efeito citopático da amostra EVI-190 (BHV-5) isolada de cérebro, 24 horas após infecção em células MDBK.....	<b>52</b>
<b>FIGURA 6A e 6B:</b> Amplificação, por PCR, de parte do gene que codifica para a glicoproteína B, utilizando os iniciadores LVC 120 e 121 de isolados brasileiros de herpesvírus bovino.....	<b>56</b>
<b>FIGURA 7:</b> Amplificação, por PCR, de parte do gene que codifica para a glicoproteína B, utilizando os iniciadores LVC 120 e 121, do isolado brasileiro 1218 e da amostra Cooper (padrão de herpesvírus bovino) respectivamente.....	<b>57</b>
<b>FIGURA 8:</b> Fragmentos gerados após digestão com a enzima <i>Sma</i> I do produto amplificado pelos iniciadores LVC 120 e 121 de parte do gene que codifica para a glicoproteína B, de isolamentos de amostra clínica do herpesvírus bovino.....	<b>58</b>
<b>FIGURA 9:</b> Fragmentos gerados pela digestão dos DNAs plasmidiais pCR®4 recombinantes com a enzima de restrição <i>Eco</i> RI.....	<b>60</b>
<b>FIGURA 10:</b> Alinhamento das seqüências de nucleotídeos do fragmento que codifica para gB das amostras de herpesvírus bovino 1 e 5 analisadas neste estudo com	

amostras de herpesvírus depositadas no GenBank..... 63

**FIGURA 11:** Alinhamento das seqüências de aminoácidos traduzidas na segunda fase de leitura do fragmento do gene que codifica para a gB das analisadas neste trabalho, com amostras de herpesvírus depositadas no GenBank..... 75

**FIGURA 12:** Árvore filogenética consenso(cladograma) dos herpesvírus BHV-1, BHV-5, BuHV-1, Cer-HV-1 e RanHV-1, com base na seqüência de nt de parte do gene que codifica para a gB..... 81

**FIGURA 13:** Árvore filogenética consenso(cladograma) dos herpesvírus BHV-1, BHV-5, BuHV-1, Cer-HV-1 e RanHV-1, com base na seqüência de aa de parte do gene que codifica para a gB..... 82

## **2. LISTA DE TABELAS**

## 2. LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1:</b> Glicoproteínas do herpesvírus bovino 1 e 5.....	<b>22</b>
<b>TABELA 2:</b> Identificação, procedência, espécime, local e data da coleta das amostras de herpesvírus bovino utilizadas neste trabalho.....	<b>36</b>
<b>TABELA 3:</b> Oligonucleotídeos desenhados para a amplificação por PCR do gene que codifica para a glicoproteína B do BHV-1 e 5.....	<b>40</b>
<b>TABELA 4:</b> Condições dos ciclos da PCR utilizadas nos experimentos, tamanho dos fragmentos, Tm dos pares de OL.....	<b>43</b>
<b>TABELA 5:</b> Concentração de DNA (ng/μL) extraído das amostras de vírus.....	<b>53</b>
<b>TABELA 6:</b> Concentração de DNA viral (ng/μL) extraído dos isolados usando a metodologia de extração de DNA com NaOH.....	<b>54</b>
<b>TABELA 7:</b> Concentração de DNA total obtido das amostras clínicas (ng/μL) usando a metodologia de extração de DNA com NaOH.....	<b>54</b>
<b>TABELA 8:</b> Amplificações obtidas através da PCR, variações de primer e fragmento esperado.....	
<b>TABELA 9:</b> Porcentagem de similaridade nucleotídica entre as seqüências do fragmento do gene que codifica para a gB dos herpesvírus seqüenciados e das amostras de herpesvírus depositadas no GenBank, utilizando.....	<b>63</b>
<b>TABELA 10:</b> Número de mutações ocorridas nas seqüências de nucleotídeos das amostras seqüenciadas, quando comparadas entre elas e com as seqüências homólogas das amostras Cooper, K22, N569, SV507, Banffishare, Salla e B6.....	<b>70</b>

**TABELA 11:** Tipos de mutações ocorridas no fragmento do gene que codifica para a glicoproteína B dos herpesvírus bovinos seqüenciados. A mutações listadas dos BHV-1 foram analisadas em relação à seqüência nucleotídica da amostra padrão de BHV-1 (Cooper) e as mutações dos BHV-5 em relação à seqüência nucleotídica da amostra padrão de BHV-5 (N569)..... **71**

**TABELA 12:** Porcentagem de similaridade entre as seqüências de aminoácidos inferidos do fragmento do gene que codifica para a gB dos herpesvírus seqüenciados e das amostras de herpesvírus depositadas no GenBank, utilizando-se o programa BLASTx..... **74**

### **3. LISTA DE ABREVIATURAS**

### **3. LISTA DE ABREVIATURAS**

BHV - Herpesvírus Bovino

BHV-1 - Herpesvírus Bovino 1

BHV-5 - Herpesvírus Bovino 5

BSA - Soro Albumina Bovino

BuHV-1 – Herpesvírus de Búfalo 1

CerHV-1 – Herpesvírus de Cervídeo 1

DMEM - Meio Modificado de Dulbecco

DNA - Ácido Desoxiribonucleico

ECP - Efeito Citopático

EDTA - Ácido Etilenodiaminotetracético

ELISA – “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”

IBR - Rinotraqueíte Infecciosa dos Bovino

ICTV - Comitê Internacional para a Taxonomia dos Vírus

IPB - Balanopostite Pustular Infecciosa

IPV - Vulvovaginite Pustular Infecciosa

gb - Glicoproteína B

gC - Glicoproteína C

gD - Glicoproteína D

gE - Glicoproteína E

gG - Glicoproteína G

gH - Glicoproteína H

gI - Glicoproteína I

gK - Glicoproteína K

gL - Glicoproteína L

gM - Glicoproteína M

HSV – Herpesvírus Humano 1

Kb - Kilobases

KDa – Quilo Dalton

LB – Meio Lúria Bertani

MDBK - Linhagem de Células Renais de Bovino (Madin Darby Bovine Kidney)

pb - Pares de base

PCR – Reação em cadeia pela polimerase

RanHV-1 – Herpesvírus de Rangiferino

RFLP – Polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição

rmp – Rotações por minuto

SDS - Duodecil sulfato de sódio

TBE - Tris Borato EDTA

TCID – Dose infectante em cultura de tecido

TE - Tris EDTA

UI – Unidades internacionais

UL - Região Única Longa

US - Região Única Curta

UV - Ultravioleta

TK - Timidina Quinase

$\alpha$ -TIF - Proteína do Tegumento com Função Regulatória

## **4. RESUMO**

#### 4. Resumo

Os principais herpesvírus bovinos identificados no Brasil são o herpesvírus bovino 1 (BHV-1) e o herpesvírus bovino 5 (BHV-5). O BHV-1 causa infecção do trato respiratório, podendo provocar também conjuntivite e aborto e o BHV-5 é o agente causal da encefalite bovina. Devido às extensas reações sorológicas cruzadas existentes entre eles a diferenciação entre BHV-1 e 5 tem sido feita através de análises do perfil de restrição do genoma destes vírus e ainda pela reação em cadeia pela polimerase. Como o BHV-1 e 5 exibem 85% de similaridade no seu genoma, o fragmento amplificado pode ser de mesmo tamanho nos dois vírus e por isto o PCR tem sido usado em conjunto com a RFLP. A caracterização molecular das amostras brasileiras de BHV ainda não está bem estabelecida, portanto, o presente trabalho foi desenvolvido com os objetivos de realizar uma caracterização biológica das amostras brasileiras de BHV-1 e 5, estabelecer um método de diferenciação entre elas, e determinar sua diversidade genética quanto a gB e relação filogenética. A caracterização biológica foi realizada pela observação do comportamento das amostras em cultivo celular. Para a obtenção do DNA viral foram testadas três diferentes metodologias, e a técnica de extração que utiliza o NaOH foi escolhida e otimizada. O DNA obtido tanto a partir de amostras de cultivo celular quanto de amostras clínicas foi utilizado na PCR, e a diferenciação entre as amostras de BHV-1 e 5 foi realizada pela RFLP do fragmento amplificado do gene que codifica para a glicoproteína B. O fragmento amplificado foi seqüenciado sendo observada a diversidade genética quanto a gB das amostras. Como resultado pudemos observar diferenças no efeito citopático entre as amostras de BHV-1 e BHV-5 infectadas em células MDBK. Após a otimização de metodologias de extração de DNA viral a escolhida para uso em nossos experimentos foi aquela em que se utiliza o NaOH, sendo a que apresentou um custo menor, foi a mais rápida e eficiente. O uso em conjunto da extração do DNA com NaOH e a PCR/RFLP foi ferramenta para uma rápida diferenciação entre as amostras de BHV-1 e 5, sugerindo o seu uso no diagnóstico direto de amostras clínicas. Foi observado uma conservação significativa entre as seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos de parte do gene que codifica para a gB das amostras brasileiras analisadas neste trabalho com as e outros vírus da família *Herpesviridae*. A análise filogenética confirmou a proximidade entre as amostras analisadas neste estudo com as amostras de herpesvírus de bovino, búfalo, rangiferino e cervídeo.

## **5. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA**

## **5. Introdução e justificativa**

O herpesvírus bovino 1 (BHV-1) e o herpesvírus bovino 5 (BHV-5) são responsáveis por severas doenças respiratórias, reprodutivas, neonatais, dermatológicas, e neurológicas de bovinos. Uma das mais importantes síndromes associadas as infecções por BHV-1 é a doença respiratória multifatorial, causadora de grandes perdas na pecuária, como por exemplo, na América do Norte onde esta perda é estimada em 1 milhão de dólares por ano. Aproximadamente 30 a 50% da população bovina brasileira (cerca de 50 milhões de animais), estão contaminadas com o BHV-1. Quanto ao BHV-5 as taxas mundiais de incidência de infecções são, ainda, desconhecidas, provavelmente devido à indisponibilidade de métodos de diagnósticos capazes de diferenciar infecções causadas por BHV-1 e BHV-5.

O Laboratório de Virologia Comparada (LVC) está envolvido com isolamento e identificação do herpesvírus bovino (BHV) há 30 anos. Nas décadas de 70 e 80 amostras de BHV, isoladas do trato respiratório, genital e sêmen de bovinos foram identificadas por soroneutralização, liofilizadas e estocada. Há alguns anos foi possível dar continuidade aos estudos sobre BHV no LVC onde foram desenvolvidos diversos trabalhos como, por exemplo, a classificação de uma amostra isolada de um quadro clínico de BHV-1 como BHV-5 e uma amostra isolada a partir de um swab nasal como BHV-1.2 que é uma amostra tipicamente genital.

As metodologias para a detecção de rotina do BHV-1 estão bem estabelecidas, entretanto sua eficiência é comprometida por reações cruzadas com outros alfa herpesvírus que infectam ruminantes, dificultando o diagnóstico que é essencial para a prevenção e o controle da disseminação do vírus nos bovinos. O diagnóstico das infecções causadas por herpesvírus é feito principalmente pelo isolamento do vírus em cultivo, porém esta técnica é trabalhosa e pode não ser sensível para detectar um pequeno número de partículas virais. Portanto, uma das alternativas que têm sido muito utilizadas é a amplificação do DNA do herpesvírus bovino através da reação em cadeia pela polimerase (PCR). No entanto o BHV-1 e o BHV-5 exibem 85% de similaridade no seu genoma, o que pode gerar a amplificação de fragmentos de DNA de tamanhos semelhantes. Desse modo, para diferenciar as amostras de BHV-1 e BHV-5 a metodologia utilizada é a digestão enzimática do fragmento amplificado pela PCR.

O DNA utilizado na PCR deve estar livre de substâncias que possam inibir sua amplificação e os métodos de extração de DNA mais utilizados são o fenol:clorofórmio e o Chelex-100. O método do fenol:clorofórmio leva um tempo relativamente grande para ser realizado além de apresentar um custo elevado e envolver o uso de reagentes tóxicos. A principal desvantagem do método que utiliza o Chelex-100 é o custo elevado apesar de consumir um tempo menor em relação ao método do fenol:clorofórmio para ser executado e de utilizar um solvente orgânico não tóxico.

A estimativa exata da relação evolucionária entre vírus provavelmente requer a análise do genoma completo. Entretanto, como o sequenciamento de genomas grandes é complicado, como é o caso dos herpesvírus, a filogenia é usualmente inferida de genes individuais. Neste sentido a gB tem surgido como o gene mais estudado para analisar a distância genética entre os herpesvírus porque além de ser a maior glicoproteína é bastante conservada.

Neste trabalho nós descrevemos um método de extração rápido, barato e simples para a extração do BHV-1 e BHV-5 para uso em PCR. Além disto propusemos um método de diferenciação de amostras de BHV-1 e 5 utilizando-se a PCR seguida da digestão com enzimas de restrição. Para estabelecer a proximidade genética entre as amostras de BHV-1 e BH-5 nós escolhemos sequenciar o gene que codifica para a glicoproteína B (gB) através da comparação das seqüências deste gene, pois esta glicoproteína é bastante conservada e tem sido usada para analisar a distância genética entre os herpesvírus.

A caracterização molecular das amostras brasileiras de BHV ainda não está bem estabelecida, portanto, o presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo principal de determinar a diversidade genética e relação filogenética das amostras de BHV disponíveis no LVC.

## **6. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## 6. Revisão Bibliográfica

### 6.1 O herpesvírus bovino 1 e herpesvírus bovino 5

Os herpesvírus são agentes causais de várias doenças em bovinos sendo objetos de planos de controle e erradicação em todo mundo, já que estas infecções estão associadas a sérias perdas econômicas (ACKERMANN *et al.*, 2002).

A propriedade mais notável dos vírus pertencentes à família *Herpesviridae* é a sua capacidade de estabelecer infecções latentes em seus hospedeiros e apresentar reativação periódica (ROCK, 1994). Esta família foi subdividida em três subfamílias *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* e *Gamaherpesvirinae* sendo que esta classificação se baseia nas propriedades biológicas destes vírus, como tipo de ciclo replicativo e tempo de multiplicação em cultivo celular, além do tipo de célula onde é estabelecida a latência no hospedeiro (ROIZMAN *et al.*, 1992).

Os membros da subfamília *Alphaherpesvirinae* são citolíticos, de replicação rápida e têm a capacidade para invadir, replicar e estabelecer latência em células do sistema nervoso do hospedeiro (ENQUIST *et al.*, 1994; 1998). Os membros da subfamília *Betaherpesvirinae* são citomegálicos, de replicação lenta e tornam-se latentes nas glândulas secretórias e nos rins. Os membros da subfamília *Gamaherpesvirinae* possuem um tempo de replicação intermediário entre as duas outras subfamílias, sendo linfotrópicos e estabelecendo latência neste tecido (ROIZMAN *et al.*, 1992).

Os principais herpesvírus bovinos identificados no Brasil são o herpesvírus bovino 1 (BHV-1) e o herpesvírus bovino 5 (BHV-5) (TEIXEIRA *et al.*, 1998). O BHV-1 e o BHV-5 estão classificados na família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae* (ROIZMAN *et al.*, 1992), gênero *Varicellovirus* (BROWN, 1989).

O BHV-1 é conhecido como um dos principais patógenos virais que acometem o gado bovino (WEIBLEN *et al.*, 1996), causando uma severa infecção do trato respiratório, a rinotraqueíte infecciosa (IBR), podendo provocar também conjuntivite e aborto. A IBR está listada na

seção B, do diretório liberado pela OIE (Office International des Epizooties), que inclui doenças transmissíveis que são consideradas de importância sócio-econômica e/ou de saúde pública e que são importantes no comércio internacional de animais e produtos de animais (TURIN *et al.*, 2003). Infecções também podem ocorrer no trato genital, denominadas de vulvovaginite pustular infecciosa (IPV) e balanopostite pustular infecciosa (IPB), e no sistema nervoso provocando encefalite com alta taxa de morbidade e baixa taxa de letalidade. Infecções secundárias por bactérias podem estar associadas com as infecções causadas por BHV-1 (YATES, 1982; WYLER *et al.*, 1989; ROELS *et al.*, 2000).

O BHV-1 foi inicialmente isolado de animais na Califórnia, Estados Unidos, sendo identificado por MADIN *et al.* (1956) como herpes bovino. No Brasil, GALVÃO *et al.* (1963) e WIZIGMAN *et al.* (1972) demonstraram, através de provas de soroneutralização, a presença de anticorpos neutralizantes contra o BHV-1 nos Estados da Bahia, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul. Em 1978, MUELLER *et al.* isolaram o vírus a partir de rim de um feto abortado, no Estado de São Paulo e neste mesmo ano, ALICE isolou o vírus a partir de fístulas vaginais de um animal infectado, no Estado da Bahia. O BHV-1 é classificado em BHV-1.1, que provoca doença respiratória e BHV 1.2, que está associado a doenças genitais e ao aborto (MILLER *et al.* 1991). METZLER *et al.* (1985) classificaram amostras de BHV-1 em BHV-1.1 e BHV-1.2, tendo como base o perfil de restrição após digestão do DNA genômico com a endonuclease de restrição *Hind* III.

O BHV-5 é o agente causal da encefalite bovina (MURPHY *et al.*, 1999) e a amostra protótipo, N569, foi isolada pela primeira vez de um surto da doença em Queensland, Austrália (FRENCH, 1962a; 1962b). A ocorrência deste vírus tem sido descrita na Europa (MAGYAR *et al.*, 1993), Estados Unidos (EUGSTER *et al.*, 1974; d'OFFAY *et al.*, 1993), Argentina (CARRILLO *et al.*, 1983), Uruguai (DIAS *et al.*, 1982) e Brasil (VASCONCELOS *et al.*, 1993; SCHILD *et al.*, 1994; RIET-CORREA & SCHILD, 1995). Em 1998, SALVADOR *et al.*, descreveram focos de encefalite causada por BHV-5 em bovinos nos Estados do Mato Grosso do Sul e em São Paulo. Além disto, OLIVEIRA (2001) caracterizou amostras brasileiras de herpesvírus bovino, isoladas em Minas Gerais, de animais com diferentes sinais clínicos e observou que uma amostra isolada de caso de aborto apresentou perfil de restrição do DNA genômico de BHV-5. Os casos de BHV-5 causando encefalite têm

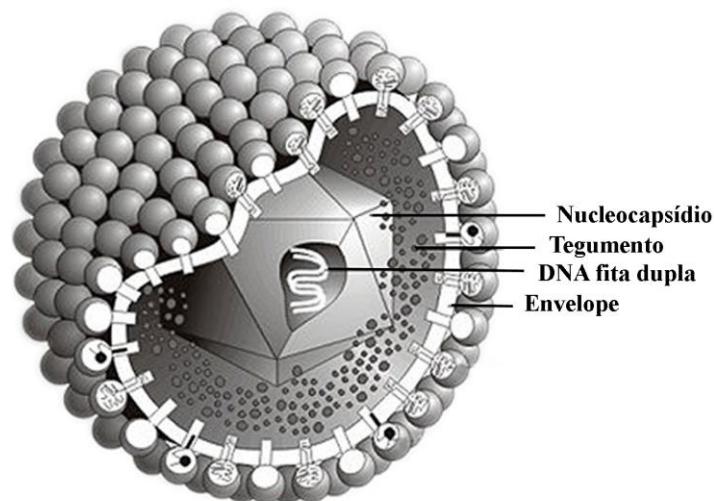
sido descritos principalmente em animais jovens com menos de 18 meses ou recém desmamados. Contudo, SANCHES *et al.* (2000) relataram casos de infecção por BHV-5 em uma novilha de dois anos e também em vacas adultas. No Brasil, a encefalite bovina vem sendo observada acometendo bezerros de menos de um mês de idade (WEIBLEN *et al.*, 1989), bovinos recém desmamados (RIET-CORRÊA & SCHILD, 1995) ou até com 2,5 anos de idade (VASCONCELOS *et al.*, 1993; SCHILD *et al.*, 1994).

Até recentemente, as amostras do BHV-5 eram consideradas “variantes encefalitogênicas” do BHV-1, devido às amplas reações cruzadas detectadas em testes sorológicos (ENGELS *et al.*, 1981; BRATANICH *et al.*, 1991; TEIXEIRA *et al.*, 1998) e devido às significantes similaridades antigênicas destes dois vírus (FRIEDLI & METZLER, 1987; COLLINS *et al.*, 1993; d’OFFAY *et al.*, 1995). Nos anos 80, diferenças significantes foram reveladas entre amostras neurovirulentas e não neurovirulentas de BHV-1, pela comparação do padrão de restrição do DNA genômico (BRAKE & STUDDERT, 1985; ENGELS *et al.*, 1987), pela antigenicidade e perfil protéico destas amostras (COLLINS *et al.*, 1993). ENGELS *et al.* (1987) demonstraram por análises de restrição do DNA genômico que os genomas de amostras respiratórias e de amostras nervosas exibem apenas 85% de similaridade. No entanto, as diferenças genômicas, antigênicas e epidemiológicas deste vírus, além da associação com encefalites, fizeram com que fosse reclassificado, recebendo então a denominação atual de BHV-5 (ROIZMAN *et al.*, 1992). Embora o BHV-1 e o BHV-5 estejam intimamente relacionados, eles exibem importantes diferenças nos níveis genético e imunogênico que podem explicar as diferenças na sua patogenicidade e epidemiologia (METZLER *et al.*, 1986; WILLIAMS & KWOK, 1992; BELKNAP *et al.*, 1994; ASHBAUGH *et al.*, 1997).

Atualmente, a diferenciação entre BHV-1 e 5 tem sido feita através de análises do perfil de restrição do genoma destes vírus (PIDONE *et al.*, 1999; D’ARCE *et al.*, 2002; OLIVEIRA, 2003) e ainda pela reação em cadeia pela polimerase (PCR) (ROS *et al.*, 1999; MOORE *et al.*, 2000). No entanto o BHV-1 e o BHV-5 exibem 85% de similaridade no seu genoma, o que pode gerar uma amplificação de produtos de mesmo tamanho nos dois vírus. Por isto o PCR tem sido usado em conjunto com a digestão com enzima de restrição do fragmento amplificado (LYAKU *et al.*, 1996; ROS & BELÁK, 1999).

## 6.2 A estrutura da partícula viral

Como em outros herpesvírus, o vírion do BHV-1 e do BHV-5 é estruturalmente composto por envelope, tegumento, nucleocapsídeo e DNA. O tegumento é uma estrutura amorfa que se localiza entre o nucleocapsídeo e a membrana (FIGURA 1). Algumas proteínas existentes no tegumento são importantes para a liberação do DNA genômico viral no início da infecção, para a formação do nucleocapsídeo, para o empacotamento do DNA viral e para a regulação da expressão dos genes virais (LIANG *et al.*, 1991; STEVEN & SPEAR, 1997). O processo de montagem do tegumento e a função exata da maioria das proteínas nele contidas não estão claras, no entanto, sabe-se que a análise do genoma do BHV-1 revela que no mínimo 16 proteínas estão presentes no tegumento (LAM & LETCHWORTH, 2000). O capsídeo destes vírus possui de 95-110 nm de diâmetro (STEVEN & SPEAR, 1997), consistindo de 162 capsômeros, sendo 12 pentâmeros e 150 hexâmeros (FITZPATRICK *et al.*, 1990; LIANG *et al.*, 1991; STEVEN & SPEAR, 1997).



**FIGURA 1:** Desenho esquemático da organização estrutural do BHV.

### 6.3 A estrutura do Genoma

O genoma do BHV-5 é de 138.390 pb, aproximadamente 2.500 pb maior do que o genoma do BHV-1, e contém 75% de G+C, enquanto o BHV-1 possui 72% de G+C (McGEOCH & DAVISON, 1999; DELHON *et al.*, 2003), ambos genomas constituídos de uma molécula linear de DNA dupla fita. O arranjo do genoma do BHV-1 e 5 é típico do grupo D dos herpesvírus, no qual este pode ser dividido em uma região única longa (UL) e uma região única curta (US), flanqueada por regiões invertidas repetidas (MAYFIELD *et al.*, 1983; WYLER *et al.*, 1989). Assim, a região curta pode ter orientação invertida em relação à região longa, resultando na existência de duas formas isoméricas (WIRTH *et al.*, 1992). A região UL do DNA do BHV apresenta janelas de leitura para os genes reguladores para os genes imediatamente precoces ( $\alpha$ ) e precoces ( $\beta$ ). A região US apresenta janelas de leitura para genes estruturais ( $\gamma$ ), principalmente glicoproteínas do envelope (MISRA *et al.*, 1981; MISRA *et al.*, 1983; WHIRTH *et al.*, 1992; DELHON *et al.*, 2003).

### 6.4 As proteínas virais

As proteínas do BHV são classificadas em imediatamente precoces ( $\alpha$ ), precoces ( $\beta$ ) e tardias ( $\gamma$ ) de acordo com o momento de sua síntese na célula infectada (MISRA *et al.*, 1981). A expressão das proteínas do BHV ocorre sequencialmente em cascata e são reguladas por um complexo mecanismo pós-transcricional (WILDY, 1986). Estudos realizados com o BHV-1 mostraram a existência de 15 polipeptídios não estruturais (enzimas ou proteínas precursoras de proteínas estruturais) e 25 a 33 polipeptídios estruturais, sendo que destes, são glicosilados (MISRA *et al.*, 1981). Estas glicoproteínas (g) recebem o nome de letras do alfabeto e são homologas às glicoproteínas de outros herpesvírus. As glicoproteínas do herpesvírus bovino 1 e 5 foram caracterizadas e designadas por homologia com as proteínas do herpes simplex tipo 1 (HSV-1) estão descritas na TABELA 1. As glicoproteínas do envelope viral são extremamente importantes nas relações vírus-hospedeiro, se envolvem no reconhecimento, adsorção e penetração dos herpesvírus em células susceptíveis, além de auxiliarem na passagem do vírus de célula para célula (SPEAR, 1993; METTENLEITER, 1994).

**TABELA 1:** Glicoproteínas do herpesvírus bovino 1 e 5

Glicoproteína	ORF	Função	BHV-1		BHV-5	
			Tamanho	Autor	Tamanho aa	Autor
gB	UL27	Adsorção, fusão, penetração disseminação célula a célula	932	WHITBECK <i>et al.</i> , 1988	947	ROS & BELAK, 2002
gC	UL44	Adsorção viral	508	FITZPATRICK <i>et al.</i> , 1988	486	CHOWDHURY, 1995
gD	US6	Adsorção e replicação viral	417	TIKOO <i>et al.</i> , 1990	417	ABDELMAGID <i>et al.</i> , 1995
gH	UL22	Disseminação célula a célula e sistema nervoso	842	BARANOWSKI <i>et al.</i> , 1995	848	MEYER <i>et al.</i> , 1999
gN	UL49.5	Penetração viral (complexo gM-gN)	96	LIANG <i>et al.</i> , 1993	95	DELHON <i>et al.</i> , 2003
gG	US4	Disseminação célula a célula	444	KEIL <i>et al.</i> , 1996	440	ENGELHARDT & KEIL, 1996
gE	US8	Disseminação célula a célula e no sistema nervoso	575	RIJSEWIJK <i>et al.</i> , 1992	597	CHOWDHURY <i>et al.</i> , 2000
gI	US7	Disseminação célula a célula e no sistema nervoso	382	RIJSEWIJK <i>et al.</i> , 1995	387	DELHON <i>et al.</i> , 2003
gL	UL1	Penetração viral	158	KHATTAR <i>et al.</i> , 1996	162	DELHON <i>et al.</i> , 2003
gK	UL53	Fusão viral	332	KHADR <i>et al.</i> , 1996	331	DELHON <i>et al.</i> , 2003
gM	UL10	Penetração viral (complexo gM-gN)	438	WU <i>et al.</i> , 1998	419	DELHON <i>et al.</i> , 2003

aa: aminoácidos

As glicoproteínas B, C, D e E são as mais abundantes encontradas no envelope viral e na membrana plasmática das células infectadas pelo BHV-1 e BHV-5 (van DRUNEN LITTEL-van den HURK *et al.*, 1986). A gC é considerada como a proteína mais importante envolvida na adsorção do vírus à célula (OKAZAKI *et al.*, 1987; LIANG *et al.*, 1991) e a sua participação nas interações vírus-hospedeiro é devida à sua habilidade de fixar complemento (HUEMER *et al.*, 1993) e de ser um eficiente imunógeno na estimulação da resposta imune celular e humoral (LIANG *et al.*, 1992). A gD é essencial para a replicação viral (FEHLER *et al.*, 1992) e parece estar envolvida no processo de adsorção (LIANG *et al.*, 1991), penetração (FEHLER *et al.*, 1992; CHASE & LETCHWORTH, 1994) e na fusão celular (TIKOO *et al.*, 1995). A glicoproteína E, está envolvida tanto com a disseminação do vírus célula a célula, quanto com a disseminação neural (LEHMANN *et al.*, 2004).

### **6.5 A glicoproteína B**

O gene que codifica para a gB está situado na região única longa do genoma dos herpesvírus, na vigésima sétima janela de leitura (ORF 27), sendo designado como UL27. Seu tamanho no BHV-1 está em torno de 932 aminoácidos (MISRA *et al.*, 1988; WHITBECK *et al.*, 1988) e no BHV-5 em torno de 947 (ROS & BELAK, 2002). A gB é a glicoproteína de maior massa molecular encontrada no envelope viral (van DRUNEN LITTEL-van den HURK *et al.*, 1986) e a mais conservada entre os herpesvírus (PEREIRA, 1994). Inicialmente a gB é sintetizada em uma forma glicosilada de 130 kDa que sofre algumas modificações, incluindo a clivagem, da cadeia de polipeptídios originado duas subunidades uma de 55 kDa e outra de 74 kDa (PEREIRA, 1994).

A gB é essencial para penetração e acredita-se que inicie a infecção por fusão do envelope viral com a membrana celular. Além disto, é importante para a disseminação direta do vírus célula a célula, sendo também necessária para a neuroinvasão e disseminação transneuronal *in vivo* (SPEAR, 1993). A gB do BHV-1 assim como a maioria da glicoproteínas que se ligam à membrana é normalmente clivada, contudo BLEWETT & MISRA (1991) demonstraram que a clivagem da gB não é essencial para se iniciar a infecção. A gB também tem sido implicada

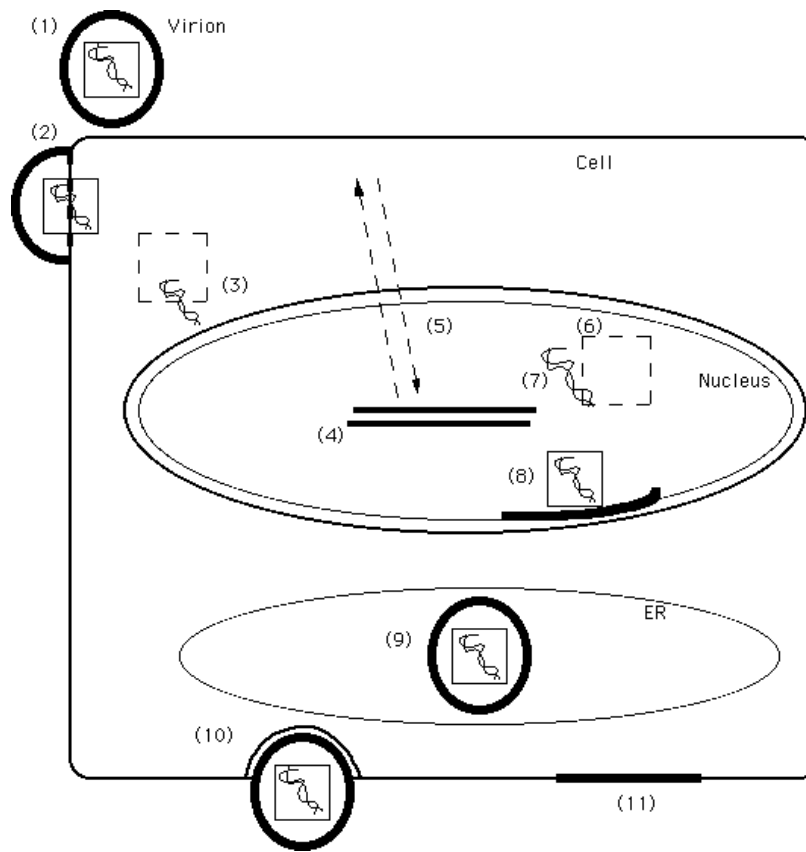
na patogênese viral, uma vez que a ausência desta resulta na perda de infectividade, como observado em cultura de células (NEUBAWER *et al.*, 1997).

Além disto a gB representa um antígeno viral dominante que induz proteção imune no hospedeiro natural (BABIUK *et al.*, 1987; COLLINS *et al.*, 1993). Os anticorpos anti-gB são extensivamente usados no diagnóstico de ensaio sorológico, principalmente devido aos seus altos títulos, aparecendo precocemente e persistindo após a infecção (KRAMPS *et al.*, 1994). Entretanto um problema geral é a reação cruzada com outros herpesvírus relacionados como os herpesvírus de cervídeos, caprinos e ruminantes. O gene que codifica para a gB tem também sido usada no estudo da proximidade genética entre os herpesvírus através da comparação das seqüências do gene que codifica para a gB de diversos herpesvírus (McGEOCH & COOK, 1994; ROS & BELÁK, 1999; 2002).

## **6.6 O ciclo reprodutivo**

Na FIGURA 2, observa-se o desenho esquematizado do ciclo replicativo do BHV-1 adaptado por TIKKO *et al.* (1995). A replicação viral inicia-se com a adsorção do vírus com a superfície celular e provavelmente esta adsorção é feita em proteoglicanas, como o sulfato de heparan, presentes na superfície da célula (LIANG *et al.*, 1991, LIANG *et al.*, 1993). O BHV-1 e o BHV-5 apresentam um caminho semelhante para entrar na célula (WILD *et al.*, 1998). O processo de fusão do envelope viral com a membrana plasmática da célula hospedeira libera o nucleocapsídeo e o tegumento do vírus dentro do citoplasma celular. O nucleocapsídeo é transportado pelo citoesqueleto celular para os poros nucleares, onde ocorre a liberação do DNA viral. O processo de transporte do nucleocapsídeo para o núcleo celular ainda não foi elucidado (WILD *et al.*, 1998). No núcleo, a transcrição dos genes virais começa com um sistema de regulação em “feedback” (BEN-PORAT & TOKAZEWSKI, 1977). Proteínas do tegumento, por exemplo, a  $\alpha$ -TIF, junto com proteínas celulares regulatórias, iniciam a transcrição e tradução de genes virais que codificam proteínas imediatamente precoces. Essas proteínas imediatamente precoces induzem a transcrição e a tradução de proteínas precoces (MISRA *et al.*, 1981) como a Timidina quinase e a DNA polimerase. As proteínas precoces estão envolvidas na replicação do genoma e na indução da síntese das proteínas tardias que formam as proteínas estruturais do vírion (HAMMERSCHMIDT *et al.*, 1988).

A replicação do genoma e a montagem do nucleocapsídeo ocorrem no núcleo da célula infectada (HAMMERSCHMIDT *et al.*, 1988). O nucleocapsídeo adquire o envelope por brotamento através da membrana nuclear, e a partícula viral madura é liberada por ruptura da célula infectada ou por fusão desta com células não infectadas (TIKKO *et al.*, 1995; SHANG & JONES, 1997).



**FIRURA 2: Diagrama representando o ciclo de replicação de um herpesvírus típico.** (1) Adsorção do vírion à célula hospedeira. (2) Fusão do envelope viral à membrana plasmática e penetração do vírion na célula. (3) Liberação do nucleocapsídeo no citoplasma e a chegada do nucleocapsídeo ao poro nuclear onde o DNA viral é liberado. (4) O DNA viral é transcrito em 3 classes de mRNA peal RNA polimerase II celular. (5) Após a transcrição, todos os transcritos são traduzidos em proteínas no citoplasma. Em seguida, as proteínas podem ir para o núcleo, permanecer no citoplasma, ou se dirigir à membrana celular. (6) Proteínas estruturais se unem no núcleo celular para a montagem do capsídeo. (7) O DNA viral é empacotado para formar o nucleocapsídeo. (8) Envelopamento através do brotamento na membrana nuclear. (9) Vírions envelopados se acumulam no retículo endoplasmático (ER). (10) Vírions maduros são liberados por exocitose. (11) Proteínas virais são também encontradas na membrana plasmática de células infectadas.

FONTE: <http://www.stanford.edu/group/virus/1999/inesicle/replication.html>

## 6.7 As doenças e sinais clínicos

O BHV-1 está relacionado com as formas respiratória, genital e também nervosa enquanto o BHV-5 está relacionado com a forma nervosa.

A forma respiratória apresenta-se como infecção subclínica, branda ou grave. Os sinais iniciais incluem febre, redução do apetite, perda de peso, respiração rápida, dispnéia associada à presença de material muco purulento nas fossas nasais e traquéia e narinas dilatadas. Os animais, freqüentemente, têm profusa descarga nasal, que é serosa nos primeiros estágios, passando a muco purulenta. Animais com casos agudos, sem complicações recuperam-se em 5-10 dias. Ocasionalmente, um animal gravemente afetado pode sufocar-se com o material muco purulento em sua traquéia e vir a morrer (SAMPAIO *et al.*, 1981; KAHRS, 2001).

A forma genital é detectada mais comumente em gado de leite, quando as vacas infectadas desenvolvem febre, anorexia e dificuldade de urinar. Em seguida, aparece descarga vaginal mucopurulenta discreta, edema vulvar, cauda levantada e pústulas na vulva e vagina. Em touros com balanopostite observa-se febre alta, inchaço do prepúcio, descarga mucopurulenta, lesões necróticas focais na mucosa do pênis e prepúcio. Casos de aborto estão associados com a forma genital (SAMPAIO *et al.*, 1981; KAHRS, 2001).

A forma nervosa é caracterizada por encefalite não purulenta e leptomeningite. Os animais apresentam incordenação motora, eventuais movimentos em círculos, lambedura de flancos, prostração e morte. (BULACH & STUDDERT, 1990; ROEHE, 1997). Os casos de meningoencefalite relacionados com herpesvírus bovino (BHV) são causados por amostras de BHV-5. A encefalite por BHV-1 também foi descrita, mas nestes casos, sintomas respiratórios ou outros sintomas sistêmicos estão presentes (BELKNAP *et al.*, 1994; HORIUCHI *et al.*, 1995). No entanto, ROELS *et al.* (2000) e SPILKI *et al.* (2002) descreveram que o BHV-1 causou encefalite em gado bovino adulto sem qualquer outro sinal clínico.

O aparecimento simultâneo de manifestações respiratórias e genitais no mesmo animal já foi descrito (MUELLER *et al.*, 1979; SAMPAIO *et al.*, 1981) e apesar desta simultaneidade ser rara, ela pode ocorrer principalmente quando o contato focinho vulva é comum. Entretanto a

maioria dos casos genitais não são suficientemente graves para causar desconforto ou para chamar a atenção, e quando estas lesões são encontradas, elas mostram evidência de que a IPV é a doença em questão (SAMPAIO *et al.*, 1981). OLIVEIRA (2001) classificou uma amostra que foi isolada de um swab nasal de bezerro que apresentava sinais respiratórios (BHV-1.1) como amostra genital (BHV-1.2) e este fato pode ser explicado pela simultaneidade de aparecimento das manifestações respiratórias e genitais.

## **6.8 Transmissão e Epidemiologia**

O herpesvírus bovino (BHV) é facilmente transmitido já que grande quantidade de vírus é eliminada pelas secreções respiratórias, oculares e genitais dos animais infectados. O vírus é perpetuado na população bovina pelo contato direto entre os animais infectados e provavelmente, pela infecção latente, que é ocasionalmente reativada, acompanhada pela eliminação de vírus (SAMPAIO *et al.*, 1981).

Os principais fatores que vem contribuindo para a difusão das enfermidades causadas pelo BHV-1 e 5 são: introdução de animais oriundos de leilões ou de importações nos rebanhos, sem exigências sanitárias necessárias para prevenir a infecção; a crescente utilização de confinamentos para engorda de animais; a não obrigatoriedade do controle virológico do sêmen comercializado no país e principalmente, a falta de informação dos criadores, das autoridades e veterinários sobre estas viroses (MOREIRA *et al.*, 2001).

Inquéritos sorológicos realizados em alguns estados indicam que o BHV-1 está amplamente disseminado no Brasil (VIDOR *et al.*, 1995; MÉDICI *et al.*, 2000a, ROCHA *et al.*, 2001; VIEIRA *et al.*, 2003). Segundo estudos realizados por ANUNCIAÇÃO *et al.* (1989) a prevalência do BHV-1 no Brasil é de 66,2%, 85,7% e 81,5% para os estados de Minas Gerais, Mato Grosso e Rio de Janeiro, respectivamente. Estudos posteriores revelaram que cerca de 30% da população bovina do Rio Grande do Sul e de São Paulo está contaminada com BHV-1 (RAVAZZOLO *et al.*, 1989; PITUCO *et al.*, 1993; LOVATO *et al.*, 1995; VIDOR *et al.*, 1995).

A soropositividade para o BHV-1 em um rebanho indica a presença de portadores do vírus que podem potencialmente atuar como fonte de infecção para animais susceptíveis, assegurando a permanência da infecção no plantel, além de causarem prejuízos econômicos por causa da queda na produtividade (TIKKO *et al.*, 1995).

Dados sobre a distribuição geográfica do BHV-5 são raros (PETZHOLD *et al.*, 2001) e este vírus tem sido encontrado no hemisfério sul, afetando o gado jovem com baixa taxa de morbidade ao passo que a taxa de mortalidade chega a 100% (d'OFFAY *et al.*, 1995; SALVADOR *et al.*, 1998). A reação sorológica cruzada entre os diferentes BHV dificulta os levantamentos geográficos da ocorrência do BHV-5 (d'OFFAY *et al.*, 1995). O pequeno número de infecções por BHV-5 é provavelmente devido à indisponibilidade de métodos de diagnóstico capazes de diferenciar as infecções causadas por BHV-1 e BHV-5 com rapidez necessária para a execução de estudos epidemiológicos (ROEHE, 1997).

## **6.9 Diagnóstico**

As metodologias para a detecção de rotina do BHV-1 são bem estabelecidas, entretanto sua eficiência é comprometida por reações cruzadas com outros alfa herpesvírus relacionados de ruminantes (ROS & BELAK, 1999; KEUSER *et al.* 2004).

O diagnóstico exato das infecções dos BHVs é essencial para a prevenção e o controle da disseminação do vírus nos bovinos. Além disto, a viabilidade dos métodos de diagnóstico é a chave para o estabelecimento de programas efetivos de vacinação e erradicação (TURIN & RUSSO, 2003). A observação de pústulas brancas que se fundem para formar lesões necróticas aderentes à mucosa respiratória, reprodutiva e ocular, são importantes para o diagnóstico clínico do BHV-1 (SAMPAIO *et al.*, 1981).

O diagnóstico laboratorial na fase aguda da infecção é feito geralmente pelo isolamento em cultivo celular do vírus, seguido pela imunofluorescência direta. Passado o período agudo, o diagnóstico é feito pela detecção de anticorpos específicos contra BHV, pela soroneutralização (SN) em cultivos celulares, pela hemaglutinação passiva ou por provas imunoenzimáticas, entre elas o ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) (OIE, 2002).

Devido a sua grande especificidade e sensibilidade, a técnica de SN tem sido utilizada como referência no diagnóstico sorológico do BHV-1. Entretanto, a SN possui uma série de desvantagens relacionadas ao uso do cultivo celular, como por exemplo, a infra-estrutura e a necessidade de pessoal especializado, o tempo gasto para a sua realização e a existência de amostra sorotóxicas que impossibilitam a interpretação dos resultados (WITTMANN 1989). O teste de ELISA indireto tem sido aplicado na detecção de anticorpos contra o BHV-1 em bovinos, pois, além de apresentar uma elevada concordância com a SN, é uma prova rápida, de fácil execução e que pode ser automatizada simplificando os inquéritos epidemiológicos (MÉDICI *et al.*, 2000b).

Diferentes trabalhos têm sido publicados descrevendo a reação em cadeia pela polimerase (PCR) para detecção de BHV. No entanto, o uso da PCR para fins de diagnóstico para o BHV-1 e BHV-5, embora satisfatório, tem se restringido principalmente aos laboratórios de pesquisa (van ENGELENBURG *et al.*, 1993; VILCEK, 1993; KIBENGE *et al.*, 1994; MASRI *et al.*, 1996). Comparada com métodos tradicionais para detecção do BHV a PCR é mais sensível, rápida, menos trabalhosa, mais econômica e pode ainda detectar tanto os vírus vivos quanto os inativados (YASON *et al.*, 1995). Diferentes experimentos com PCR tem sido desenvolvidos para detectar o BHV-1 em diferentes espécimes clínicos, como por exemplo em sêmen e sangue (FUCHS *et al.*, 1999; ZHOU *et al.*, 1999). Um dos problemas do uso da PCR é o fato do BHV-1 e BHV-5 normalmente amplificarem fragmentos de mesmo tamanho devido a sua similaridade genética, e a diferenciação tem que ser complementada pela digestão com enzimas de restrição dos fragmentos (ROS *et al.*, 1999). As PCRs NESTED e multiplex tem sido otimizadas permitindo a diferenciação de BHV-1 e BHV-5 (ASHBAUGH *et al.*, 1997; ALEGRE *et al.* 2001).

## **6.10 Prevenção e Controle**

Algumas medidas podem ser tomadas para controlar a doença causada pelo BHV: a identificação dos animais soropositivos não vacinados, a quarentena de animais recém adquiridos e a vacinação de animais susceptíveis (EDWARDS, 1988; THIRY *et al.*, 1992). A avaliação sorológica é particularmente importante para identificação de animais no rebanho que possam estar eliminando o vírus no ambiente e é o primeiro passo no programa de

controle e erradicação nos quais bovinos infectados devem ser descartados e removidos da população (VIEIRA *et al.*, 1998).

Devido a perdas significantes que o BHV-1 causa na pecuária os EUA e muitos países da Europa têm um controle estrito na comercialização de sêmen e embriões, estabelecendo campanhas de controle e erradicação (ALEGRE *et al.*, 2001). Apesar de raramente fatal, o BHV-1 pode ser responsável por perdas econômicas significantes devido a doenças respiratórias e reprodutivas (PETZHOLD *et al.*, 2001), e por esta razão muitos países têm considerado a possibilidade de erradicação da infecção. Alguns países da União Européia, como a Dinamarca, Suécia e Áustria têm tido sucesso na erradicação do BHV-1 pela eliminação de animais soropositivos. Nos países com alta prevalência de animais soropositivos a única possibilidade de alcançar esta meta é tentar reduzir a disseminação da infecção por vacinação (CASTRUCCI *et al.*, 2002).

A utilização de vacinas contra o BHV-1 tem como principal finalidade reduzir os sinais da doença após infecção e desse modo diminuir o impacto econômico das infecções causadas por este vírus (van OIRSCHOT *et al.*, 1996; 1997). De um modo geral, as vacinas de vírus inativados não são capazes de induzir a produção de um bom nível de anticorpos. Embora muitas vacinas compostas de vírus vivos modificados contra BHV-1 estejam comercialmente disponíveis, estas amostras vacinais podem estabelecer latência e serem posteriormente reativados, e além disto podem causar o aborto se forem aplicadas por via intramuscular durante a gestação. A reativação da latência não necessariamente resulta na recorrência da doença, mas é uma das principais formas de transmissão do BHV-1 no campo (PEREZ *et al.*, 2005). Alguns destes problemas têm sido evitados com o desenvolvimento de vacinas atenuadas geneticamente modificadas e com subunidades vacinais (ENDSLEY *et al.*, 2002). Apesar destas vacinas produzirem altos níveis de proteção elas são caras e de difícil fabricação. Várias pesquisas têm sido realizadas com as vacinas de DNA, já que estas vacinas são mais fáceis de se projetar, fabricar estocar e transportar (CASELLI *et al.* 2005; ZHENG *et al.*, 2005). Além disto, as vacinas de DNA também são mais seguras que as de vírus vivos, especialmente para agentes infecciosos que causam latência. As vacinas de DNA geralmente induzem resposta imune equilibrada e a resposta imune induzida por estas vacinas é

normalmente mais longa que aquela produzida por subunidades vacinais (MANOJ *et al.*, 2003).

A produção e o uso de vacinas mais eficientes dependem de um maior conhecimento da imunologia, patogenia, epidemiologia, bem como da biologia molecular do BHV (ROEHE, 1997; CASELLI *et al.*, 2005). A vacinação preventiva do gado contra o BHV-1 resulta na proteção contra a neuropatologia e os sinais clínicos do BHV-5. A vacinação com BHV-1, entretanto, não previne o estabelecimento da infecção latente pelo BHV-5 (CASCIO *et al.*, 1999; PETZHOLD *et al.*, 2001).

## **7. OBJETIVOS**

## **7. OBJETIVOS**

### **7.1 Objetivo geral**

Estudar as propriedades biológicas e a variabilidade genética de amostras brasileiras de herpesvírus bovino 1 e 5.

### **7.2 Objetivos específicos**

Caracterizar biologicamente amostras de herpesvírus bovino 1 e 5 através do cultivo celular.

Otimizar uma extração do DNA viral de herpesvírus bovino obtido a partir de amostras provenientes de cultivo celular e de amostras clínicas para uso na reação em cadeia pela polimerase.

Amplificar por PCR, clonar e sequenciar fragmentos do gene que codifica para a glicoproteína B de amostras brasileiras de BHV-1 e BHV-5.

Padronizar um teste de diagnóstico e diferenciação de amostras de BHV-1 e BHV-5 pela PCR/RFLP.

Analisar a variabilidade das seqüências nucleotídicas obtidas do gene que codifica para a glicoproteína B e das seqüências de aminoácidos inferidos.

Construir árvores filogenéticas e analisar das amostras de BHV-1 e BHV-5 com seqüências depositadas no GenBank, baseadas nas seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos do gene que codifica para a gB.

## **8. MATERIAL E MÉTODOS**

## **8. MATERIAL E MÉTODOS**

### **8.1 Amostras Virais**

Os isolados utilizados para a realização dos experimentos estão listadas na TABELA 1. As amostras numeradas de 1 a 11 foram isoladas, pelo Dr. Maurício Resende no Laboratório de Virologia Comparada (LVC) – UFMG, e a amostra 12 foi isolada pelo Dr. Rômulo Cerqueira Leite, da Escola de Veterinária - UFMG. As amostras 13 e 14 foram isoladas no Instituto Desidério Finamor, Eldorado do Sul e gentilmente fornecida pelo Dr. Paulo Michel Roehle. Foi utilizada ainda a amostra Cooper, que é padrão de BHV-1 obtida da ATCC (VR864).

Estes isolados foram previamente clonados em placa e titulados no Laboratório de Virologia Comparada segundo o protocolo de DULBECCO & VOGT (1954) e REED & MUNCH (1938) respectivamente. Os títulos obtidos expressos como log TCID<sub>50</sub>/mL bem como a classificação prévia das amostras através da análise do perfil de restrição do genoma obtido se encontram na TABELA 1.

Foram ainda analisadas amostras recolhidas de 11 fetos abortados com suspeita de BHV-1 (nomeados de A1 a A11). Estas amostras foram coletadas em fazendas no estado de Minas Gerais, pelo Dr. Nivaldo da Silva da Escola de Veterinária da UFMG. De cada animal foram recolhidos os seguintes órgãos: rim, língua, fígado, pulmão e coração. Foi feito então um “pool” com aproximadamente 2 gramas de cada órgão, que foram homogeneizados em 20 mL de TNE (0.1 M Tris pH 8.0; 0.15 M NaCl; 0.005 M EDTA) e a mistura foi então clarificada por centrifugação a 2.000 x g por 10 minutos. O sobrenadante obtido foi empregado para a obtenção do DNA viral.

**TABELA 2:** Identificação, procedência, espécime, local e data da coleta de isolados de herpesvírus bovino utilizadas neste trabalho.

<b>Amostra</b>	<b>Identificação</b>	<b>Procedência</b>	<b>Espécime</b>	<b>Local</b>	<b>Ano de Isolamento</b>	<b>Classificação</b>	<b>Títulos Virais* (TCID<sub>50</sub>/mL)</b>
1	IBR 2113	Novilha	Swab vaginal	Belo Horizonte-MG	1974	BHV-1.2a	10 <sup>6,2</sup>
2	IBR 6813	Bezerro	Swuab nasal	Belo Horizonte-MG	1974	BHV-1.1	10 <sup>6,5</sup>
3	LD 15	Bezerro	Sêmen	Lagoa Dourada-MG	1975	BHV-1.1	10 <sup>7,7</sup>
4	LD 19	Novilha	Swab vaginal	Lagoa Dourada-MG	1975	BHV-1.2a	10 <sup>7,2</sup>
5	LD 30/2	Bezerro	Swab Nasal	Lagoa Dourada-MG	1981	BHV-1.1	10 <sup>6,2</sup>
6	LD 40/1	Novilha	Swab vaginal	Lagoa Dourada - MG	1981	BHV-1.2a	10 <sup>6,7</sup>
7	LD 50/2	Bezerro	Swab Nasal	Lagoa Dourada - MG	1981	BHV-1.1	10 <sup>5,8</sup>
8	BH 53	Feto abortado	Estomago e baço	Belo Horizonte-MG	1982	BHV-1.1	10 <sup>7,2</sup>
9	BH 54	Feto abortado	Estomago e baço	Belo Horizonte	1982	BHV-1.1	10 <sup>6,5</sup>
10	BH 80	Bezerro	Swab nasal	Belo Horizonte-MG	1982	BHV-1.1	10 <sup>5,8</sup>
11	BH 81	Bezerro	Swab nasal	Belo Horizonte-MG	1982	BHV-1.1	10 <sup>6,5</sup>
12	1218	Feto abortado	Estomago e baço	Belo Horizonte-MG	1992	BHV-5	10 <sup>6,5</sup>
13	EVI-190	Bezerro	Cérebro	Eldorado do Sul-RS	1993	BHV-5	10 <sup>6,6</sup>
14	EVI-88	Bezerro	Cérebro	Mato Grosso do Sul	1995	BHV-5	10 <sup>6,8</sup>

\* Os títulos virais foram previamente calculados no Laboratório de Virologia Comparada - UFMG

## 8.2 Cultivo Celular e Multiplicação Viral

Para a multiplicação viral foram utilizadas células MDBK (Madin Darby bovine kidney – ATCC número CCL-22), de uma linhagem contínua de rim bovino, subcultivadas em várias passagens no LVC e estocadas em nitrogênio líquido. Para o uso, as células foram descongeladas em banho-maria a 37°C e multiplicadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Media – LIFE TECHNOLOGIES, Inc.) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino.

Os vírus foram multiplicados em células MDBK e para a produção de cada isolado, foi cultivada uma garrafa de 75 cm<sup>2</sup> de células. Os vírus produzidos, bem como seus respectivos títulos se encontram na TABELA 1. Monocamadas completas de células MDBK foram inoculadas com 100 TCID<sub>50</sub> do vírus em 3 ml de meio DMEM (sem soro fetal bovino) e incubadas por uma hora a 37°C, em estufa úmida, com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> para adsorção do vírus à superfície celular. Em seguida, foram acrescentados mais 5 ml de DMEM e as garrafas foram incubadas novamente a 37°C, estufa de 5% de CO<sub>2</sub> (SCHMIDT, 1979). As células foram examinadas diariamente no microscópio óptico invertido com contraste de fase e após 24 e 48 horas os efeitos citopáticos (ECP) foram fotografados em microscópio invertido utilizando-se a câmera Olympus Opstronics Dei 470, image pro-plus v.4.0 (Media Cybernetics, L.P).

Após a observação de 90% de efeito citopático, o sobrenadante de cultura, contendo o vírus, foi coletado e clarificado por centrifugação a 2000 rpm por 20 minutos em centrífuga Sorvall RT7 (LIANG *et al.*, 1991).

## 8.3 Extração do DNA Genômico dos Isolados

Foram otimizadas três metodologias para a extração do DNA genômico com a finalidade de se obter DNA de boa qualidade para PCR, de forma mais rápida, menos trabalhosa e mais barata. Para a otimização das metodologias usadas e para escolha da melhor extração foram utilizadas as amostras virais BH 54 (BHV-1) e EVI-88 (BHV-5). Os protocolos testados

foram: extração envolvendo fenol:clorofórmio, extração utilizando-se Chelex-100 e extração utilizando-se NaOH.

#### *Extração com fenol:clorofórmio*

O vírus foi sedimentado do meio clarificado por ultracentrifugação a 20000 rpm (Hitachi CP 70 G), por 1 hora e 30 minutos a 4°C. O DNA foi extraído utilizando-se o fenol:clorofórmio conforme descrito por SAMBROOK *et al.* (1989) com modificações. O sedimento foi então suspenso em TNE (Anexo), contendo 1% de SDS e 100 µg/mL de proteinase K, e incubado 16 horas a temperatura ambiente. O lisado foi extraído com fenol, depois com clorofórmio e o DNA foi então precipitado com etanol. Após a precipitação a mistura foi centrifugada por 20 minutos a 14000 rpm em microcentrífuga Eppendorf e o sedimento obtido foi suspenso em TE (Anexo), e estocado a -20°C até o momento do uso.

#### *Extração com Chelex-100*

A extração do DNA genômico com a resina Chelex-100 foi feita como previamente descrito por WALSH *et al.* (1991) com algumas modificações. Ao meio clarificado foi adicionado o mesmo volume de uma solução de Chelex-100 (Bio Rad) 10%. Em seguida a mistura foi incubada por 10 minutos a 100°C, por 1 minuto em banho de gelo e posteriormente centrifugada a 10000 x g durante 30 segundos. O sobrenadante foi removido para um tubo novo e o sedimento descartado. O DNA foi então estocado a -20°C até o momento do uso.

#### *Extração com NaOH*

O sobrenadante do material clarificado foi aliqotado em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL de volume. Os vírus foram então obtidos através de centrifugação, a 14.000 rpm, durante uma hora, a 4°C em microcentrífuga refrigerada Cientec 14000DR. O DNA foi obtido utilizando-se o protocolo descrito por RICHARDS *et al.* (1993) com modificações. O sedimento viral foi suspenso com 40 µL de NaOH 50 mM preparado no momento do uso e em seguida a solução foi agitada em vortex por 5 minutos. A mistura foi então aquecida a 95°C por 5 minutos, e

neutralizada com a adição de 10 µL de Tris-HCl 0,5 M (pH 8,0). Os tubos foram novamente agitados em vortex por 5 minutos e o DNA foi estocado em freezer a -20°C.

#### **8.4 Extração do DNA Genômico das Amostras Clínicas**

O sobrenadante obtido da clarificação das amostras clínicas foi centrifugado a 14.000 x g por 1 hora a 4°C. A extração do DNA genômico foi feita utilizando-se o protocolo descrito por RICHARDS et al. (1993) com modificações, como já descrito para a extração do DNA dos isolados onde o NaOH foi usado para obtenção do DNA.

#### **8.5 Quantificação do DNA**

As amostras de DNA obtidas em todas as preparações foram dosadas em espectrofotômetro no comprimento de onda 260 nm, utilizando-se o aparelho *GeneQuant* (PHARMACIA).

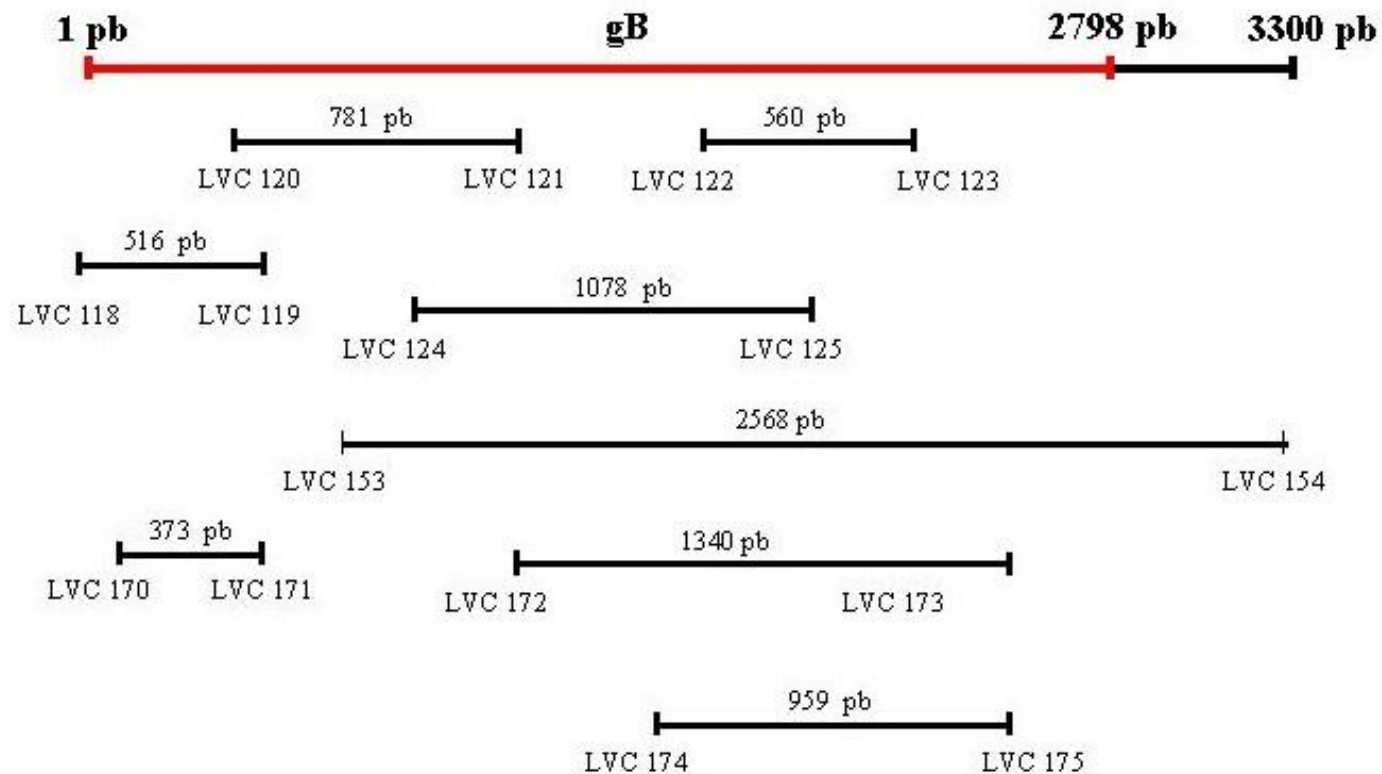
#### **8.6 Amplificação do Gene que Codifica para a Glicoproteína B**

Tanto os DNAs dos isolados (BHV-1 e BHV-5) quanto os das amostras clínicas foram empregados como molde na amplificação pela PCR. Foram determinados oligonucleotídeos iniciadores (OI) construídos a partir da análise da sequência do gene que codifica para a glicoproteína B do BHV-1, depositada no GenBank (amostra padrão Cooper, número de acesso: NC\_001847 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), com o auxílio dos programas OLIGO 4.0 (RYCHLIK & RYCHLIK, 1989) e BLAST 2.0 (ALTSCHUL *et al.*, 1997). Os OI sintetizados (Invitrogen) estão descritos na TABELA 2. Na FIGURA 3 podemos observar o posicionamento dos OI de acordo com a sequência da do gene que codifica para gB da amostra Cooper (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> - número de acesso: NC\_001847).

**TABELA 3:** Oligonucleotídeos desenhados para a amplificação por PCR do gene que codifica para a glicoproteína B do BHV-1 e 5.

<b>OI</b>	<b>Seqüência (5'-3')</b>	<b>Posição*</b>	<b>TM</b>	<b>Sentido</b>
LVC 118	ggcagtcgtgtcccagcg	55351-55369	74°	Senso
LVC119	atgccctccgtgtagtt	55850-55867	56°	Anti-senso
LVC 120	gaactacacggaggcat	55849-55867	56°	Senso
LVC 121	aggtgtggctgtcgctca	56630-56613	58°	Anti-senso
LVC 122	agcgctacaacggcacgc	56706-56724	60°	Senso
LVC 123	ctgtagcaaacgccgccg	57265-57283	60°	Anti-senso
LVC 124	gcatggccgtgacgtac	57194-57212	60°	Senso
LVC 125	ccaagaaaaacaacagc	58271-58289	50°	Anti-senso
LVC 153	cgacgacgccccagccc	55684-55702	66°	Senso
LVC 154	aaacaaacagccgcaaat	58264-58282	50°	Anti-senso
LVC 170	acgtgttctcgtgctct	55474-55492	56°	Senso
LVC 171	gccctccgtgtagttccg	55847-55865	60°	Anti-senso
LVC 172	acgaaatgctgcgagacg	56544-56562	56°	Senso
LVC 173	gttgctgcggaggcggga	57884-57902	62°	Anti-senso
LVC 174	tgcagttcacctacgacc	57012-57030	56°	Senso
LVC 175	ctcctcctcttctcgcc	57971-57989	60°	Anti-senso

\* Posição em relação a amostra Cooper (número de acesso: NC\_001847)



**FIGURA 3: Desenho esquemático do posicionamento dos OI na seqüência do gene que codifica para gB da amostra Cooper (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> - número de acesso: NC\_001847).**

A amostra padrão Cooper foi utilizada como padrão para testar a amplificação por PCR com os OI, uma vez que estes foram determinados com base na seqüência da amostra Cooper.

Os DNAs extraídos dos isolados e das amostras clínicas foram utilizados na PCR em uma mistura de reação de 25  $\mu$ L, contendo 100 ng do DNA viral, 2,5  $\mu$ L de tampão de PCR 10 X (Anexo), 200  $\mu$ M de dNTPs, 10 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador, 1,5 mM de  $MgCl_2$ , 1 unidade de Taq DNA polimerase (INVITROGEN) e água ultra pura estéril. Juntamente a todos os conjuntos de reação foram feitas reações sem presença de qualquer DNA, como controle negativo. As reações de PCR foram realizadas no termociclador Mastercycler<sup>®</sup>(Eppendorf AG, Hamburg).

Foram testadas algumas combinações de OI na tentativa da amplificação de todo o gene que codifica para a gB. O tamanho esperado dos fragmentos e as condições dos ciclos de PCR estão descritos na TABELA 3.

Em seguida, 10  $\mu$ L do produto da reação foram misturados a 2  $\mu$ L de tampão de amostra (Anexo) e aplicados em gel de agarose (livre de DNase, INVITROGEN) 1,5% em TBE 0,5 X (Anexo) e analisados após separação eletroforética, à temperatura ambiente, sob voltagem constante (100 V). Após o fracionamento, os géis foram corados com brometo de etídeo (1,0  $\mu$ g/mL) durante 15 minutos, e os fragmentos amplificados visualizados em trasluminador ultravioleta (254 nm, Pharmacia LKB Macro Vue<sup>™</sup>, EUA) e fotografados em câmera especial (Gel Cam Polaroid) equipada com o filme Polaroid 667 e filtro laranja nº 15. Para determinação do tamanho do produto da PCR, foi utilizado um marcador de tamanho molecular Ladder 100 pb (INVITROGEN) (SAMBROOK *et al.*, 1989).

**TABELA 4:** Condições dos ciclos da PCR utilizadas nos experimentos, tamanho dos fragmentos, Tm dos pares de OI.

Par OI	Tamanho fragmento esperado (nb)	n° ciclos	Condições de ciclos PCR					
			Desnaturação		Pareamento		Extensão	
			Temp. (°C)	Tempo (s)	Temp. (°C)	Tempo (s)	Temp. (°C)	Tempo (s)
118 e 119	516	30	94	30 – 60	47 - 57	30 – 60	72	60
120 e 121	781	30	94	30 – 60	47 – 57	30 – 60	72	60
122 e 123	577	30	94	30 – 60	49 – 59	30 – 60	72	60
124 e 125	1095	30	94	30 – 60	42 – 52	30 – 60	72	60
153 e 154	2598	30	94	30 – 60	42 – 52	30 – 60	72	60
170 e 171	391	30	94	30 – 60	47 – 57	30 – 60	72	60
172 e 173	1358	30	94	30 – 60	47 – 57	30 – 60	72	60
174 e 175	977	30	94	30 – 60	47 – 57	30 – 60	72	60
118 e 121	1280	30	94	30 – 60	50 – 60	30 – 60	72	60
118 e 171	514	30	94	30 – 60	50 – 60	30 – 60	72	60
124 e 154	1088	30	94	30 – 60	42 – 55	30 – 60	72	60
153 e 123	1599	30	94	30 – 60	50 – 60	30 – 60	72	60
172 e 123	739	30	94	30 – 60	47 – 57	30 – 60	72	60

## 8.7 Fragmentação do Produto da PCR com Enzima de Restrição

Todos os produtos de PCR obtidos sofreram digestão com enzima de restrição na tentativa de diferenciar as amostras de BHV-1 e BHV-5. A seleção da enzima foi baseada na seqüência de nucleotídeos do gene que codifica para a gB das amostras padrão de BHV-1 (Cooper) e BHV-5 (N569) depositada no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> - número de acesso: NC\_001847 e AF078726 respectivamente) utilizando-se o programa Webcutter 2.0 (<http://www.firstmarket.com/cutter/cut2.html>). Para a digestão foi utilizado 500 ng do produto amplificado e foi realizada de acordo com as instruções do fabricante (INVITROGEN) para um volume final de 20 µL. Após a digestão foram misturados a 2 µL de tampão de amostra (Anexo), aplicados em gel de agarose (livre de DNase, INVITROGEN) 1,5% em TBE 0,5 X (Anexo) e analisados por separação eletroforética à temperatura ambiente, sob voltagem constante (100 V). Após o fracionamento, os géis foram corados com brometo de etídeo (1,0 µg/mL) durante 15 minutos, e os fragmentos visualizados em trasluminador ultravioleta (254 nm, Pharmacia LKB Macro Vue™, EUA) e fotografados em câmera especial (Gel Cam Polaroid) equipada com o filme Polaroid 667 e filtro laranja nº 15. Para determinação do tamanho dos fragmentos obtidos na digestão, foi incluído em cada eletroforese um marcador de tamanho molecular Ladder 100 pb (INVITROGEN) (SAMBROOK *et al.*, 1989).

## 8.8 Purificação do Produto da PCR

Depois da amplificação, os produtos de PCR foram purificados para serem utilizados na clonagem e para o sequenciamento direto dos produtos. A purificação foi feita através da precipitação com polietileno glicol PEG, de acordo com o protocolo descrito por ROSENTHAL *et al* (1993) com algumas modificações. Foi adicionado ao produto de PCR um igual volume de solução de 20 % PEG 8000. A mistura foi homogeneizada em vortex, incubada a 37°C por 15 minutos e centrifugada a 14.000 x g por 15 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi removido e o sedimento obtido foi lavado 2 vezes com etanol 80%. O sedimento foi seco a 37°C e suspenso em água ultrapura estéril.

## 8.9 Clonagem dos Produtos de PCR

Os produtos de PCR purificados dos isolados BH 53, BH 54, BH 80, LD 15, LD 19, 1218, EVI-190 e EVI-88 foram clonados utilizando-se o Kit TOPO TA Cloning® for Sequencing (INVITROGEN) de acordo com as instruções dos fabricantes.

Em um tubo foram adicionados 200 ng do produto de PCR, 1 µL solução de sal, 1 µL vetor pCR®4-TOPO® e água estéril para um volume final de 5 µL. Em seguida, esta mistura foi homogeneizada suavemente e incubada por 5 minutos, à temperatura ambiente. A mistura foi então colocada no gelo para posterior transformação de bactérias *Escherichia coli* TOP 10 quimicamente competentes fornecidas pelo Kit.

Para a transformação, 2 µL das reações de ligação foram adicionados em um tubo contendo aproximadamente 50 µL da bactéria, e esta mistura foi incubada por 15 minutos no gelo. A mistura foi então aquecida a 42°C por 30 segundos e imediatamente os tubos foram colocados no gelo. Posteriormente a bactéria foi colocada em 1 mL de meio Luria-Bertani (LB - anexo) sem antibiótico e incubada a 37°C com agitação, por 60 minutos.

Posteriormente, 10 µL, 25 µL e 50 µL das bactérias foram semeadas em ágar LB (Anexo) com ampicilina (100 µg/mL). As placas foram incubadas a 37°C por 12 a 16 horas (HANAHAN *et al.* 1991).

## 8.10 Triagem dos Plasmídios Recombinantes

Cerca de 10 a 15 colônias foram selecionadas e inoculadas em 10 mL de meio LB líquido, contendo ampicilina (100 µg/mL) e crescidas por 18 horas, a 37°C, sob agitação constante de 180 rpm. Após o crescimento bacteriano, uma alíquota de 100 µL foi e congelada a -70°C na presença de tampão de congelamento (Anexo) (HANAHAN *et al.*, 1991).

Uma outra alíquota de 100 µL foi separada para a realização para a triagem feita pelo método descrito por AKADA, 1994. Aos 100 µL da cultura foram adicionados 50 µL de

fenol:clorofórmio (1:1) e 10 µL do tampão de amostra (Anexo), esta mistura foi agitada em vortex e em seguida centrifugada por 3 minutos a 14.000 x g em microcentrífuga. Uma alíquota de 15 µL do lisado celular foi separada por eletroforese em gel de agarose 0,7%, em tampão TBE 0,5 X. Os plasmídios originados das clonagens que se apresentavam maiores que o plasmídio sem inserto foram selecionados para a realização da mini preparação de DNA plasmidial e posterior digestão com enzima de restrição para a liberação do inserto e confirmação da clonagem.

### **8.11 Obtenção do DNA Plasmidial em Pequena Escala**

Culturas de *E. coli* DH5α transformadas com o plasmídio pCR<sup>®</sup>4-TOPO<sup>®</sup> recombinante foram inoculadas em 10 mL de meio LB líquido, contendo ampicilina (100 mg/mL), e incubadas durante 16 horas, a 37°C, sob agitação (180 rpm). A extração do DNA plasmidial foi feita pelo método de lise alcalina descrito por BIRNBOIM (1983). O DNA foi então digerido com a enzima *Eco* RI (INVITROGEN) e os fragmentos gerados foram fracionados eletroforeticamente em gel de agarose (livre de DNase, INVITROGEN) 0,7% em TBE 0,5 X (Anexo) sob voltagem constante (70 V) durante 1 hora. Após o fracionamento, os géis foram corados com brometo de etídeo (1,0 µg/mL) durante 15 minutos, visualizados em transluminador ultravioleta (254 nm, Pharmacia LKB Macro Vue<sup>TM</sup>, EUA) e fotografados em câmara especial (Gel Cam Polaroid) equipada com o filme Polaroid 667 e filtro laranja nº 15 e aqueles que apresentaram o inserto esperado foram selecionados para o sequenciamento.

### **8.12 Sequenciamento**

#### *Sequenciamento dos Produtos Clonados*

Foram selecionados 3 clones dos isolados BH 53, BH 54, BH 80, LD 15, LD 19, 1218, EVI-190 e EVI-88 para o sequenciamento. Os fragmentos de DNA das amostras clonadas foram sequenciados pelo método de terminação em cadeia por dideoxinucleotídeos (SANGER *et al.*, 1997), utilizando o Kit de Sequenciamento ABI Prism (PerKin-Elmer), de acordo com instruções do fabricante. As reações de sequenciamento foram feitas utilizando-se os OI senso e anti-senso do M13.

### *Sequenciamento de Produtos de PCR*

Os fragmentos de DNA dos isolados IBR 2113, IBR 6813, LD 30/2, LD 40/1, LD 50/2, BH 81, 1218 e da amostra clínica A7 foram seqüenciados diretamente dos produtos de PCR após sua purificação. Estes fragmentos de DNA foram seqüenciados pelo método da terminação da cadeia por dideoxynucleotídeos (SANGER *et al.*, 1997), empregando-se os mesmos OI utilizados para a amplificação pela PCR e o kit “DyEnamic™ ET Dye Terminator” para MegaBace™ 1000 (Amersham Biosciences).

### **8.13 Análise Computacional das Seqüências**

Cada seqüência obtida foi posicionada na orientação correta análoga àquela do gene que codifica para a glicoproteína B no genoma da amostra Cooper (padrão de BHV-1), e foi editada por meio da remoção das bases indesejadas, como seqüências do vetor e dos oligonucleotídeos iniciadores. A construção das seqüências consensos finais de cada clone foi feita pela superposição dos segmentos parciais e contínuos obtidos. A qualidade do sequenciamento de cada base das várias seqüências foi avaliada, de modo que somente as bases de alta confiabilidade, repetidas em série nos diferentes sequenciamentos, foram utilizadas para montagem da fita de DNA completa dos dois genes.

Depois de finalizadas as etapas de manipulação e ordenamento nucleotídicos e geração das seqüências consensos finais, as seqüências dos 3 clones da mesma amostra, bem como aquelas obtidas dos dois PCR de uma mesma amostra de herpesvírus bovino foram alinhadas entre si, com o auxílio do programa MultiAlin (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>), tendo sido verificada a identidade total entre todas elas.

As análises dos resultados dos sequenciamentos foram feitas através das comparações com as seqüências depositadas no GenBank (NCBI – Bethesda – USA – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Os algoritimos BLASTn e BLASTx (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) foram utilizados para a busca de similaridade entre nucleotídeos (nt) e aminoácidos (aa), respectivamente. As seqüência de nt obtidas e as de aa deduzidas foram alinhadas com as seqüências depositadas no GenBank, com o auxílio do

programa Clustal W, para comparações e análises de similaridade (CORPET, 1988). As seqüências deduzidas de aa foram também analisadas pelo programa TRANSLATE para verificar a presença de códon de terminação na seqüência de nt.

#### **8.14 Construção de árvores filogenéticas**

As seqüências de nucleotídeos e inferidas de aminoácidos foram alinhadas com o auxílio do programa CLUSTAL W (Thompson et al, 1994) usando os padrões previamente estabelecidos. Os alinhamentos foram utilizados para reconstruir árvores filogenéticas pelo método de Neighbor-joining usando o modelo de substituição de nucleotídeos de Tamura3-parâmetros (TAMURA, 1992) implementados no programa MEGA versão 3 (KUMAR *et al.*, 2004). As árvores foram enraizadas no ponto central, sendo feitas 1000 análises de “bootstrap”.

## **9. RESULTADOS**

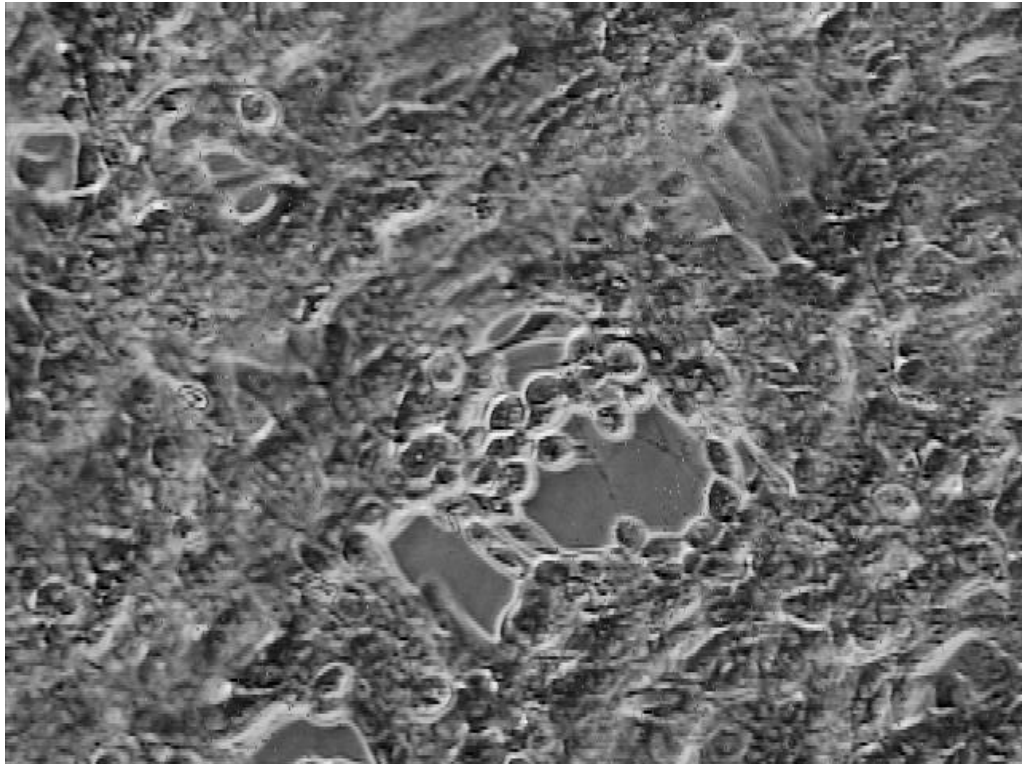
## **9. Resultados**

### **9.1 Multiplicação viral em Células MDBK**

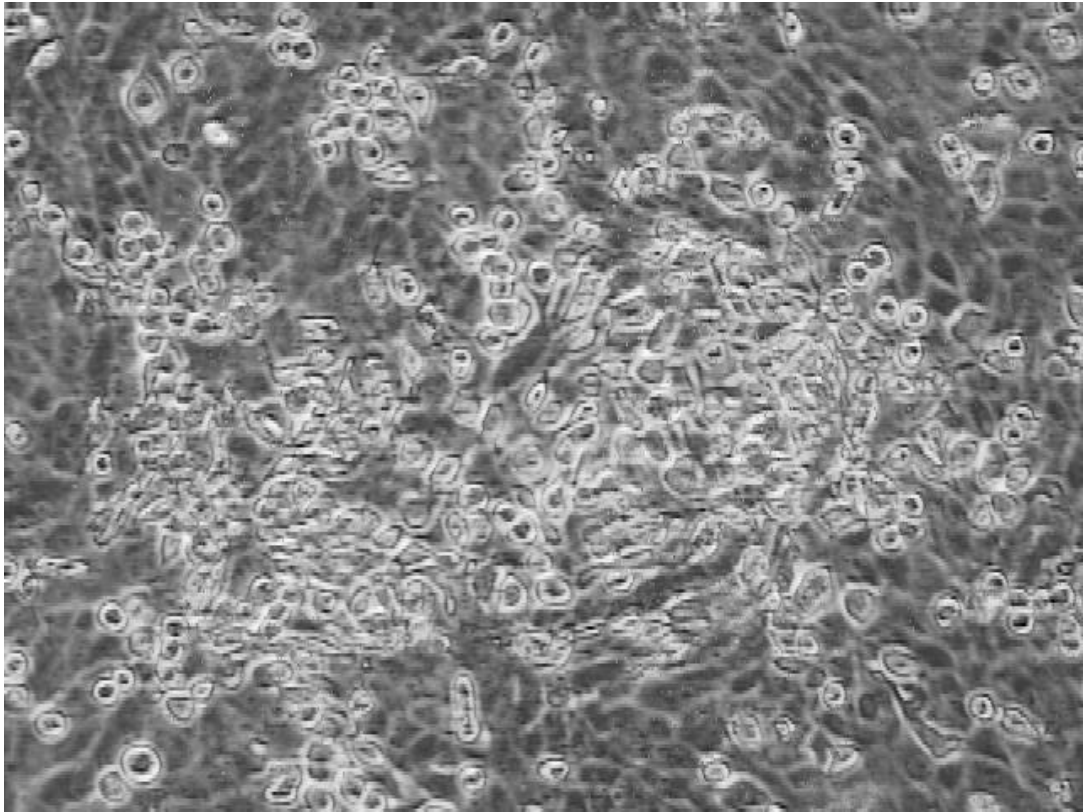
Após a inoculação de cada vírus em monocamadas confluentes de células MDBK, a multiplicação viral foi acompanhada pela observação do efeito citopático (ECP) em microscópio óptico invertido com contraste de fase. Após 12 horas da inoculação começaram a ser detectadas as primeiras alterações na morfologia celular para todos os isolados, exceto nas amostras EVI-190 e EVI-88 que apresentaram o início das alterações 18 horas após inoculação.

Os vírus IBR 2113, IBR 6813, LD 15, LD 19, LD 30/2, LD 40/1, LD 50/2, BH 53, BH 54, BH 80 e BH 81 apresentaram o mesmo ECP. Passadas 24 horas da inoculação, o ECP consistia de discretas áreas mostrando células arredondadas, aumentadas de volume e com menor refringência em comparação com as células adjacentes (FIGURA 4). Após 48 horas foi observada uma crescente granulosidade na estrutura celular, bem como várias células mostravam-se em processo de lise. Em seguida, ocorria a lise das células que se desprendiam da superfície da garrafa e após 56 horas era observado o ECP de 90%.

A amostra 1218, que foi coletada de feto abortado, e as amostras EVI-190 e EVI-88, obtidas de animais com sinais clínicos neurológicos, apresentaram ECPs semelhantes. Após 24 horas da infecção, as células apresentavam-se um pouco arredondadas e aumentadas de volume, depois rapidamente retraíam-se e formavam aglomerados celulares (FIGURA 5). Após 48 horas observava-se também para estas amostras um aumento na granulosidade citoplasmática e os grumos celulares começavam a se destacar da monocamada. Apenas após 72 horas observava-se que 90% das células haviam se desprendido da garrafa.



**FIGURA 4: Efeito citopático da amostra BH 80 (BHV-1) isolada de swab nasal, 24 horas após infecção em células MDBK. Observa-se o arredondamento de algumas células e uma pequena área de lise.**



**FIGURA 5:** Efeito citopático da amostra EVI-190 (BHV-5) isolada de cérebro, 24 horas após infecção em células MDBK. Observa-se que algumas células se encontram retraídas e formando aglomerados celulares.

## 9.2 Extração do DNA

Com a finalidade de se obter DNA de forma mais rápida para a realização do PCR foram otimizadas três metodologias: extração envolvendo fenol:clorofórmio, extração utilizando-se Chelex-100 e extração utilizando-se NaOH. Na TABELA 4 encontram-se as dosagens do DNA dos isolados BH 54 e EVI-88 obtidos utilizando-se os três métodos de extração descritos. Nota-se que a extração realizada com NaOH produziu um rendimento maior. As quantidades de DNA obtidas foram satisfatórias para uso em PCR para todas as metodologias testadas.

Além do bom rendimento de DNA, a extração realizada com Chelex-100 e com NaOH era feita com maior rapidez do que a extração realizada com fenol:clorofórmio. Depois da sedimentação do vírus, a extração do DNA usando o protocolo do fenol:clorofórmio foi realizada em um período de 4-5 horas, enquanto a extração usando os protocolos do Chelex-100 e do NaOH foram realizados em 20-30 minutos.

**TABELA 5:** Concentração de DNA (ng/ $\mu$ L) extraído das amostras de vírus presente no sobrenadante de cultura de célula usando as metodologias do fenol:clorofórmio, Chelex-100 e NaOH.

Amostras	Fenol:clorofórmio	Chelex-100	NaOH
BH 54	17,7	42,4	82,2
EVI-88	19	48,4	93,5

Após a otimização da extração foi selecionado o método do NaOH para a extração do DNA dos outros isolados e das amostras clínicas. Nas TABELAS 5 e 6 encontram-se as concentrações de DNA (ng/ $\mu$ L) obtidas dos diferentes isolados e das amostras clínicas, respectivamente.

**TABELA 6:** Concentração de DNA viral (ng/ $\mu$ L) extraído dos isolados usando a metodologia de extração de DNA com NaOH.

<b>Amostra</b>	<b>Concentração DNA (ng/<math>\mu</math>L)</b>
IBR 2113	61,2
IBR 6813	55,4
LD 15	63,0
LD 19	58,7
LD 30/2	76,2
LD 40/1	70,0
LD 50/2	63
BH 53	77,5
BH 54	66,2
BH 80	91,2
BH 81	48,6
1218	45,9
EVI-190	62,5
EVI-88	75,8

**TABELA 7:** Concentração de DNA total obtido das amostras clínicas (ng/ $\mu$ L) usando a metodologia de extração de DNA com NaOH.

<b>Amostra</b>	<b>Concentração DNA (ng/mL)</b>
A1	57,5
A2	192,5
A3	82,5
A4	162,5
A5	57,5
A6	90,0
A7	96,2
A8	88,5
A9	68,3
A10	66,0
A11	74,8

### **9.3 Amplificação do Gene que Codifica para a Glicoproteína B**

Os DNAs obtidos utilizando-se o protocolo do NaOH foram empregados para a realização das PCRs.

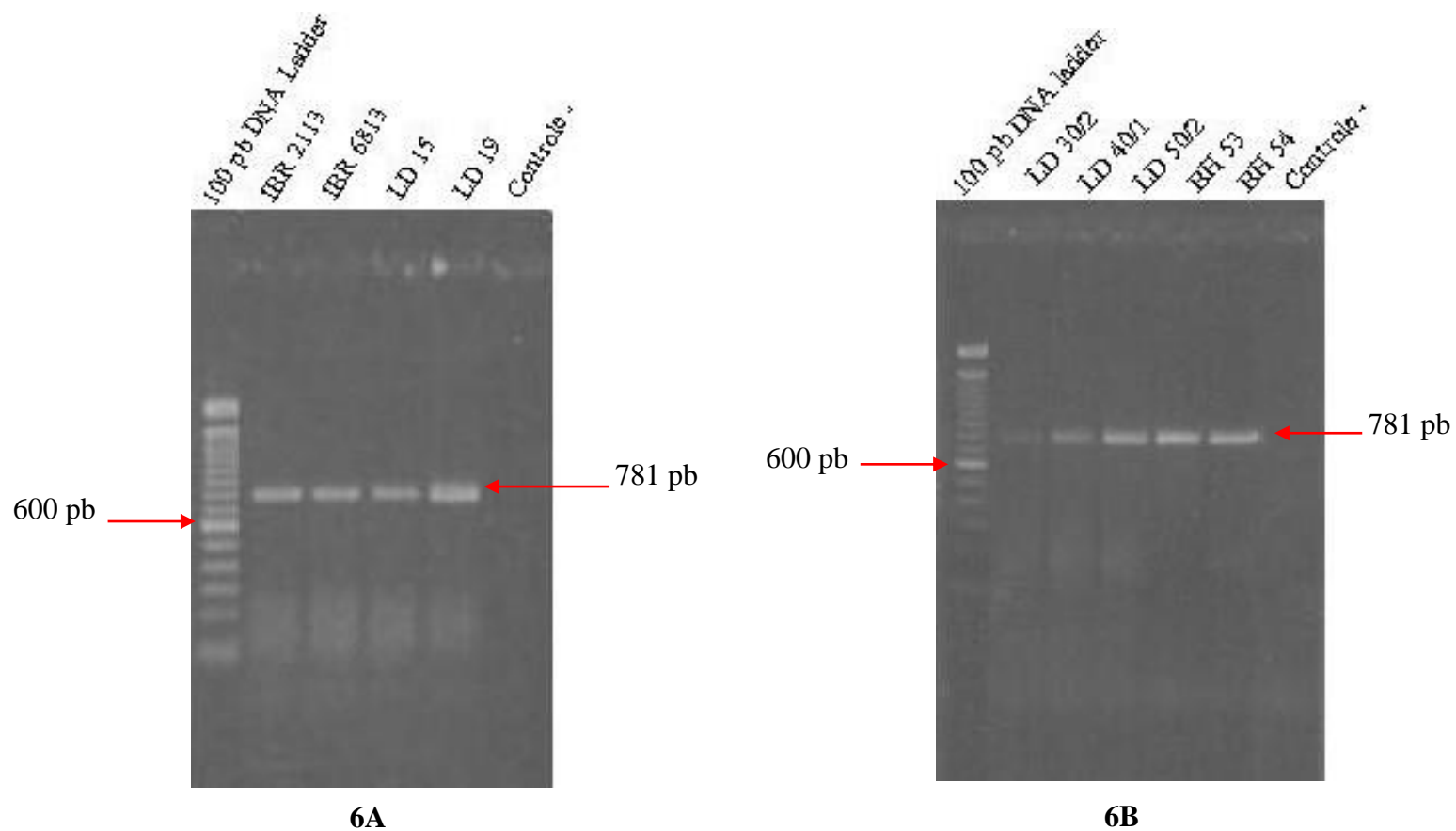
O resultado das amplificações do gene que codifica para a gB e as variações de primers testadas encontram-se na TABELA 8. Observa-se que utilizando o DNA da amostra padrão Cooper obteve-se amplificação empregando-se 6 pares de primers, enquanto utilizando-se o DNA extraído dos isolados obteve-se amplificação apenas quando se utilizou o par de primer LVC 120 e 121. Em relação as amostras clínicas obteve-se amplificação apenas da amostra clínica A7 quando se utilizou os primers LVC 120 e 121.

O par de OI LVC 120 e 121 foi capaz de amplificar parcialmente o gene que codifica para gB de todos os isolados e de uma amostra clínica, sendo obtido um produto único aproximado de 781 pb (FIGURAS 6A e 6B), com exceção do isolado 1218 em que se obteve um produto único aproximado de 700 pb. Na FIGURA 7 observa-se o fragmento obtido na amplificação da amostra 1218 e da amostra padrão Cooper. A amplificação do DNA da amostra 1218 com os OI LVC 120 e 121 foi possível quando se utilizou uma temperatura de pareamento de 40°C, enquanto a temperatura de pareamento utilizada para amplificação dos outros isolados e da amostra clínica A7 foi de 50°C. Na amplificação da amostra 1218 obteve-se um fragmento de aproximadamente 700 pb.

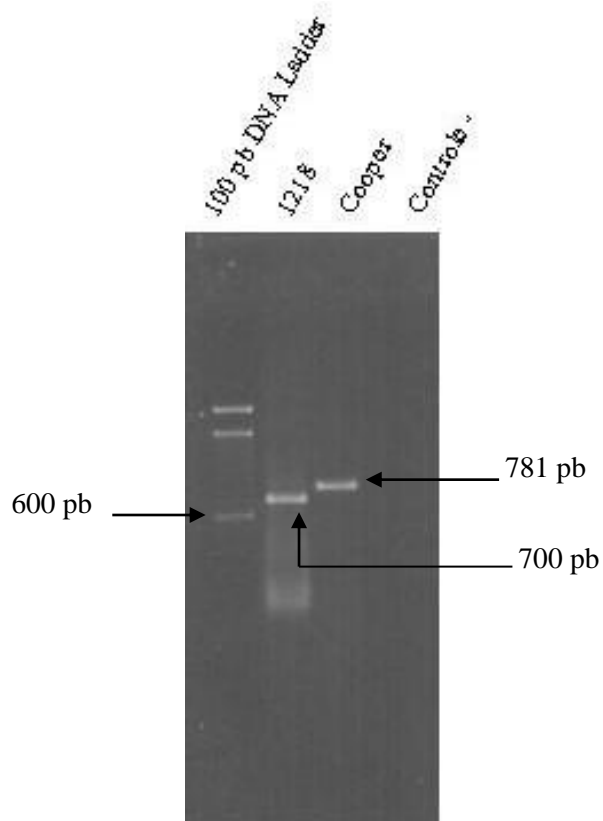
Como observado nas FIGURAS 6A, 6B e 7, nenhum produto de amplificação foi observado nas reações de controle negativo, em que foram empregados todos os reagentes necessários para amplificação por PCR exceto o DNA viral.

**TABELA 8:** Amplificações obtidas através da PCR, variações de primer e fragmento esperado.

<b>Primer</b>	<b>Fragmento esperado</b>	<b>Cooper</b>	<b>Isolados e amostra clínica A7</b>
LVC 118 e 119	516 pb	+	-
LVC 120 e 121	781 pb	+	+
LVC 124 e 125	1095 pb	+	-
LVC 170 e 171	391 pb	+	-
LVC 118 e 121	1280 pb	+	-
LVC 118 E 171	514 pb	+	-
LVC 153 e 154	2598 pb	-	-
LVC 172 e 173	1358 pb	-	-
LVC 174 e 175	977 pb	-	-
LVC 124 e 154	1088 pb	-	-
LVC 153 e 123	1599 pb	-	-
LVC 172 e 123	739 pb	-	-



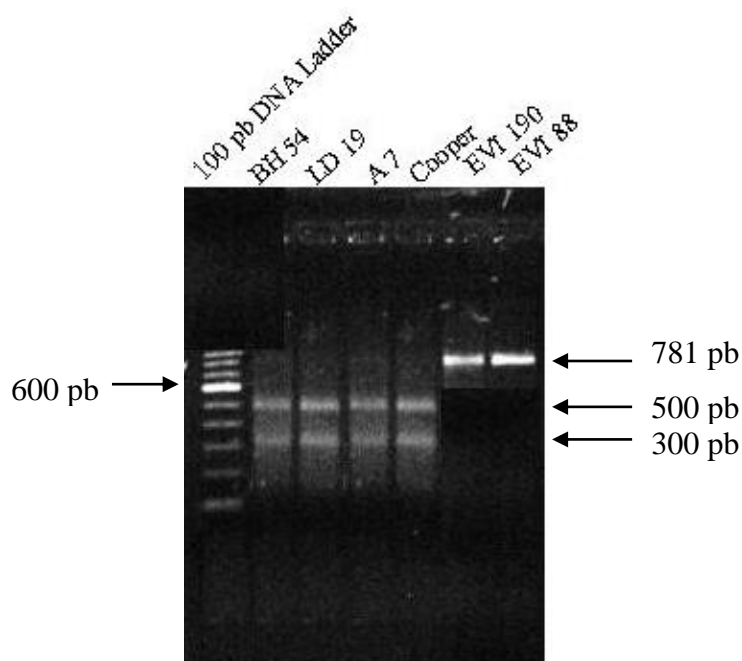
**FIGURA 6A e 6B– Amplificação, por PCR, de parte do gene que codifica para a glicoproteína B, utilizando os iniciadores LVC 120 e 121 de isolados brasileiros de herpesvírus bovino. Após a amplificação por PCR os produtos obtidos foram fracionados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, em tampão TBE 0,5 X, 100 V, tratado com brometo de etídio. Padrão de tamanho molecular – 100 pb Ladder (Invitrogen).**



**FIGURA 7– Amplificação, por PCR, de parte do gene que codifica para a glicoproteína B, utilizando os iniciadores LVC 120 e 121, do isolado brasileiro 1218 e da amostra Cooper (padrão de herpesvírus bovino) respectivamente.** Após a amplificação por PCR os produtos obtidos foram fracionados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, em tampão TBE 0,5 X, 100 V, tratado com brometo de etídio. Padrão de tamanho molecular – 100 pb Ladder (Invitrogen).

#### 9.4 Fragmentação do produto da PCR com enzima de restrição

Todos os produtos de PCR obtidos foram digeridos com enzima de restrição *Sma* I na tentativa de diferenciar as amostras de BHV-1 e BHV-5. Para a digestão dos fragmentos amplificados utilizando-se o par de OI LVC 120 e 121 dos diferentes isolados e da amostras clínica A7 foi escolhida a enzima *Sma* I utilizando-se o programa utilizando-se o programa Webcutter 2.0 (<http://www.firstmarket.com/cutter/cut2.html>). Esta enzima foi escolhida depois da análise deste fragmento das amostras padrão de BHV-1 e 5 (Cooper e N569, respectivamente), depositadas no GenBank, onde observou-se que a *Sma* I seria capaz de diferenciar as amostras de BHV-1 e 5. Os isolados de BHV-5 (EVI-190, EVI-88 e 1218) não apresentaram sítio de restrição para esta enzima. Já os isolados de BHV-1 e a amostra clínica A7 apresentaram um sítio de restrição gerando dois fragmentos (FIGURA 8).



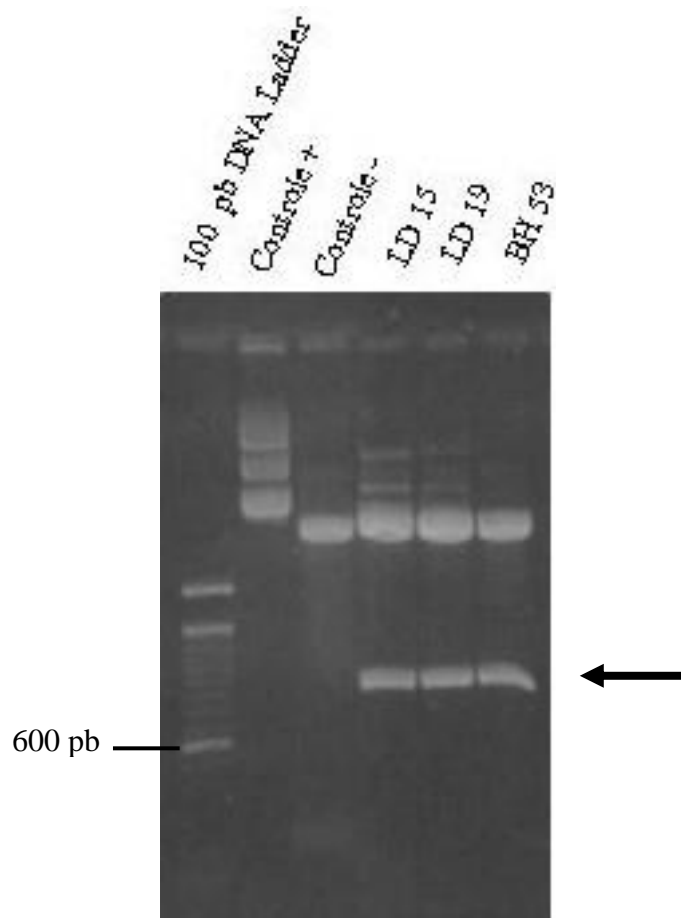
**FIGURA 8**–Fragmentos gerados após digestão com a enzima *Sma* I do produto amplificado pelos iniciadores LVC 120 e 121 de parte do gene que codifica para a glicoproteína B, de isolamentos de amostra clínica do herpesvírus bovino. Após a digestão os produtos obtidos foram fracionados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, em tampão TBE 0,5 X, 100 V, tratado com brometo de etídio. Utilizou-se a enzima *Sma* I para digerir os fragmentos. Padrão de tamanho molecular – 100 pb Ladder (Invitrogen).

## 9.5 Clonagem

O produto de PCR dos isolados BH 53, BH 54, BH 80, LD 15, LD 19, 1218, EVI-190 e EVI-88 foram clonados utilizando-se o TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing, onde os fragmentos de 781 pb e 700 pb (1218) do gene que codifica para a glicoproteína B após purificação foram inseridos no vetor pCR®4-TOPO® e os plasmídios usados para transformação de Top 10 *E. coli*.

Foi feita uma seleção dos clones bacterianos contendo os insertos dos fragmentos do gene que codifica para a gB, pela digestão enzimática do plasmídio pCR®4-TOPO® anteriormente selecionados como recombinantes. O DNA plasmidial de 3 clones positivos foi extraído e os plasmídios obtidos foram digeridos com a endonuclease de restrição *Eco* RI. A FIGURA 9 apresenta os perfis de restrição dos fragmentos gerados pela clivagem dos DNAs plasmidiais. A digestão dos plasmídios digeridos, contendo o fragmento do gene que codifica para a gB liberaram um inserto próximo de 800 pb.

A liberação dos produtos esperados, a partir da digestão dos DNAs plasmidiais confirmaram a presença de plasmídios recombinantes. Após esta confirmação as bactérias positivamente selecionadas foram estocadas a 70°C. Os DNAs plasmidiais de três clones, contendo o fragmento do gene que codifica para gB foram selecionados para determinação de suas seqüências nucleotídicas.



**FIGURA 9:** Fragmentos gerados pela digestão dos DNAs plasmidiais pCR®4 recombinantes com a enzima de restrição *Eco* RI. Para a confirmação da presença dos insertos o DNA plasmidial obtido em mini-preparações a partir de clones bacterianos Top 10 *E. coli* transformados com fragmento do gene que codifica para gB, foram digeridos com a endonuclease *Eco* RI e os fragmentos obtidos foram fracionados por eletroforese em gel de agarose 0,7% em tampão TBE 0,5X, tratado com brometo de etídio. Os insertos liberados estão indicados com seta. Padrão de tamanho molecular Ladder 100 pb (INVITROGEN).

## 9.6 Análise das Sequências de Nucleotídeos

Os sequenciamentos foram realizadas de dois clones dos isolados BH 53, BH 54, BH 80, LD 15, LD 19, 1218, EVI-190 e EVI-88, bem como diretamente dos produtos de PCR dos isolados IBR 2113, IBR 6813, LD 30/2, LD 40/1, LD 50/2, BH 81, 1218 e da amostra clínica A7, do fragmento obtido do gene que codifica para a glicoproteína B utilizando-se o par de OI LVC 120 e 121. Foram feitas duas reações de sequenciamento para cada clone, duas usando o OI M13 senso e duas o OI M13 anti-senso e 2 reações dos fragmentos de PCR empregando-se os mesmos OI utilizados para a amplificação.

Foram obtidas seqüências das amostras LD 50/2, LD40/1, LD30/2, LD 15, BH 53, IBR 2113, BH 80, IBR 6813, BH 54, BH 81, LD 19, EVI-190 e EVI-88 bem como para a amostra clínica A7. As seqüências de nucleotídeos destas amostras foram depositadas no GenBank com os números de acesso: DQ006850 (IBR 2113), DQ006851 (IBR 6813), AY758382 (LD 15), AY745875 (LD 19), DQ006856 (LD 30/1), DQ006855 (LD 40/1), DQ006857 (LD 50/2), DQ006853 (BH 53), AY330349 (BH 54), AY745877 (BH 80), DQ006854 (BH 81), DQ006852 (A7), e AY745876 (EVI-190) e AY330350 (EVI-88). A análise de nucleotídeos do fragmento seqüenciado do gene que codifica para a gB destas amostras, mostrou uma porcentagem entre 65% e 68% de G+C. Após várias tentativas não conseguiu-se a seqüência da amostra 1218.

Utilizando-se o programa BLASTn, as seqüências de nt das amostras foram comparadas com as seqüências depositadas no GenBank. As amostras seqüenciadas neste trabalho além de apresentarem similaridade com BHV-1 e com BHV-5, apresentaram similaridade também com outras amostras de herpesvírus como, por exemplo, de cervídeo (CerHV-1), herpesvírus de búfalo (BuHV-1), herpesvírus de renas (RanHV-1). As amostras de herpesvírus com seqüências de nt que apresentaram similaridade com as seqüências deste trabalho, com seus respectivos números de acesso são: P8-2 (BHV-1.1 - M23257), Cooper (BHV-1.1 - Z78205), K22 (BHV-1.2 - AF078725), N569 (BHV-5 - AF078726.2), SV507/99 (BHV-5 - AY261359), Banffshire 82 (CerHV-1 - AF78729), Salla 82 (RanHV-1 - AF078727) e B6 (BuHV-1 - AF359760).

A TABELA 7 mostra os valores de similaridade encontrados quando as seqüências nucleotídicas do fragmento de DNA do gene que codifica para a gB das amostras seqüenciadas neste trabalho foram comparadas entre si e com as demais seqüências de herpesvírus depositadas no GenBank. Em todas as análises, as similaridades determinadas foram acompanhadas de pequenos valores de E, que é a probabilidade da similaridade estabelecida ter ocorrido ao acaso.

Quando as seqüências nucleotídicas deste fragmento do gene que codifica para gB das amostras de BHV-1 isoladas no Brasil foram comparadas entre si foi observado uma conservação de 97 a 99% e a similaridade destas amostras com a amostra padrão Cooper foi de 99%. Para as amostras de BHV-5 observou-se 99% de similaridade entre si e com a amostra padrão de BHV-5 o isolado EVI-88 apresentou similaridade de 99% e o isolado EVI-190 100%.

As seqüências nucleotídicas das amostras de BHV-1 e BHV-5 apresentaram índices de similaridade que variaram de 94 a 95% entre si, e a similaridade de nt da mesma região das amostras padrões Cooper e N569 é de 95,1%.

Já as seqüências de nt das amostras de BHV-1 e 5 apresentaram similaridade com as amostras de herpesvírus de búfalo, cervídeo e rena que variou de 91 a 95% e 93 a 98% respectivamente. Nota-se que a menor similaridade foi encontrada entre as amostras de BHV-1 e 5 com vírus de rena. Observa-se que a similaridade encontrada entre as amostras de BHV-5 e o vírus de búfalo foi maior do que aquela encontrada com as amostras de BHV-1.

A FIGURA 10 apresenta o alinhamento das seqüências de nt das amostras estudadas com as seqüências de herpesvírus depositadas no GenBank, com o auxílio do programa CLUSTAL W.

**TABELA 9:** Porcentagem de similaridade nucleotídica entre as seqüências do fragmento do gene que codifica para a gB dos herpesvírus seqüenciados e das amostras de herpesvírus depositadas no GenBank, utilizando-se o programa BLASTn

Amostras	2113	6813	Ld15	Ld19	Ld 30/2	Ld 40/1	Ld 50/2	Bh80	Bh81	Bh53	Bh54	A7	EVI190	EVI88
<b>2113</b>														
<b>6813</b>	99													
<b>Ld15</b>	98	98												
<b>Ld19</b>	99	99	98											
<b>Ld30/2</b>	99	99	98	99										
<b>Ld40/1</b>	99	99	98	99	99									
<b>Ld50/2</b>	99	99	98	99	100	99								
<b>Bh80</b>	99	99	98	99	99	99	99							
<b>Bh81</b>	99	99	99	99	99	99	99	99						
<b>Bh53</b>	99	99	98	99	99	99	99	99	99					
<b>Bh54</b>	98	98	97	98	99	98	98	98	98	98				
<b>A7</b>	99	99	98	99	99	99	99	99	99	99	98			
<b>EVI190</b>	95	95	94	94	95	95	95	95	95	95	94	95		
<b>EVI88</b>	95	95	94	94	95	95	95	95	95	95	94	95	99	
<b>Cooper<sup>1</sup></b>	99	99	98	99	99	99	99	99	99	99	99	99	95	95
<b>N569<sup>2</sup></b>	95	95	94	94	95	95	95	95	95	95	94	95	100	99
<b>SV507/99<sup>3</sup></b>	95	95	94	94	95	95	95	95	95	95	94	95	100	99
<b>K22<sup>4</sup></b>	97	99	93	99	94	93	91	98	99	96	98	99	95	95
<b>P8-2<sup>5</sup></b>	99	99	98	99	99	99	100	99	99	99	98	99	95	94
<b>Banff<sup>6</sup></b>	94	93	93	93	94	94	94	94	94	94	93	93	95	95
<b>Salla<sup>7</sup></b>	91	91	91	91	91	92	92	91	91	92	90	91	93	93
<b>B6<sup>8</sup></b>	95	95	94	95	95	95	95	95	95	95	94	95	98	98

<sup>1</sup> Amostra Cooper (padrão de BHV-1)

<sup>2</sup> Amostra N569 (padrão de BHV-5)

<sup>3</sup> Amostra SV507/99 (amostra de BHV-5)

<sup>4</sup> Amostra K22 (amostra de BHV-1.2)

<sup>5</sup> Amostra P8-2 (amostra de BHV-1)

<sup>6</sup> Amostra Banffshire (amostra de CerHV-1)

<sup>7</sup> Amostra Salla (amostra de RanHV-1)

<sup>8</sup> Amostra B6 (amostra de BuHV-1)

Cooper 1 CGGCGTCATTTACAAGGAGAACATCGCGCCGTACACGTTCAAGGCCTACATTTA---CAAAAACGTGATCGTGACCACGACCTGGGCGGGCAGCACGTACGCGGCCATTACAAACCAGTA  
2113 1 .....A.....CTA.....  
6813 1 .....CTA.....  
LD30/2 1 .....CTA.....  
LD40/1 1 .....A.....CTA.....C.....  
LD50/2 1 .....A.....CTA.....  
BH54 1 .....CTA.....  
BH53 1 .....CTA.....  
BH81 1 .....CTA.....  
LD15 1 .....T.....CTA.....  
LD19 1 .....A.....CTA.....  
BH80 1 .....CTA.....  
A7 1 .....CTA.....C.....  
K22 1 .....  
P8-2 1 .....AT.....CTA.....  
EVI190 1 T...C...C.....C...CTA...G.....C...G.....  
EVI88 1 T...C...C.....C...CTA...G.....C...G.....  
N569 1 T...C...C.....C...CTA...G.....C...G.....  
SV507/99 1 T...C...C.....C...CTA...G.....C...G.....  
B6 1 .....C...C.....C...CTA...G.....C.....C.....  
Banffshire 1 .....C.....C...CTA...G.....C.....C.....  
Salla82 1 .....C.....C...C.....C...CTA...G.....C.....C.....  
consensus 1 cggcgtcatttacaaggagaacatcgcgccgtacacgttcaaggcctacatTTA---caaaaacgtgatcgtgaccacgacctgggcgggcagcacgtacgcGCCATTACaAACCAGTA

Cooper 118 CACGGACCGCGTGCCCGTGGGCATGGGCGAGATCACGGACCTGGTGGACAAGAAGTGGCGCTGCCTTTTCGAAAGCCGAGTACCTGCGCAGCGGGCGCAAGGTGGTGGCCTTTGACCGCGA  
2113 121 .....T.....C.....  
6813 121 .....  
LD30/2 121 .....  
LD40/1 121 .....C.....  
LD50/2 121 .....  
BH54 121 .....A.....  
BH53 121 .....C.....  
BH81 121 .....C.....  
LD15 121 .....A.....C.....  
LD19 121 .....T.....C.....  
BH80 121 .....  
A7 121 .....  
K22 19 .....C.....  
P8-2 121 .....  
EVI190 121 .....C.....C.....G.....C.....  
EVI88 121 .....C.....C.....G.....C.....  
N569 121 .....C.....C.....G.....C.....  
SV507/99 121 .....C.....C.....G.....C.....  
B6 121 .....C.....C.....G.....C.....C.....  
Banffshire 121 .....A.....G.....C.....G.....CGC.....C.....  
Salla82 121 .....C.....G.....C.....G.....CG.....A.....C.....  
consensus 121 CACGGACCGCGTGCCCGTGGGCaTGGGcGAGATCACGGACcTGGTGGACAAGAAGTGGCGCTGCCTtTCGAAaGCCGAGTACCTGCGCAGCGGgCGCaagGTGGtGGCCTTTGACCGCGA

Cooper	238	CGACGACCCCTGGGAGGCGCCGCTGAAGCCTGCGCGGCTGAGCGGCCCGGGTGC	GGGCTGGCACACGACGGACGATGTGTACACGGCGCTGGGCTCGCGGGGCTCTACCGCACGGG
2113	241	.....	.....
6813	241	.....	.....
LD30/2	241	.....	.....
LD40/1	241	.....	.....
LD50/2	241	.....	.....
BH54	241	.....	.....
BH53	241	.....	.....
BH81	241	.....	.....
LD15	241	.....	.....
LD19	241	.....	.....
BH80	241	.....	.....
A7	241	.....	.....
K22	139	.....	.....
P8-2	241	.....	.....
EVI190	241	..G.....	..C.....T.....C.....G.....
EVI88	241	..G.....	..C.....T.....C.....G.....
N569	241	..G.....	..C.....T.....C.....G.....
SV507/99	241	..G.....	..C.....T.....C.....G.....
B6	241	..G.....	..C.....C.....G.....
Banffshire	241	..G..G.....	..C.....A.....C.....G.....
Salla82	241	..C..G.....	..C.....A.....C.C..C.....G.....G.....A..C.....
consensus	241	CGacGACcCCTGGGAGGCGCCGctGAAGCCtGCGCGGCTGAgCGCGCCcGgGtGCGgGGCTGGCACACGACGGACGAtGTGTACACGGCGcTGGGCTcGcGgGGCTCTACCGCACGGG	

Cooper	358	CACCTCTGTGAAGTGCATCGTGAAGAAGTGGAGGCGCGCTCGGTGTACCCGTACGACTCGTTTCGCGCTCTCGACCGGGACATTATCTACATGTGCGCCCTTTTACGGGCTGCGGAGGG
2113	361	.....
6813	361	.....
LD30/2	361	.....
LD40/1	361	.....
LD50/2	361	.....
BH54	361	.....
BH53	361	.....
BH81	361	.....
LD15	361	.....
LD19	361	.....
BH80	361	.....
A7	361	.....
K22	259	.....
P8-2	361	.....
EVI190	361	.....G.....G..G.....C.....C.....C.....C..
EVI88	361	.....G.....G..G.....C.....C.....C.....C..
N569	361	.....G.....G..G.....C.....C.....C.....C..
SV507/99	361	.....G.....G..G.....C.....C.....C.....C..
B6	361	.....G.....G..G.....C.....C.....C.....C..
Banffshire	361	.....G.....G..G.....C.....C.....C.....C..
Salla82	361	.....G.....G..G.....C.....T.....G..C.....C.....C.....
consensus	361	CACCTCtGTGAAGTGCATCGTGAaAaGtGGAGgCGCGCTCGGTGTACCCgTACGACTCGTTCGCGCTCTCgACcGgGAcAtTATCTACATGTGCGCCcTtTACGGgGCTgCGGAGgG

Cooper 478 CGCGCACCGGAGCACACCAGCTACTCGCCGGAGCGCTTCCAGCAGATCGAGGGCTACTACAAGCGCGACATGGCCACGGGCCGGCGCCTCAAGGAGCCGGTCTCGCGGAACCTTTTGGCG  
 2113 481 .....  
 6813 481 .....G.....  
 LD30/2 481 .....  
 LD40/1 481 .....  
 LD50/2 481 .....  
 BH54 481 .....A.....A.....A.....  
 BH53 481 .....  
 BH81 481 .....  
 LD15 481 .....T.....A.....  
 LD19 481 .....  
 BH80 481 .....  
 A7 481 .....  
 K22 379 .....  
 P8-2 481 .....  
 EVI190 481 .....A.....T.....C.....  
 EVI88 481 .....T.....A.....T.....C.....  
 N569 481 .....A.....T.....C.....  
 SV507/99 481 .....A.....T.....C.....  
 B6 481 .....  
 Banffshire 481 .....G.....  
 Salla82 481 .....G.....CG.....C.....G.....C.....CC.....  
 consensus 481 CGCGCAcCGCGAgCACACCAGCTACTCGCCGgAGCGCTTcCaGcAgatCGAGGGCTACTACaaGCGCGACATGgCCACGGGCCGgCGCcTCAAGGAGCCgGTCTCGCgGAACCTttTGCG

Cooper 598 TACACAGCACGTGACGGTAGCCTGGGACTGGGTGCCCAAGCGCAAAAACGTGTGCTCGCTGGCCAAGTGGCGCGAGGCGGACGAAATGCTGCGAGACGAGAGCCGCGGGAACCTTCCGCTT  
 2113 601 .....  
 6813 601 .....  
 LD30/2 601 .....  
 LD40/1 601 .....  
 LD50/2 601 .....  
 BH54 601 .....  
 BH53 601 .....  
 BH81 601 .....  
 LD15 601 .....T.....  
 LD19 601 .....  
 BH80 601 .....T.....  
 A7 601 .....  
 K22 499 .....  
 P8-2 601 .....  
 EVI190 601 C..C.....G.....G.....A.....G.....C.....T.....  
 EVI88 601 C..C.....G.....G.....A.....G.....C.....T.....  
 N569 601 C..C.....G.....A.....G.....C.....T.....  
 SV507/99 601 C..C.....G.....G.....A.....G.....C.....T.....  
 B6 601 C..C.....G.....A.....G.....C.....  
 Banffshire 601 C..G.....G.....A.....G.....C.....A..C.....C.....  
 Salla82 601 C..G.....G.....CGC.....A.....T.....G.....C.....CGG.....  
 consensus 601 tACaCAGCACGTGACGGTAgCCTGGGACTGGGTGCCCAAGCGCaaaAACGTGTGCTcGCTGgCCAAGTGGCGCGAGgCGgagcgaatgctgCGagacgagagccgCGggaacttccgctt

Cooper	718	CACGGCCCGCTCGCTCTCGGCGACCTTTG
2113	721	.....
6813	721	.....
LD30/2		
LD40/1		
LD50/2		
BH54	721	.....
BH53	721	.....
BH81	721	.....
LD15		
LD19	721	.....
BH80	721	.....
A7	721	.....
K22	619	.....
P8-2	721	.....
EVI190	721	T.....
EVI88	721	T.....
N569	721	T.....
SV507/99	721	T.....
B6	721	.....C.
Banffshire	721	.....G.....A..T.C..
Salla82	721	.....G.....C.....C.
consensus	721	cacggcccgctcgctctcgggacctttg

**FIGURA 10: Alinhamento das seqüências de nucleotídeos do fragmento que codifica para gB das amostras de herpesvírus bovino 1 e 5 analisadas neste estudo com amostras de herpesvírus depositadas no GenBank.** O nt número 1 corresponde ao primeiro nt seqüenciado das amostras analisadas, que corresponde ao nt 437 da amostra padrão Cooper. Os pontos indicam identidade de nt e os traços correspondem as deleções. As mutações ocorridas no fragmento seqüenciado das amostras de BHV-1 em relação a amostra padrão Cooper, estão destacadas de azul, enquanto as mutações ocorridas no fragmento das amostras de BHV-5 em relação a amostra padrão N569, está destacada em vermelho.

As mutações totais observadas durante a análise da seqüência de nt das amostras estudadas estão descritas na TABELA 8. O alinhamento realizado entre as amostras de BHV-1 analisadas, determinou uma alta taxa de conservação de nt tanto entre as amostras seqüenciadas neste trabalho quanto estas amostras e aquelas depositadas no GenBank, incluindo a amostra padrão Cooper. As amostras LD 15 e BH 54 apresentaram um maior número de mutação em relação às demais.

As amostras de BHV-5, EVI-190 e EVI-88 apresentaram apenas uma mutação quando comparadas entre si. A EVI-190 não apresentou mutação quando comparada com a amostra padrão de BHV-5 (N569), enquanto a EVI-88 apresentou uma mutação em relação às outras amostras de BHV-5 analisadas.

As seqüências de nucleotídeos das amostras BHV-1 e 5 estudadas neste trabalho geraram um padrão de mutação semelhante ao observado quando se comparam as amostras de referência Cooper (BHV-1) e N569 (BHV-5). Esta apresentou uma maior variabilidade, ocorrendo um elevado número de substituições sem apresentarem inserções ou deleções de nucleotídeos.

Ao comparar as amostras de BHV-1 e BHV-5 com amostras de herpesvírus que infectam outros animais o número de mutações observadas foi superior aquele obtido entre as amostras de BHV. O padrão de substituição das amostras de BHV-1 e 5 em comparação com as amostras de BuHV-1, CerHV-1 e RanHV-1 foi o mesmo das suas respectivas amostras padrões (Cooper e N569) quando comparado com as mesmas amostras, havendo um maior número de substituições com as amostras de RanHV-1. Entretanto as amostras de BHV-5 (EVI-190 e EVI-88) apresentaram taxas de mutações menores em relação a amostra B6 (BuHV) do que as encontradas entre elas e as amostras de BHV-1.

As amostras analisadas apresentaram substituições nucleotídicas tanto do tipo transição quanto do tipo transversão, sendo observada uma taxa maior de transições do que de transversões. As amostras IBR 2113, IBR 6813, LD 19, LD 30/2, LD 40/1, LD 50/2, BH 53, BH 80 e A7 apresentaram uma maior taxa de transição de citosina (c) → timina (t), as amostras BH 54, LD15 e BH 81 a maior taxa de transição foi de guanina (g) → adenina (a). As amostras de BHV-5 tiveram uma maior taxa de transição de t → c.

Conforme mostra a TABELA 9 quando se avalia as mutações das amostras de BHV-1 e de BHV-5 em relação às amostras padrões Cooper e N569 respectivamente, poucas mutações são observadas. Em relação às amostras de BHV-1 ocorreu uma taxa maior de substituição do tipo transição, ocorrendo ainda uma inserção de 3 nucleotídeos em relação a amostra de referência Cooper para todas as amostras sequenciadas. Com relação as amostras de BHV-5, ocorreu apenas uma substituição do tipo transição da amostra EVI-88.

**TABELA 10:** Número de transições e transversões ocorridas nas seqüências de nucleotídeos das amostras seqüenciadas, quando comparadas entre elas e com as seqüências homólogas das amostras Cooper, K22, N565, SV507, Banffishare, Salla e B6.

Amostras	IBR 2113	IBR 6813	LD 15	LD 19	LD30/2	LD40/1	LD50/2	BH53	BH54	BH80	BH81	A7	EVI88	EVI190	
BHV-1	<b>IBR 2113</b>														
	<b>IBR 6813</b>	4													
	<b>Ld 15</b>	11	11												
	<b>Ld 19</b>	3	6	13											
	<b>Ld 30/2</b>	3	1	13	5										
	<b>Ld 40/1</b>	3	5	10	5	4									
	<b>LD 50/2</b>	3	1	10	5	0	3								
	<b>BH 53</b>	2	2	8	3	0	3	0							
	<b>Bh 54</b>	10	8	10	12	7	11	7	8						
	<b>BH 80</b>	4	2	10	6	1	5	1	2	8					
	<b>Bh 81</b>	4	4	7	5	3	3	3	2	9	4				
	<b>A7</b>	6	3	10	7	2	4	2	3	9	4	3			
	<b>Cooper</b>	6	4	10	5	0	4	0		7	1	3	0	36	35
	BHV-5	<b>K22</b>	2	3	7	4	2	0	2	1	9	3	1	1	29
<b>P8-2</b>		5	3	12	7	2	6	3	3	9	2	5	4	38	37
<b>EVI 190</b>		35	36	41	38	35	37	35	34	41	36	36	36	1	-
<b>EVI 88</b>		36	37	42	39	36	38	36	35	42	37	37	37		
<b>N569</b>		35	36	41	38	35	37	25	34	41	36	36	36	1	0
	<b>SV507</b>	35	36	41	38	35	37	35	34	41	36	36	36	1	0
CerHV-1	<b>Banffishire</b>	42	42	45	48	41	40	36	40	51	42	41	45	32	31
RanHV-1	<b>Salla</b>	60	62	60	64	58	56	53	57	67	61	61	61	51	50
BuHV-1	<b>B6</b>	32	33	37	35	31	31	30	30	39	32	31	32	10	9

**TABELA 11:** Tipos de mutações ocorridas no fragmento do gene que codifica para a glicoproteína B dos herpesvírus bovinos seqüenciados. A mutações listadas dos BHV-1 foram analisadas em relação à seqüência nucleotídica da amostra padrão de BHV-1 (Cooper) e as mutações dos BHV-5 em relação à seqüência nucleotídica da amostra padrão de BHV-5 (N569).

Amostra viral	TIPO DE SUBSTITUIÇÃO NUCLEOTÍDICA										INSERÇÃO	
	Transição				Transversão							
	t → c	c → t	g → a	Total	g → t	t → g	t → a	a → t	a → c	Total		
BHV-1	IBR 2113	1	0	0	1 (14%)	1	0	1	0	0	2 (28%)	3 (58%)
	IBR 6813	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1 (14%)	3 (86%)
	LD 15	2	2	5	9 (69%)	0	0	0	1	0	1 (8%)	3 (23%)
	LD 19	1	1	0	2 (25%)	1	0	2	0	0	3 (37,5 %)	3 (37,5%)
	LD 30/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3 (100%)
	LD 40/1	2	0	0	2 (29%)	0	0	1	0	1	2 (29%)	3 (42%)
	LD 50/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3 (100%)
	BH 53	1	0	0	1 (25%)	0	0	0	0	0	0	3 (75%)
	BH 54	1	0	6	7 (70%)	0	0	0	0	0	0	3 (30%)
	BH 80	0	1	0	1 (25%)	0	0	0	0	0	0	3 (75%)
	BH 81	3	0	1	4 (57%)	0	0	0	0	0	0	3 (43%)
A7	1	0	0	1 (20%)	0	0	0	0	1	1 (20%)	3 (60%)	
BHV-5	EVI-190	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	EVI-88	1	0	0	1 (100%)	0	0	0	0	0	0	0

## 9.7 Análise das Sequências Inferidas de Aminoácidos

Com o auxílio do programa BLASTx, as seqüências de nt de todas as amostras aqui seqüenciadas foram inferidas em seqüências de aminoácidos (aa), nas seis fases de leitura. Estas seqüências de aa foram então comparadas com as seqüências de aa depositadas no GenBank. As seqüências de aa traduzidas das seqüências de nt das amostras apresentaram similaridade com seqüências de aa de BHV-1, BHV-5, RanHV, CerHV-1, BuHV-1. A amostras com seqüências de aa similares com com seus respectivos números de acesso no GenBank são: P8-2 (AAA46013; P17471), Cooper (NP\_045331; P12640; AAA46055, CAB01598; CAA06106), N569 (AFAD46112), B6 (AAL88794), Banffshire 82 (AAD46115), Salla 82 (AAD466113).

Ao traduzir a seqüência de nt das amostras pelo programa Translate observou-se que estas foram traduzidas na segunda fase de leitura, resultando em seqüências de 249 aa para as amostras IBR 6813, BH 54, BH 81, LD 19, A7, EVI-190 e EVI-88, 238 aa para as amostras LD 15 e LD 30/1, e seqüências de 225, 236, 241, 245 e 247 aa para as amostras LD 50/2, LD 40/1, BH 53, IBR 2113, BH 80 duas amostras.

A TABELA 10 mostra os valores de similaridade encontrados quando as seqüências de aa das amostras de BHV-1 e 5 foram comparadas entre si e com algumas seqüências depositadas no GenBank. As seqüências traduzidas das amostras de BHV-1 estudadas neste trabalho, na segunda fase de leitura apresentaram uma alta taxa de similaridade quando comparadas com elas mesmas e com as amostras P8-2 e Cooper. As seqüências traduzidas das aa das amostras de BHV-5 na segunda fase de leitura apresentaram 100% de similaridade com a amostra padrão N569 e 99% de similaridade com a amostra de herpesvírus de búfalo (B6). Quando comparadas com as amostras de BHV-1, as amostras de BHV-5 apresentaram uma taxa de similaridade que variou de 95 a 97% e com as amostras de herpesvírus de cervídeo (CervHV-1) e rangiferino (RanHV-1) a similaridade foi de 93 a 91% respectivamente.

A FIGURA 11 apresenta o alinhamento das seqüências de aa das amostras de herpesvírus analisadas com as seqüências das amostras de BHV-1, BHV-5, RanHV-1 e CerHV-1 realizado com o auxílio do programa CLUSTAL W 1.8. Comparando as amostras de BHV-1

e BHV-5 as amostras padrão Cooper e N569 respectivamente, pode-se observar que nem todas as substituições de nt que ocorreram nestes fragmentos do gene que codifica para a gB resultaram em mudança da sequência de aa. A sequência de aa das amostras de BHV-1 analisadas neste estudo quando comparada com a amostra padrão de BHV-1 (Cooper), apresentaram poucas trocas de aa, sendo que um número maior de trocas de aa ocorreu com a amostra BH 54. As substituições de nt que geraram mudança de aa ocorreram no primeiro ou segundo nt do códon em todas as amostras. A amostra BH 54 apresentou dez mudanças de nt e apenas cinco resultaram em mudança de aa, onde foram substituídos um resíduo de Leucina (L) → Prolina (P), Glicina (G) → Arginina (R), Glicina (G) → Glutamato (E), Glutamato (E) → Lisina (K), Arginina (R) → Glutamina (Q). Ocorreu ainda a inserção do aminoácido Y (Tirosina) em todas as amostras de BHV-1 analisadas, resultante da inserção de 3 nt.

As seqüências de aa das amostras de BHV-5 estudadas neste trabalho não apresentaram troca de aa quando comparadas à amostra padrão de BHV-5, ocorrendo apenas uma mutação silenciosa na amostra EVI-88.

**TABELA 12:** Porcentagem de similaridade entre as seqüências de aminoácidos inferidos do fragmento do gene que codifica para a gB dos herpesvírus seqüenciados e das amostras de herpesvírus depositadas no GenBank, utilizando-se o programa BLASTx.

Amostras	2113	6813	Ld15	Ld19	Ld 30/2	Ld 40/1	Ld 50/2	Bh80	Bh81	Bh53	Bh54	A7	EVI190	EVI88
<b>2113</b>														
<b>6813</b>	98													
<b>Ld15</b>	98	98												
<b>Ld19</b>	99	98	97											
<b>Ld30/2</b>	99	99	99	98										
<b>Ld40/1</b>	99	98	98	98	99									
<b>Ld50/2</b>	99	99	98	99	99	99								
<b>Bh80</b>	98	99	98	98	99	98	99							
<b>Bh81</b>	99	99	99	98	100	99	99	99						
<b>Bh53</b>	99	99	99	98	100	99	99	99	100					
<b>Bh54</b>	97	97	97	96	97	97	97	97	97	97				
<b>A7</b>	98	99	98	98	99	99	99	99	99	99	97			
<b>EVI190</b>	96	97	96	96	97	96	96	97	97	97	95	97		
<b>EVI88</b>	96	97	96	96	97	96	96	97	97	97	95	97	100	
<b>Cooper<sup>1</sup></b>	98	99	98	98	99	98	99	99	100	99	97	99	97	97
<b>N569<sup>2</sup></b>	96	97	96	96	97	96	96	97	97	97	95	97	100	100
<b>SV507/99<sup>3</sup></b>	96	97	96	96	97	96	96	97	97	97	95	97	100	100
<b>K22<sup>4</sup></b>	99	99	99	99	100	100	100	99	100	100	98	100	97	97
<b>P8-2<sup>5</sup></b>	98	99	98	98	99	98	100	98	99	99	97	95	97	97
<b>Banff<sup>6</sup></b>	94	94	93	93	94	93	94	94	94	95	93	89	93	93
<b>Salla<sup>7</sup></b>	91	92	91	91	92	91	92	92	92	92	91	87	91	91
<b>B6<sup>8</sup></b>	95	96	95	95	96	95	96	96	96	96	95	91	99	99

<sup>1</sup> Amostra Cooper (padrão de BHV-1)

<sup>2</sup> Amostra N569 (padrão de BHV-5)

<sup>3</sup> Amostra SV507/99 (amostra de BHV-5)

<sup>4</sup> Amostra K22 (amostra de BHV-1.2)

<sup>5</sup> Amostra P8-2 (amostra de BHV-1)

<sup>6</sup> Amostra Banffshire (amostra de CerHV-1)

<sup>7</sup> Amostra Salla (amostra de RanHV-1)

<sup>8</sup> Amostra B6 (amostra de BuHV-1)

Cooper	1	GVIYKENIAPYTFKAYIY-KNVIVTTT	WAGSTYAAITNQYTDRVPVGMGEITDLV	DKKWRCLSKAEYLRSGRKVVA	FRDDDPWEAPLKP	PARLSAPGVRGWHTTDDVY	TALGSAGLYRTG
2113	1	.	N.	.	Y.	.	V.
6813	1	.	.	.	Y.	.	.
LD15	1	.	M.	.	Y.	.	.
LD19	1	.	N.	.	Y.	.	V.
LD30	1	.	.	.	Y.	.	.
LD40	1	.	N.	.	Y.	H.	.
LD50	1	.	N.	.	Y.	.	.
BH53	1	.	.	.	Y.	.	.
BH54	1	.	.	.	Y.	.	P.
BH80	1	.	.	.	Y.	.	.
BH81	1	.	.	.	Y.	.	.
A7	1	.	.	.	Y.	T.	.
P8	1	.	.	I.	Y.	.	.
EVI190	1	A.	.	.	Y.	L.	E.
EVI88	1	A.	.	.	Y.	L.	E.
N569	1	A.	.	.	Y.	L.	E.
SV507	1	A.	.	.	Y.	L.	E.
B6	1	A.	.	.	Y.	R.	L.
Banffishire	1	.	.	.	Y.	D.	V.
Salla	1	.	.	.	Y.	A.	V.

Cooper	120	TSVNCIVEEVEARSVYPYDSFALSTGDI	IYMSPFYGLREGAHREHTSYS	PERFQQIEGYYKRD	MATGRRLKEPVS	RNFLR	TQHVTVAWDWVPKRKNVCSLAKW	READEMLRDESRGNFRF
2113	121	.	.	.	.	.	.	.
6813	121	.	.	.	.	S.	.	.
LD15	121	.	.	.	.	.	I.	.
LD19	121	.	.	.	I.	.	.	.
LD30	121	.	.	.	.	.	.	.
LD40	121	.	.	.	.	.	.	.
LD50	121	.	.	.	.	.	.	.
BH53	121	.	.	.	.	.	.	.
BH54	121	.	.	R.	.	E.	.	K.
BH80	121	.	.	.	.	.	Q.	.
BH81	121	.	.	.	.	.	.	T.
A7	121	.	.	.	.	.	.	.
P8	121	.	.	.	.	.	.	.
EVI190	121	.	.	.	D.	.	.	T.
EVI88	121	.	.	.	D.	.	.	T.
N569	121	.	.	.	D.	.	.	T.
SV507	121	.	.	.	D.	.	.	T.
B6	121	.	.	.	D.	.	.	T.
Banffishire	121	.	.	.	.	R.	.	T.
Salla	121	.	.	.	.	V.	R.	V.

Cooper	240	TARSLSATF
2113	241	.....
6813	241	.....
LD15		
LD19	241	.....
LD30		
LD40		
LD50		
BH53	241	.
BH54	241	.....
BH80	241	.....
BH81	241	.....
A7	241	.....
P8	241	.....
EVI190	241	.....
EVI88	241	.....
N569	241	.....
SV507	241	.....
B6	241	.....
Banffishire	241	.....S
Salla	241	.....

**FIGURA 11: Alinhamento das seqüências de aminoácidos inferidas na segunda fase de leitura do fragmento do gene que codifica para a gB das analisadas neste trabalho, com amostras de herpesvírus depositadas no GenBank.** O primeiro aminoácido mostrado corresponde ao primeiro aminoácido traduzido da seqüência das amostras seqüenciadas, que corresponde ao aa 145 da amostra Cooper. Os pontos indicam identidade de aminoácidos. As mudanças de aminoácidos das amostras BHV-1 em relação a amostra padrão de BHV-1 (Cooper) estão destacadas.

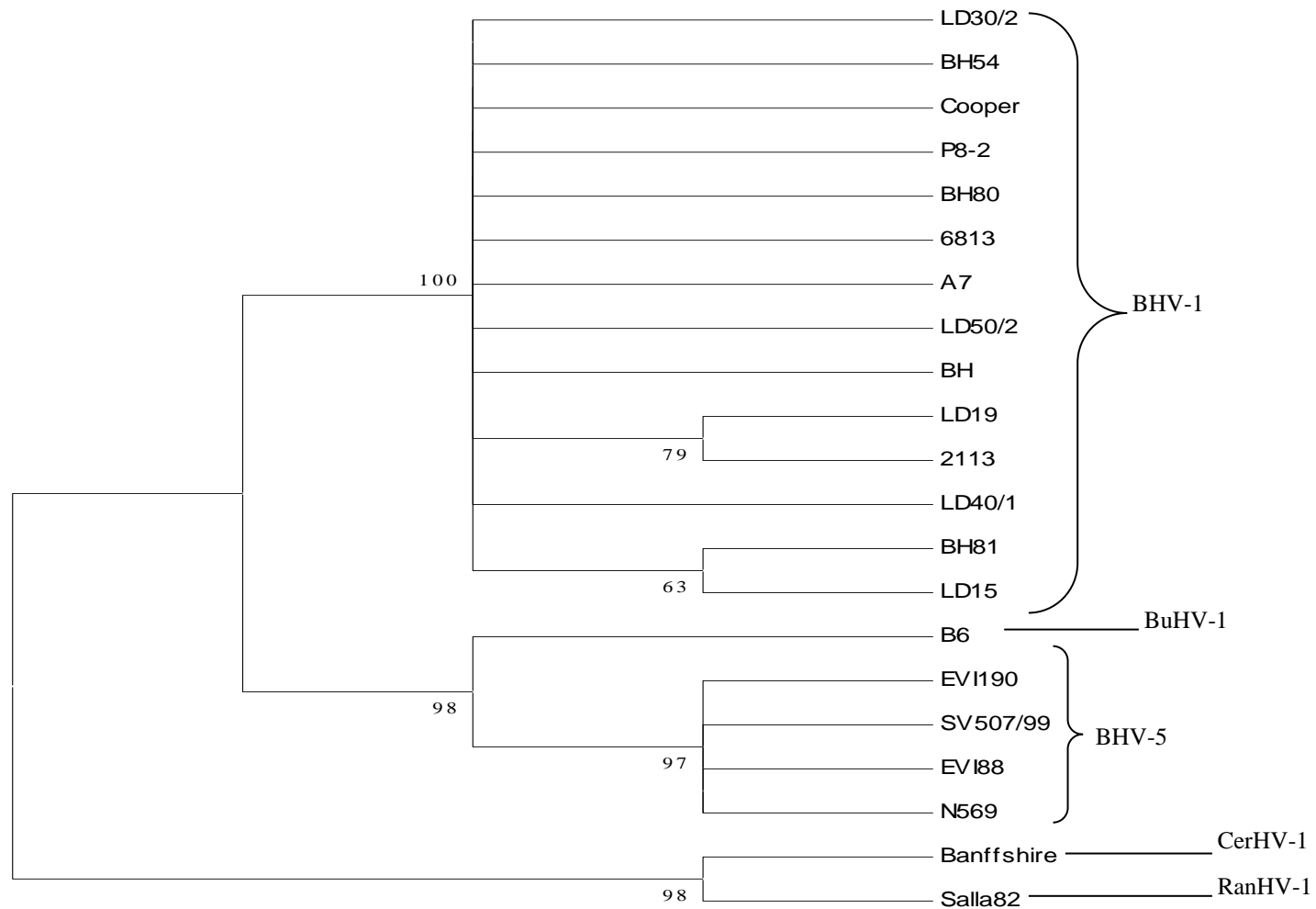
## 9.8 Análise filogenética

A FIGURA 14 mostra a árvore filogenética construída com as seqüências de nt das amostras de BHV-1 e BHV-5 analisadas neste trabalho com as amostras de BHV-1 (Cooper, K22, P8-2), BHV-5 (N569 e SV507/99), BuHV-1 (B6), CerHV-1 (Banffshire 82) e RanHV-1 (Salla 82) depositadas no GenBank, pelo método de neighbor-joining, com o programa MEGA 3.

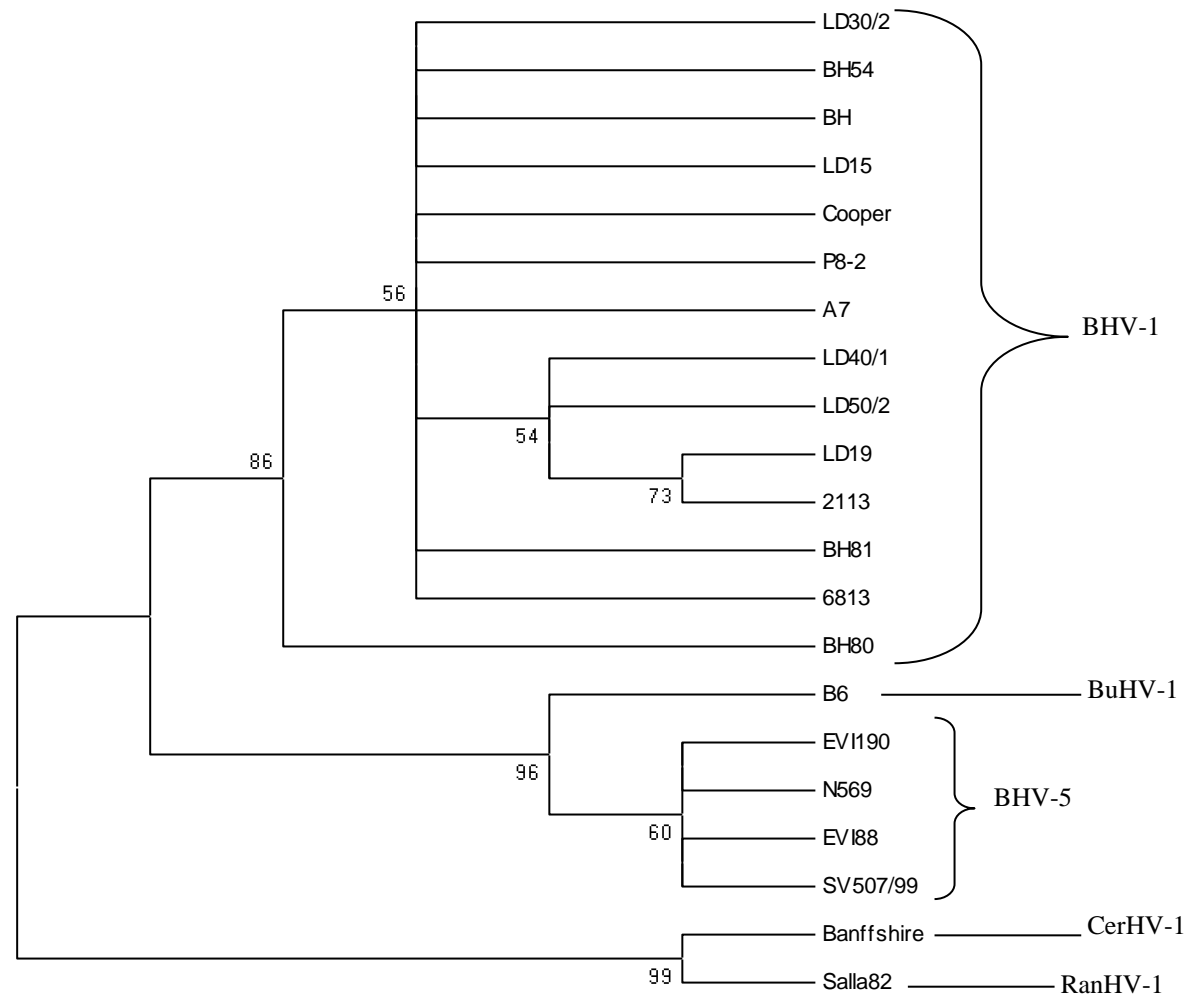
A FIGURA 15 mostra a árvore filogenética construída com as seqüências de aa das amostras de BHV-1 e BHV5 analisadas neste trabalho com as amostras de BHV-1 (Cooper e P8-2), BHV-5 (N569 e SV507/99), BuHV-1 (B6), CerHV-1 (Banffshire 82), e RanHV-1 (Salla 82) depositadas no GenBank, pelo método de neighbor-joining, com o programa MEGA 3.

A árvore construída com base nas seqüências de nt apresentou a mesma topologia que a árvore construída com base nas seqüências de aa (FIGURAS 17 e 18). Em ambas as árvores as amostras IBR 2113, IBR 6813, LD 15, LD 19, LD 30/2, LD 40/1, LD 50/2, BH 53, BH 54, BH 80, BH81 e A7 ficaram no mesmo cluster das amostras de BHV-1, apresentando-se mais afastadas das amostras de BHV-5. Observa-se ainda na árvore construída com a seqüência de nt que este cluster apresentou duas subdivisões onde ficaram alocadas amostras LD 19, IBR 2113 e LD15 e BH81. Já na árvore construída com a seqüência de aa observou-se que as amostras LD 19 e IBR 2113 continuaram alocadas na mesma subdivisão enquanto as amostras LD 15 e BH 81 não estavam mais em uma subdivisão e são entre as outras amostras de BHV-1.

As amostras EVI-190 e EVI-88 ficaram no mesmo ramo das amostras de BHV-5 nas duas árvores construídas. Estas amostras e as amostras N569 e SV507 ficaram mais próximas da amostra de vírus de búfalo do que das amostras de BHV-1, seguida das amostras de CerHV-1 e RanHV-1. Estas duas amostras ficaram em grupos separados.



**FIGURA 12:** Árvore filogenética consenso(cladograma) dos herpesvírus **BHV-1**, **BHV-5**, **BuHV-1**, **Cer-HV-1** e **RanHV-1**, com base na seqüência de nt de parte do gene que codifica para a gB. A árvore foi reconstruída pelo método de Neighbor-joining usando o modelo de substituição de nucleotídeos de Tamura-3parâmetros, implementados no programa MEGA3. A árvore está enraizada no ponto central e os valores de “bootstrap” acima de 50% são mostrados.



**FIGURA 13: Árvore filogenética consenso(cladograma) dos herpesvírus BHV-1, BHV-5, BuHV-1, Cer-HV-1 e RanHV-1, com base na seqüência de aa de parte do gene que codifica para a gB.** A árvore foi reconstruída pelo método de Neighbor-joining usando o modelo de substituição de aminoácidos de Poisson, implementados no programa MEGA3. A árvore está enraizada no ponto central e os valores de “bootstrap” acima de 50% são mostrados.

## **10. DISCUSSÃO**

## 10. Discussão

Nos estudos das amostras de BHV-1 e 5, um primeiro critério analisado foi o comportamento das amostras em cultivo celular, já que na literatura, o tempo que as amostras de BHV levam para provocar 90 a 100% de ECP varia. Apesar de ter sido inoculada a mesma dose (100 TCID<sub>50</sub>) de todas as amostras virais, foi observado que o efeito citopático (ECP) das amostras 1218, EVI-190 e EVI-88 foi mais lento do que os provocados pelos demais vírus, onde 90% de ECP foi observado em 72 horas. Vários estudos em cultivo celular utilizando-se células de rim bovino têm sido descritos onde foi observado o comportamento do BHV-1 e do BHV-5. SAMPAIO *et al.* (1981) estudando amostras respiratórias e genitais de BHV-1 observaram que o ECP tornava-se aparente após 24-30 horas da inoculação e após 72-96 horas, todas as células encontravam-se completamente lisadas. Amostras originárias de animais com comprometimento nervoso pelo BHV-5, foram estudadas por FRENCH (1962a) e GARDNER & NAIRN (1964) e, estes autores observaram o ECP completo em células de rim bovino em 48 horas após inoculação. No entanto, SCHUDEL *et al.* (1986) comparando amostras de BHV-1 e amostras que foram isoladas de casos de encefalite na Argentina, observaram que o crescimento destas amostras em células MDBK foi mais lento e sugeriram que isto ocorreu provavelmente devido ao baixo grau de adaptação destas amostras nesta linhagem de célula. As amostras 1218, EVI-190 e EVI-88 já haviam sido classificadas através de seu perfil de restrição como BHV-5 (OLIVEIRA, 2001) e assim como as amostras isoladas de casos de encefalite por SCHUDEL *et al.* (1986) tiveram crescimento mais lento em células MDBK. O BHV-1 infecta células do sistema respiratório e do sistema genital, que são células epiteliais, já o BHV-5 infecta neurônios, e isto pode explicar a maior adaptação do BHV-1 nas células MDBK que também são células epiteliais.

As características do ECP para a maioria das amostras analisadas foram semelhantes às aquelas descritas por MADIN *et al.* (1956), MUELLER *et al.* (1979), SAMPAIO *et al.* (1981), ENGELS *et al.* (1983) e SCHUDEL *et al.* (1986). A maioria dos autores descreveram o ECP de BHV-5 como idêntico a aquele encontrado em BHV-1 (FRENCH, 1962a; BARTHA *et al.*, 1969). SEAL & WHETSTONE (1994) observaram que as células MDBK tratadas com ciclohexamida e inoculadas com amostras de BHV-1.1 e BHV-1.2 apresentavam-se alongadas e finas, enquanto as amostras de BHV-5 induziam a formação de sincícios. No entanto, estes

autores afirmam que a replicação do vírus sem a presença de um inibidor metabólico segue o padrão típico do BHV-1, e que, embora o BHV-5 produza lesões cerebrais não foram observadas diferenças significativas no ECP entre os isolados respiratórios e encefálicos. Nos nossos achados, pudemos observar que as amostras 1218, EVI-190 e EVI-88 tiveram ECP diferente daquele observado para as demais amostras estudadas neste trabalho, uma vez que as células rapidamente diminuía de tamanho formando aglomerados.

Em geral, a extração com fenol:clorofórmio tem sido usada para a obtenção de ácidos nucléicos de células e microorganismos (SAMBROOK *et al.*, 1989). Esta extração leva um período de tempo relativamente longo, é mais caro e envolve o uso de reagentes químicos tóxicos, mas produz um resultado consistente (BUDOWLE & BAECHEL, 1990). Outra metodologia bastante usada para extração de DNA é a que utiliza Chelex-100, esta técnica é simples, rápida, não envolve o uso de solventes orgânicos tóxicos e é realizada em poucas etapas quando comparada com a extração de fenol:clorofórmio (WALSH *et al.*, 1991). A extração de ácidos nucléicos usando NaOH foi descrita para a preparação de DNA humano de células bucais para uso em reações de PCR (RICHARDS *et al.*, 1993) e estes autores demonstraram que este método é rápido, eficiente, fácil e barato para o isolamento de DNA viral de amostras clínicas.

No nosso trabalho, testamos estas três metodologias de extração de DNA para sabermos qual seria adotada para nossos experimentos. Após a otimização destas metodologias observou-se que todas foram eficientes, permitindo a obtenção de DNA em quantidades satisfatórias para o uso na PCR. O uso da extração com fenol:clorofórmio foi descartado, uma vez que dos três métodos testados ele foi o mais demorado, o mais caro além de se utilizar reagentes tóxicos. A extração com NaOH assim como a com Chelex-100 é rápida e fácil, mas o método do NaOH se apresentou mais barato. Assim, como o resultado da PCR utilizando o DNA obtido a partir destes dois métodos foi similar, a extração escolhida para nossos experimentos foi aquela em que se utiliza o NaOH. A extração do DNA utilizando-se a metodologia do NaOH foi primeiramente descrita para a obtenção do DNA a partir de amostras clínicas obtidas através de swab bucal. No entanto, nesse experimento a extração com NaOH foi utilizada tanto em amostras clínicas provenientes de feto como em isolados de cultivo celular obtendo-se um bom resultado em ambas extrações. GARCIA-CLOSAS *et al.* (2001) testaram três

metodologias de extração de DNA de células bucais: fenol:clorofórmio, NaOH e QIAamp blood kit e descreveram que o rendimento de DNA obtido na extração com o QIAamp blood kit e com NaOH foi inferior àquele obtido na extração com fenol:clorofórmio. Além disto estes autores tiveram dificuldades na amplificação por PCR do o DNA extraído com NaOH. Por outro lado, RICHARDS *et al.* (1993) e WALKER *et al.* (1999) demonstraram em seus experimentos uma alta taxa de sucesso para os testes de PCR e PCR multiplex, respectivamente, usando DNA extraído com NaOH.

O BHV-1 está amplamente disseminado em todo Brasil (MÉDICI *et al.*, 2000a, ROCHA *et al.*, 2001; VIEIRA *et al.*, 2003), contudo dados sobre a distribuição geográfica do BHV-5 são raros (PETZHOLD *et al.*, 2001). Isto provavelmente se deve à indisponibilidade de métodos de diagnóstico capazes de diferenciar as infecções causadas por BHV-1 e BHV-5 com rapidez necessária para a execução de estudos epidemiológicos (ROEHE, 1997). O diagnóstico das infecções causadas por herpesvírus é feito pelo isolamento do vírus em cultivo, no entanto esta técnica é trabalhosa e pode não ser sensível para detectar um pequeno número de partículas virais (BIELANSKI *et al.*, 1988). A alternativa tem sido a amplificação do DNA do herpesvírus bovino através da PCR tanto de amostras isoladas em cultivo celular quanto de amostras clínicas. SANTURDE *et al.* (1996) demonstraram a amplificação de um fragmento de DNA de BHV-1 de amostras clínicas incluindo sêmen onde os OI foram determinados com base no gene que codifica para a gB. ROS *et al.* (1999) desenvolveram um PCR onde os OI foram determinados com base no gene que codifica para a glicoproteína C onde conseguiram diferenciar amostras de BHV-1, BHV-5, CapHV-1, CerHV-1 e RanHV-1. MOORE *et al.* (2000) descreveram um PCR baseados no gene que codifica para timidina quinase e conseguiram diferenciar herpesvírus de bovino, de equino e de suíno.

Como os OI foram construídos a partir da análise da seqüência de DNA do gene que codifica para a glicoproteína B do BHV-1, da amostra padrão Cooper, tentamos amplificar esta amostra com todos os pares de OI. Das treze combinações de OI testadas, observou-se a amplificação utilizando-se seis combinações. Estas amplificações obtidas da amostra Cooper demonstram a viabilidade destes OI, mesmo que estas amplificações não tenham sido observadas nas amostras analisadas em nosso experimento. Podemos sugerir que existem diferenças entre as seqüências de DNA das amostras estudadas e a seqüência da amostra

Cooper, o que impossibilitou o pareamento correto destes OI. As outras combinações de OI que não amplificaram nossas amostras e também não amplificaram a amostra Cooper em nenhuma das condições testadas. Todos os pares de OI determinados em nosso trabalho foram analisados antes da sua síntese, e estes só pareavam com as suas regiões específicas no genoma do BHV-1 e mesmo com todas as variações testadas da reação de PCR, como temperatura e tempo dos ciclos, apenas a amplificação com o par de OI LVC 120 e 121 foi possível. Desta forma os outros OI submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida, onde foi constatada a sua integridade. VILCEK *et al.* (1995) afirmaram que cada amplificação de DNA precisa ser otimizada com a seleção apropriada de OI e com a determinação das condições ótimas de cada reação e que nem todos os pares de OI são adequados para a PCR, e no caso dos herpesvírus isto pode ocorrer porque seu genoma contém regiões ricas em G+C.

Utilizando-se este par de OI LVC 120 e 121 obteve-se a amplificação do fragmento esperado de para todos os isolados analisados, com exceção da amostra 1218. O DNA de todas as amostras clínicas foram obtidos utilizando-se o método do NaOH e somente a amostra A7 foi amplificada pelo para de OI 120 e 121, sendo amplificado o fragmento esperado de 781 pb. Dentre os fatores que podem ter levado a não amplificação do fragmento do gene que codifica para gB, podemos citar em primeiro lugar que estas amostras clínicas eram provenientes de fetos abortados supostamente causados por uma infecção por BHV. No caso destas amostras estarem positivas para BHV, fatores tais como, mudança no local de pareamento dos OI, presença de possíveis inibidores da reação de PCR ou mesmo uma baixa carga viral nas amostras clínicas poderiam explicar a não amplificação deste gene.

A amplificação do fragmento de DNA do gene que codifica para gB utilizando o par de OI LVC 120 e 121 da amostra 1218 foi possível somente quando a temperatura de pareamento usada foi de 40°C, e como resultado obtivemos um fragmento de aproximadamente 100 pb menor do que o esperado. Várias tentativas de sequenciamento deste fragmento foram realizadas, sem, no entanto obtenção de êxito. OLIVEIRA (2001) analisando esta amostra, isolada de feto abortado, observou características peculiares. A princípio esta amostra foi classificada como BHV-1 pela sua sorologia e pelo fato de ter sido obtida de um feto abortado, uma vez que a maioria dos casos de aborto encontrados na literatura são classificados como BHV-1 (MILLER *et al.*, 1991). Posteriormente, através da análise do

perfil de restrição, este autor classificou esta amostra como BHV-5, uma vez que esta teve o mesmo padrão de restrição que as amostras de BHV-5 estudadas por ENGELS *et al.* (1987), BULACH & STUDDERT (1990), SEAL & WHETSTONE (1994), PIDONE *et al.* (1999) e ROELS *et al.* (2000). Podemos supor que a seqüência do gene que codifica para a gB de 1218 seja mais variável, apresentando os sítios de ligação dos OI modificados, uma vez que a amplificação só foi possível a uma baixa temperatura de pareamento, além do fato do tamanho deste fragmento ter sido menor.

Um dos problemas dos estudos epidemiológicos dos herpesvírus bovinos 1 e 5 diz respeito ao a ausência de uma metodologia que permita o diagnóstico e a diferenciação destes vírus com a rapidez necessária para tais estudos. A PCR vem sendo proposta como ferramenta para tal, contudo, uma das desvantagens do uso da PCR para a diferenciação dos herpesvírus é o fato destes vírus poderem gerar fragmentos de mesmo tamanho devido a sua similaridade genética. Este problema pode ser resolvido com a associação da PCR com outras técnicas, como a digestão dos fragmentos amplificados com enzimas de restrição (ROS *et al.*, 1999). Dessa forma buscamos a padronização de uma PCR-RFLP para a detecção e diferenciação entre BHV 1 e 5. O par de OI LVC 120 e 121 usados na PCR, embora baseados na seqüência do BHV-1, provaram ser igualmente eficientes para amplificação do DNA do BHV-5 e o fragmento gerado foi de mesmo tamanho para os dois vírus, não permitindo a diferenciação entre estas amostras, exceto pela amostra 1218. Para diferenciar as amostras de BHV-1 e 5, os fragmentos amplificados foram digeridos com a enzima de restrição *Sma* I que foi escolhida com base na seqüência das amostras Cooper (padrão de BHV-1) e N569 (padrão de BHV-5). Utilizando-se estas enzimas os isolados de BHV-1 e 5 puderam ser diferenciados, e embora o fragmento da amostra 1218 ser menor este não apresentou sítio para *Sma* I, como as demais amostras de BHV-5. Estes resultados corroboraram com os resultados da análise do perfil de restrição do DNA total destas amostras realizados no Laboratório de Virologia Comparada onde estas amostras foram previamente classificadas em BHV-1 e 5 e também com os dados do sequenciamento destes fragmentos neste trabalho (OLIVEIRA, 2001; dados não publicados). O fragmento da amostra clínica A7 também foi digerido e apresentou o mesmo perfil das amostras de BHV-1, sendo confirmado pelo sequenciamento. LYAKU *et al.* (1996) selecionaram dois OI com base na seqüência do gene que codifica para gB para a detecção de grupos de herpesvírus de ruminantes e a diferenciação foi realizada utilizando-se quatro

enzima de restrição. Estes pesquisadores compararam a sensibilidade e especificidade do PCR com o isolamento viral ambas em conjunto com a digestão com enzimas de restrição e afirmaram que o PCR em conjunto com a digestão pode ser uma prática alternativa para uma alternativa rápida de identificação e diferenciação e pode ser tornar a primeira escolha de diagnóstico de rotina para os herpesvírus relacionados. ROS & BELÁK (1999) utilizando OI também determinados com base na seqüência do gene que codifica para gB conseguiram diferenciar amostras de herpesvírus bovino 1 e 5, herpesvírus de caprino, herpesvírus de cervídeo e herpesvírus de rangiferino através da digestão dos produtos de PCR com duas enzimas de restrição sendo usadas simultaneamente. De GUILI *et al.* (2002) diferenciaram amostras de BHV-1, BHV-2 e BHV-4 diretamente de amostras clínicas utilizando PCR seguido por digestão com enzimas de restrição e afirmaram que esta pode ser uma boa ferramenta de diagnóstico.

Em geral os métodos de extração de DNA requerem uma grande quantidade de vírus multiplicados em cultura de células, já se utilizando o NaOH, basta uma monocamada de células infectadas para a obtenção de DNA viral em quantidades e qualidades satisfatórias para uso em PCR. O uso em conjunto da obtenção do DNA com NaOH e a PCR seguida pela digestão com *Sma* I demonstrou ser uma boa ferramenta para uma rápida diferenciação e diagnóstico entre as amostras de BHV-1 e 5. Uma maior amostragem de amostras clínicas deverá ser investigada para se ver a viabilidade do uso da técnica de obtenção do DNA com NaOH permitindo um diagnóstico direto das amostras clínicas com uma maior rapidez.

Após o sequenciamento e análise das amostras foi observado que a porcentagem de G+C obtida da análise de nucleotídeos do fragmento seqüenciado do gene que codifica para a gB das amostras BHV-1 e BHV-5 apresentou um valor próximo à média do teor de G+C observada no genoma de BHV-1 (72%) e BHV-5 (75%) (McGEOCH & DAVISON, 1999; DELHON *et al.*, 2003). Esta pequena diferença se deve provavelmente, ao fato do fragmento seqüenciado ser pequeno para ser representativo de todo genoma.

Como já esperado, as amostras isoladas de quadros clínicos típicos de BHV-1 e 5, em concordância com a diferenciação obtida pela PCR/RFLP, apresentaram elevados valores de similaridade de nt e aa quando comparadas com amostras de BHV-1 e 5 respectivamente. O

que chama atenção na análise da seqüência de nt e aa são as altas similaridades observadas entre as amostras de BHV-5 e a amostra de herpesvírus de búfalo (B6) quando comparadas com amostras de BHV-1. Este mesmo resultado foi observado por ROS & BELÁK (2002), que sequenciaram todo o gene que codifica para a gB, e relataram que o gene que codifica para a gB das amostras de BHV-5 e BuHV-1 são praticamente idênticas.

FUTUYMA, 1997 afirmou que a ocorrência das substituições do tipo transição nas seqüências de nt é um fenômeno mais freqüente do que as transversões, o que corrobora com nossos resultados onde observamos que um maior número de substituições de nt do tipo transição, sendo que estas substituições na maioria das vezes não provocaram mudança no aa.

Analisando as seqüências de aa inferidas e nenhuma delas apresentou códon de terminação neste fragmento da gB. Todos os resíduos de cisteína observados nas seqüências de aminoácidos das amostras de BHV-1 e 5 são conservados. Esta conservação é notada em todas as amostras comparadas, tanto de BHV-1 quanto de BHV-5. Este fato é bastante importante, pois resíduos de cisteína formam pontes dissulfeto, tendo importante papel na estrutura secundária e conseqüentemente na função das proteínas (STRAYER, 1996).

Algumas mudanças de aa foram conservativas ou foram comuns aos aa encontrados em outras amostras de herpesvírus bovino. A amostra BH54, que apresentou um número maior de mudanças de aa em relação às demais amostras de BHV, apresentou pequenas diferenças no perfil hidropático da proteína. As maiores alterações neste perfil ocorreram devido à troca dos aa G, E e R por E, K e Q, que possuem diferenças quanto a polaridade e carga, aumentando a hidrofobicidade desta região, que provavelmente é uma porção exposta na superfície viral devido ao seu caráter. As demais amostras de BHV 1 e 5 apresentaram perfis muito similares aos perfis das amostras Cooper e N569, respectivamente, dessa forma podemos sugerir que esta região da gB nestas amostras estaria funcional. ROS & BELÁK (1999; 2002) analisaram a gB de amostras de BHV-1, BHV-5, BuHV-1 (herpesvírus de búfalo), CerHVI-1 (herpesvírus de cervídeo), RanHV-1 (herpesvírus de rangiferino) e CapHV-1 (herpesvírus de caprino) e observaram que apesar da variabilidade encontrada, existe uma notável conservação do gene, sugerindo que a função biológica desta é a mesma nos vírus estudados. Nos nossos estudos, foi observado um grau de conservação significativo entre as seqüências

de aminoácidos das amostras brasileiras de BHV com as de outros herpesvírus de ruminantes o que reforça esta proposição.

A estimativa exata da relação evolucionária entre vírus, em particular entre aqueles que apresentam DNAs grandes e estáveis, pode ser feita através da análise do genoma completo ou de genes individuais. Neste sentido, a gB tem surgido como o gene mais estudado para analisar a distância genética entre os herpesvírus porque além de ser a maior glicoproteína é conservada entre os alfa herpesvírus (ROS & BELÁK, 2002). LYAKU *et al.* (1992) baseados em estudos sorológicos, demonstraram que amostras de herpesvírus de CerHV-1, CapHV-1 e RanHV-1 apresentam uma maior proximidade com amostras de BHV-1 do que entre elas. ROS & BELÁK (2002) analisando o gene que codifica para gB relataram que a amostra de RanHV-1 está mais próxima à amostra de CerHV-1 do que das amostras de BHV-1 e BHV-5.

A análise filogenética das amostras brasileiras de BHV, baseadas no gene que codifica para a gB mostrou a proximidade entre as amostras de herpesvírus de bovino com as amostras de herpesvírus de búfalo, rangiferino e cervídeo. As amostras de BHV-1 foram agrupadas num grande “cluster” formado apenas por amostras de BHV-1, confirmando mais uma vez, os resultados obtidos pela PCR/RFLP. Nas árvores feitas com base nas seqüências de nt e aa, as amostras LD 19 e IBR 2113 mostraram-se mais próximas em uma subdivisão do cluster. Estas amostras foram isoladas a partir de um swab vaginal de animais com suspeita de vulvovaginite, no Estado de Minas Gerais, sendo previamente classificados como BHV-1.2. Embora, esta análise tenha sido feita com base em parte do gene que codifica para a gB, a maior proximidade destas amostras está coerente com a sua prévia classificação em BHV1.2.

Os isolados EVI-190 e EVI-88 foram previamente classificados através do perfil de restrição do DNA total como BHV-5. A análise filogenética mostra que estas amostras foram agrupadas junto com as demais amostras de BHV-5 e este resultado confirma aquele encontrado na PCR seguida de digestão com enzima de restrição do fragmento amplificado destas amostras.

Nos experimentos de sorologia, o BHV-5 e o BuHV-1 são idênticos ao BHV-1 (St. GEORGE & PHILPOTT, 1972; ENGELS *et al.*, 1981; BRATANICH *et al.*, 1991), as nossas análises

demonstram que as amostras de BHV-5 e de BuHV-1 estão mais relacionadas entre si do que com as amostras de BHV-1. Este mesmo resultado foi obtido por ROS & BELÁK (2002) e estes autores relataram que para se esclarecer a origem das infecções de BHV-5, seria necessário verificar se a infecção com BuHV-1 é capaz de gerar distúrbios neurológicos em bovinos.

Neste trabalho, foram estudadas amostras de BHV isoladas de animais com diferentes manifestações clínicas e a seqüência de parte do gene que codifica para a glicoproteína B apresentou algumas diferenças na seqüência de DNA destes vírus. SILVA *et al.* (2000) afirmaram que diferentes manifestações clínicas resultantes das infecções por BHV-1 e a existência de diferentes subtipos deste vírus, levantam a possibilidade de que existem variações em seu genoma, responsáveis por diferentes graus de virulência. Estes autores sequenciaram parte do gene que codifica para a gB de 19 amostras de BHV-1 e 2 de BHV-5 e concluíram que mesmo sendo possível que exista uma variabilidade no genoma vírico, não é possível estabelecer o grau de alteração resultante da troca de aminoácidos quando somente uma parte do genoma da gB é seqüenciada.

Desta forma, podemos observar que o uso em conjunto da obtenção do DNA pela metodologia que utiliza o NaOH e a PCR/RFLP foi uma eficiente ferramenta para uma rápida diferenciação entre as amostras de BHV-1 e 5. Os resultados da diferenciação pela PCR/RFLP estão de acordo com aqueles encontrados no sequenciamento das amostras brasileiras estudadas, sugerindo o seu uso no diagnóstico direto de amostras clínicas.

## **11. CONCLUSÕES**

## 11. Conclusões

- Foram encontradas diferenças no efeito citopático entre as amostras de BHV-1 e BHV-5 infectadas em células MDBK.
- Após a otimização de metodologias de extração de DNA viral a escolhida para uso em nossos experimentos foi aquela em que se utiliza o NaOH, sendo a que apresentou um custo menor, foi a mais rápida e eficiente.
- Os OI LVC 120 e LVC 121 usados na PCR para amplificação de parte do gene que codifica para a gB, embora baseados na seqüência do BHV-1, provaram ser igualmente eficientes para amplificação do DNA do BHV-1 e 5.
- O uso em conjunto da extração do DNA com NaOH e a PCR/RFLP foi ferramenta para uma rápida diferenciação entre as amostras de BHV-1 e 5, sugerindo o seu uso no diagnóstico direto de amostras clínicas.
- Foi observado uma conservação significativa entre as seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos de parte do gene que codifica para a gB das amostras brasileiras analisadas neste trabalho com as e outros vírus da família *Herpesviridae*.
- A análise filogenética confirmou a proximidade entre as amostras analisadas neste estudo com as amostras de herpesvírus de bovino, búfalo, rangiferino e cervídeo.

## **12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELMAGIB, O.Y., MINOCHA, H.C., COLLINS, J.K., CHOWDHURY, S.I. Fine mapping of bovine Herpesvirus-1 (BHV-1) glycoprotein D (gD) neutralizing epitopes by type-specific monoclonal antibodies and sequence comparison with BHV-5 gD. *Virology*, v. 206, p. 242-253, 1995.

ACKERMANN, M., ENGELS, M., FRAEFEL, C., METZLER, A., SCHWYZER, M., SUTER, M., TOBLER, K. Herpesviruses: balance in power and powers imbalanced. *Veterinary Microbiology*, v. 86, p. 175-81, 2002.

AKADA, R. Quick-Check method to test the size of *Escherichia coli* plasmids. *Biotechniques*, v. 17, p. 58, 1994.

ALEGRE, M., NANNI, M., FONDEVILA, N. Development of a multiplex polymerase chain reaction for the differentiation of bovine herpesvirus-1 and -5. *Journal of Veterinary Medicine B*, v. 48, p. 613-621, 2001.

ALICE, F.J. Isolamento do vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) no Brasil. *Revista Brasileira de Biologia*, v. 38, p. 919-920, 1978.

ALTSCHUL, S.F., MADDEN, T.L., SCHAFFER, A.A., ZHANG, J. ZHANG, Z., MILLER, W., LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, v. 25, p. 3389-3402, 1997.

ANUNCIÇÃO, A.V.M, LEITE, C.R., MOREIRA, C.E., REIS, R., LOBATO, P.I.Z. Presença de anticorpos para o Herpesvírus bovino 1 (HBV1) em bovinos nos Estados de Minas Gerais, Goiás, e Rio de Janeiro através da prova de hemoaglutinação passiva. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 41, p. 433-441, 1989.

ASHBAUGH, S.E., THOMPSON, K.E., BELKNAP, E.B., SCHULTHEISS, P.C., CHOWDHURY, S., COLLINS, J.K. Specific detection of shedding and latency of bovine

herpesvirus 1 and 5 using a nested polymerase chain reaction. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 9, p. 387-394, 1997.

AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KIGSTON, R.; MOORE, D.; SEIDMAN, J.G., SMITH, J.; STRUHL, K. *Current Protocols in Molecular Biology*, 1. ed. Vol.1. Current Protocols Press, USA, 1994.

BABIUK, L.A., L'ITALIEN, J., VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S., ZAMB, T., LAWMAN, J.P., HUGHES, G., GIFFORD, G.A. Protection of cattle from bovine herpesvirus type I (BHV-1) infection by immunization with individual viral glycoproteins. *Virology*, v. 159, p. 57-66, 1987.

BARANOWSKI, E., DUBUISSON, J., van DRUNEN LITTLE-van den HURK, S., BABIUK, A. L., MICHEL, A., PASTORET, P.P., THIRY, E. Synthesis and processing of bovine Herpesvirus-1 glycoprotein H. *Virology*, v. 206, p. 651-654, 1995.

BARTHA, A., HAJDU, G., ALDASY, P., PACZOLAY, G. Occurrence of encephalitis caused by infectious bovine rhinotracheitis virus in calves in Hungary. *Acta Veterinaria Hungarica*, v. 19, p. 145-151, 1969.

BELKNAP, E.B., COLLINS, J.K., AYERS, V.K., SCHULTHEISS, P.C. Experimental infection of neonatal calves with neurovirulent bovine herpesvirus type 1.3. *Veterinary Pathology*, v. 31, p. 358-365, 1994.

BEN-PORAT, T., TOKAZEWSKI, S.A. Replication of herpesvirus DNA. II. Sedimentation characteristics of newly synthesized DNA. *Virology*, v. 79, p. 292-301, 1977.

BIELANSKI, A., LOEWEN, K.G., HARE, W.C.D. Inactivation of bovine herpesvirus-1 form *in vitro* infected bovine semen. *Theriogenology*, v. 30, p. 649-657, 1988.

BIRNBOIN, H.A. A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods in Enzymology*, v. 100, p. 243-255, 1983.

BLEWETT, E.L. & MISRA, V. Cleavage of the bovine herpesvirus glycoprotein B is not essential for its function. *Journal of General Virology*, v, 72, p. 2083-90, 1991.

BRAKE, F. & STUDDERT, M.J. Molecular epidemiology and pathogenesis of ruminant herpesviruses including bovine, buffalo and caprine herpesvirus 1 and bovine encephalitis herpesvirus. *Australian Veterinary Journal*, v. 62, p. 331-334, 1985.

BRATANICH, A.C., SARDI, S.I., SMITSAART, E.N., SCHUDEL, A.A. Comparative studies of BHV-1 variants by in vivo – in vitro tests. *Journal of Veterinary Medicine Bull*, v. 38, p. 41-48, 1991.

BROWN, F. The classification and nomenclature of viruses: summary of results of meetings of the international committee on taxonomy of viruses in Edmonton, Canada 1987. *Intervirology*, v. 30, p. 181-186, 1989.

BUDOWLE, B. & BAECHEL, F.S. Modifications to improve the effectiveness of restriction fragment length polymorphism typing. *Applied and Theoretical Electrophoresis*, v. 1, p. 181-187, 1990.

BULACH, D.M. & STUDDERT, M.J. Comparative genome mapping of bovine encephalitis herpesvirus, bovine herpesvirus 1 and buffalo herpesvirus. *Archives of Virology*, v. 13, p. 17-34, 1990.

CARRILLO, B.J., AMBROGI, A. SCHUDEL, A.A., VAZQUEZ, M. DAHME E. POSPISCHIL, A. Meningoencephalitis caused by IBR virus in calves in Argentina. *Zentralblatt. Veterinary Medicine B.*, v. 30, p. 327-332, 1983.

CASCIO, K.E., BELKNAP, E.B., SCHULTHEISS, P.C., AMES, A.D., COLLINS, J.K. Encephalitis induced by bovine herpesvirus 5 and protection by prior vaccination or infection with bovine herpesvirus 1. *Journal Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 11, p. 134-139, 1999.

CASELLI, E., BONI, M., DI LUCA, D., SALVATORI, D., VITA, A., CASSAI, E. A combined bovine herpesvirus 1 gB-gD DNA vaccine induces immune response in mice. *Comparative Immunology Microbiology & Infectious Diseases*, v. 28, p. 155-166, 2005.

CASTRUCCI, G., FRIGERI, F., SALVATORI, D., FERRARI, M., SARDONINI, Q. CASSAI, E, LO, D.M., ROTOLA, A., ANGELINI, R. Vaccination of calves against bovine herpesvirus 1 assessment of the protective value of eight vaccines. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Disease*, v. 25, p. 29-41, 2002.

CHASE, C.C.L. & LETCHWORTH III, G.J. Bovine herpesvirus 1 gIV - expressing cells resist virus penetration. *General Virology*, v. 75, p. 177-181, 1994.

CHOWDHURY, S.I. Molecular basis of antigenic variation between the glycoprotein C of respiratory bovine herpesvirus 1 (BHV-1) and neurovirulent (BHV-5). *Virology*, v. 213, p: 558-568, 1995.

CHOWDHURY, S.I., LEE, B.J., OZKUL, A., WEISS, M.L. Bovine herpesvirus 5 glycoprotein E is important for neuroinvasiveness and neurovirulence in the olfactory pathway of the rabbit. *Journal of Virology*, v. 74, p. 2094-2106, 2000.

COLLINS, J.K., AYERS, V.K., WHETSTONE, C.A., VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S. Antigenic differences between the major glycoproteins of bovine herpesvirus type 1.1 and bovine herpesvirus type 1.3. *Journal of General Virology*, v. 74, p. 1509-1517, 1993.

CORPET, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Research*, v. 16, p. 10881-10890, 1988.

D'ARCE, R.C.F., ALMEIDA, R.S., SILVA, T.C., FRANCO, A.C., SPÍLKI, F., ROEHE, P.M., ARNS, C.W. Restriction endonuclease and monoclonal antibody analysis of Brazilian isolates of bovine herpesvirus types 1 and 5. *Veterinary Microbiology*, v. 88, p. 315-324, 2002.

De GIULI, L., MAGNINO, S., VIGO, P.G., LABALESTRA, I., FABBI, M. Development of a polymerase chain reaction and restriction typing assay for the diagnosis of bovine herpesvirus 1, bovine herpesvirus 2, and bovine herpesvirus 4 infections. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 14, p. 353-356, 2002.

DELHON, G., MORAES, M.P., LU, Z., AFONSO, C.L., FLORES, E.F., WEIBLEN, R., KUTISH, G.F., ROCK, D.L. Genome of bovine herpesvirus 5. *Journal of Virology*, v. 77, p. 10339-10347, 2003.

DIAS, L.E., MAISONAVE, J., GUR\ARINO, H., PAULLIER, C., PERDOMO, E., FIGARES, A., IZAGUIRRE, R. Rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR). Descripción de um cuadro clínico en terneros de tambo. *Anais do III Congresso Nacional de Veterinária, Uruguai*, p. 521-531, 1982.

DULBECCO, R & VOGT, M. Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. *Journal of Experimental Medicine*, v. 99, p. 167-182, 1954.

EDWARDS, S. Changing trends in infectious bovine rhinotracheitis in Great Britain. *Veterinary Records*, v. 123, p. 614-618, 1988.

ENDSLEY, J.J., QUADE, M.J., TERHAAR, B., ROTH, J.A. BHV-1-Specific CD4+, CD8+, and gammadelta T cells in calves vaccinated with one dose of a modified live BHV-1 vaccine. *Viral Immunology*, v. 15, p. 385-393, 2002.

ENGELS, M., STECK, F., WYLER, R. Comparison of the genomes of infectious bovine rhinotracheitis and infectious pustular vulvovaginitis virus strains by restriction endonuclease analysis. *Archive of Virology*, v. 67, p. 169-174, 1981.

ENGELS, M., GELDERBLOM, H., DARAI, G. LUDWIG, H. Goats herpesviruses: biological and physicochemical properties. *Journal of General Virology*, v. 64, v. 2237-2247, 1983.

ENGELS, M., GIULIANI, C., WILD, P., BECK, T.M., LOEPFE, E., WYLER, R. The genome of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) strains exhibiting a neuropathogenic potential compared to known BHV-1 strains by restriction site mapping and cross-hybridization. *Virus Research*, v. 6, p. 57-73, 1987.

ENGELHARDT, T. & KEIL, G.M., Identification and characterization of the bovine herpesvirus 5 US4 gene and gene products. *Virology*, v. 225, p. 126-135, 1996.

ENQUIST, L.W., DUBIN, J., WHEALY, M.E., CARD, J.P. Complementation analysis of pseudorabies virus gE and gI mutants in retinal ganglion cell neurotropism. *Journal of Virology*, v. 68, p. 5275-4279, 1994.

ENQUIST, L.W., HUSAK, P.J., BANFIELD, B.W., SMITH, G.A. Infection and spread of alphaherpesviruses in the nervous system. *Advances in Virus Research*, v. 51, p. 237-347, 1998.

EUGSTER, A.K., ANGULO, A.B, JONES, L.P. Herpesvirus encephalitis in range calves. *Proceedings Annals of Meeting American Association Veterinary Laboratory Diagnostic*, v. 17, p. 267-290, 1974.

FEHLER, F., HERRMANN, J.M., SAALMULLER, A., METTENLEITER, T.C. KEIL, G.M. Expression of bovine herpesvirus 1 glycoproteins gI and gIII in transfected murine cells. *Journal of Virology*, v. 66, p. 831-839, 1992.

FITZPATRICK, D.R.; ZAMB, T.J., PARKER, M.D., VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S., BABIUK, L.A., LAWMAN, M.J.P. Expression of bovine herpesvirus 1 glycoproteins gI and gIII in transfected murine cells. *Journal of Virology*, v. 62, p. 4239-4248, 1988.

FITZPATRICK, D.R., ZAMB, T.J., BABIUK, L.A. Expression of bovine herpesvirus type 1 glycoprotein gI in transfected bovine cells induces spontaneous cell fusion. *Journal of General Virology*, v. 71, p. 1215-1219, 1990.

FRENCH, E.L. A specific virus encephalitis in calves: isolation and characterization of the causal agent. *Australian Veterinary Journal*, v. 38, p.216-221, 1962a.

FRENCH, E.L. Relationship between infectious bovine rhinotracheitis (IBR) virus and a virus isolated from calves with encephalitis. *Australian Veterinary Journal*, v. 38, p. 555-556, 1962b.

FRIEDLI, K. & METZLER, A.E. Reactivity of monoclonal antibodies to proteins of a neurotropic bovine herpesvirus 1 (BHV-1) strain and to proteins of representative BHV-1 strains. *Archive of Virology*, v. 94, p. 109-122, 1987.

FUCHS, M., HUBERT, P., DETTERER, J., RZIHA, H.J. Detection of bovine herpesvirus type 1 in blood from naturally infected cattle by using sensitive PCR that discriminates between wild type virus and virus lacking glycoprotein E. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 37, p. 2498-2507, 1999.

FUTUYMA, D.J. *Biologia Evolutiva*, 2 ed., Sociedade Brasileira de Genética/CNPq, Ribeirão Preto, 646p. 1997.

GALVÃO, C.L., DÓRIA, J.D., ALICE, F.J. Anticorpos neutralizantes para o vírus da rinotraqueíte infecciosa dos bovinos no Brasil. *Boletim do Instituto Biológico da Bahia*, v. 6, p.15-25, 1963.

GARDNER & NAIRN, M.E. Viral meningoencephalitis of calves in western Australia. *Australian Veterinary Journal*, v. 40, p. 228, 1964.

GARCIA-CLOSAS, M., EGAN, K.M., ABRUZZO, J., NEWCOMB, P.A., TITUS-ERNSTOFF, L., FRANKLIN, T., BENDER, P.K., BECK, J.C., LE MARCHAND, L., LUM, A., ALAVANJA, M., HAYES, R.B., RUTTER, J., BUETOW, K., BRINTON, L.A., ROTHMAN, N. Collection of genomic DNA from adults in epidemiological studies by

buccal cytobrush and mouthwash. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, v. 10, p. 687-696, 2001.

HAMMERSCHMIDT, W., LUDWIG, H., BUHK, H.J. Specificity of cleavage in replicative-form DNA of bovine herpesvirus 1. *Journal of Virology*, v. 62, p. 1355-1363, 1988.

HANAHAH, D., JESSEE, J., BLOOM, F.R. Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods in Enzymology*, v. 204, p. 63-113, 1991.

HORIUCHI, M., YAMAZAKI, N., MATSUI, T., NAKAGAWA, M., ISHIGURO, N., SHINAGAWA, M. Restriction endonuclease analysis of bovine herpesvirus type 1 isolates from calves with fatal encephalitis: comparison with vaccine virus. *Journal Veterinary of Medicine Science*, v. 57, p. 577-580, 1995.

HUEMER, H.P., LARCHER, C., VAN DRUMEN LITTIL-VAN DEN HURK, S., BABIUK, L.A. Species selective interaction of *Alphaherpesvirinae* with the "unspecific" system of the host. *Archive of Virology*, v. 130, p. 353-364, 1993.

KAHRS, R.F. Infections bovine rhinotracheitis and infectious pustular vulvovaginitis. *Viral diseases of cattle*. 2ed. Ames, Iowa: Iowa State University, 2001. p. 159-170.

KEIL, G.M., ENGELHARDT, T., KARGER, A., ENZ, M.. Bovine herpesvirus 1 Us open reading frame 4 encodes a glycoproteoglycan. *Journal of Virology*, v. 70, p. 3032-3038, 1996.

KEUSER V, SCHYNTS F, DETRY B, COLLARD A, ROBERT B, VANDERPLASSCHEN A, PASTORET PP, THIRY E. Improved antigenic methods for differential diagnosis of bovine, caprine, and cervine alphaherpesviruses related to bovine herpesvirus 1. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 42, p. 1228-1235, 2004.

KHADR, A., TIKOO, S.K., BABIUK, L.A., VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S. Sequence and expression of a bovine herpesvirus-1 gene homologous to the glycoprotein K-encoding gene of herpes simplex virus-1. *Gene*, v. 168, p. 190-193, 1996.

KHATTAR, S.K., VAN DRUMEN LITTEL-VAN DEN HARKE, S., ATTAH-POKU, S.K., BABIUK, L.A., TIKOO, S.K.. Identification and characterization of a bovine herpesvirus-1 (BHV-1) glycoprotein gL which is required for proper antigenicity, processing, and transport of BHV-1 glycoprotein gH. *Virology*, v. 219, p. 66-76, 1996.

KIBENGE, F.S., HARRIS, L.M., MCKENNA, P.K., WADOWSKA, D., YASON, C.V. Amplification of strains of bovine herpesvirus 1 by use of polymerase chain reaction with primers in the thymidine kinase region. *American Journal of Veterinary Research*, v. 55, p. 1206-1212, 1994.

KRAMPS, J.A., MAGDALENA, J., QUAK, J., WEERDMEESTER, K., KAASHOEK, M.J., MARIS-VELDHUIS, M.A., RIJSEWIJK, F.A., KEIL, G., van OIRSCHOT, J.T. A simple, specific, and highly sensitive blocking enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to bovine herpesvirus 1. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 32, p. 2175-2181, 1994.

KUMAR, S., TAMURA, K., NEI, M. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, v. 5, p. 150-163, 2004.

KYTE, J., DOOLITTLE, R.F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology*, v. 157, p. 105-132, 1982.

LAM, N. & LETCHWORTH, G.J. Bovine herpesvirus 1 U(L)3.5 interacts with bovine herpesvirus 1 alpha-transinducing factor. *Journal of Virology*, v. 74, p. 2876-2884, 2000.

LEHMANN, D., SODOYER, R., LETERME, S. Characterization of BoHV-1 gE envelope glycoprotein mimotopes obtained by phage display. *Veterinary Microbiology*, v. 104, p. 1-17, 2004.

LIANG, X., BABIUK, L.A., VAN DRUMEN LITTEL-VAN DEN HURK, S., FITZPATRICK, D.R., ZAMB, T.J. Bovine herpesvirus 1 attachment to permissive cells is

mediated by its major glycoproteins gI, gIII, and gIV. *Journal of Virology*, v. 65, p. 1124-1132, 1991.

LIANG, X., BABIUK, L.A., ZAMB, T.J. An *in Vivo* study of a glycoprotein gIII-negative bovine herpesvirus 1 (BHV-1) mutant expressing  $\beta$ -galactosidase: Evaluation of the role of gIII virus infectivity and its use as a vector for mucosal immunization. *Virology*, v. 189, p. 629-639, 1992.

LIANG, X., BABIUK, L.A., ZAMB, T.J.. Mapping of heparin-binding structures on bovine herpesvirus 1 and pseudorabies virus gIII glycoproteins. *Virology*, v. 194, p. 233-243, 1993.

LOVATO, L.T., WEIBLEN, R., TOBIAS, F.L., MORAES, M.P. Herpesvírus bovino tipo 1 (HVB1): inquérito soro-epidemiológico no rebanho leiteiro do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Rural*. v. 25, p. 425-430, 1995.

LYAKU, J.R.S., VILCEK, S., NETTLETON, P.F., MARSDEN, H.S. A comparison of serological relationships among five ruminant alphaherpesviruses by ELISA. *Archive of Virology*, v. 124, p. 333-341, 1992.

LYAKU, J.R.S., VILCEK, S., NETTLETON, P.F., MARSDEN, H.S. The distinction of serologically related ruminant alphaherpesviruses by the polymerase chain reaction (PCR) and restriction endonuclease analysis. *Veterinary Microbiology*, v. 48, p. 135-142, 1996.

MADIN, S.H., YORK, C.J., MCKERCHER, D.G. Isolation of the infection bovine rhinotracheitis virus. *Science*, v. 125, p. 721-722, 1956.

MAGYAR, G., TANYI, J., HORNYAK, A., BARTHA, A. Restriction endonuclease analysis of Hungarian bovine herpesvirus isolates from different clinical forms of IBR, IPV and encephalitis. *Acta Veterinaria Hungarica*, v. 41, p. 159-170, 1993.

MANOJ, S., BABIUK, L.A., VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S. Immunization with a dicistronic plasmid expressing a truncated form of bovine herpesvirus-1 glycoprotein D

and the amino-terminal subunit of glycoprotein B results in reduced gB-specific immune responses. *Virology*, v. 313, p. 296-307, 2003.

MASRI, S.A., OLSON, W.P.T., NGUYEN, S.P., DEREGT, D. Rapid detection of bovine herpesvirus 1 in the semen of infected bulls by a nested polymerase chain reaction assay. *Canadian Journal Veterinary Research*, v. 60, p. 100-107, 1996.

MAYFIELD, J.E., GOOD, P.J., VAN OORT, H.J., CAMPBELL, A.R., REED, D.E. Cloning and cleavage site mapping of DNA from bovine herpesvirus 1 (Cooper strain). *Journal of Virology*, v.47, p. 259-264, 1983.

McGEOCH, D.J. & COOK, S. Molecular phylogeny of the alphaherpesvirinae subfamily and a proposed evolutionary timescale. *Journal of Molecular Biology*, v. 238, p. 9-22, 1994.

McGEOCH, D.J. & DAVISON, A.J. *The molecular evolutionary history of the herpesviruses*. In: Origin and evolution of viruses. Academic Press, London, England, 1999.

MÉDICI, K.C., ALFIERI, A.A., ALFIERI, A.F. Prevalência de anticorpos neutralizantes contra o herpesvírus bovino tipo 1, decorrentes de infecção natural, em rebanhos com distúrbios reprodutivos. *Ciência Rural*, v. 30, p. 347-350, 2000a.

MÉDICI, K.C., ALFIERI, A.A., ALFIERI, A.F. Ensaio imunoenzimático comercial no diagnóstico sorológico das infecções por herpesvírus bovino 1. *Ciência Rural*, v. 30, p. 343-346, 2000b.

METTENLEITER, T.C. Initiation and spread of  $\alpha$ -herpesvirus infections. *Trends in Microbiology*, v. 2, p. 2-4, 1994.

METZLER, A.E., SCHUDEL, A.A., ENGELS, M. Bovine herpesvirus 1: molecular and antigenic characteristics of variant viruses isolated from calves with neurological disease. *Archives of Virology*, v. 87, p. 205-217, 1985.

METZLER, A.E., SCHUDEL, A.A., ENGELS, M. Bovine herpesvirus 1: molecular and antigenic characteristics of variant viruses isolated from calves with neurological disease. *Archive of Virology*, v. 87, p. 205-217, 1986.

MEYER, G., BARE, O., THIRY, E. Identification and characterization of bovine herpesvirus type 5 glycoprotein H gene and gene products. *Journal of General Virology*, v. 80, p. 2849-2859, 1999.

MILLER, J.M., WHETSTONE, C.A., VAN DER MAATEN, J.J. Abortifacient property of bovine herpesvirus type 1 isolates that represent three subtypes determined by restriction endonuclease analysis of viral DNA. *American Journal of Veterinary Research*, v. 52, p. 458461, 1991.

MISRA, V., BLUMENTHAL, R.M., BABIUK, L.A. Proteins specified by bovine herpesvirus 1 (Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus). *Journal of Virology*, v. 40, p. 367-378, 1981.

MISRA, V., BABIUK, T.A., DARCEL LE, Q.C. Analysis of bovine herpes virus type 1 isolates by restriction endonuclease fingerprinting. *Archives of Virology*, v. 76, p. 341-354, 1983.

MISRA, V., NELSON, R., SMITH, M. Sequence of a bovine herpesvirus type-1 glycoprotein gene that is homologous to the herpes simplex gene for the glycoprotein gB. *Virology*, v. 166, p. 542-549, 1988.

MOORE, S., GUNN, M., WALLS, D. A. A rapid and sensitive PCR-based diagnostic assay to detect bovine herpesvirus 1 in routine diagnostic submissions. *Veterinary Microbiology*, v. 75, p. 145-153, 2000.

MOREIRA, S.P.G., SAMARA, S.I., ARITA, G.M.M., FERREIRA, F., PEREIRA, G.T. Monitoração de anticorpos neutralizantes para o vírus da rinotraqueíte infecciosa em bezerros. *Brazilian Journal Research Animal Science*, v. 38, p. 127-130, 2001.

MUELLER, S.B.K., IKUNO, A.A., CAMPOS, M.T.G.R., RIBEIRO, L.O.C. Isolamento e identificação do vírus da rinotraqueíte infecciosa dos bovinos de um rim de feto bovino (IBR/IPV). *Arquivos do Instituto de Biologia.*, v. 45, p. 187-190, 1978.

MUELLER, S.B.K., IKUNO, A.A., CAMPOS, M.T.G.R., RIBEIRO, L.O.C., BARBOSA, H.S.Q., OLIVEIRA, B.O.A. Ocorrência simultânea de alterações respiratórias e genitais associadas à rinotraqueíte infecciosa dos bovinos/vulvovaginite pustular infecciosa (IBR/IPV) em um rebanho no Estado de São Paulo. *Biológico*, v. 45, p. 55-66, 1979.

MURPHY, F.A. GIBBS, E.P., HORZINEK, M.C. STUDDERT, M.J. *Veterinary Virology*, 3 ed. New York: Academic Press, 1999.

NEUBAUER, A., BEER, M., BRANDMULLER, C., KAADEN, O.R., OSTERRIEDER, N. Equine herpesvirus 1 mutants devoid of glycoprotein B or M are apathogenic for mice but induce protection against challenge infection. *Virology*, v. 239, p. 36-45, 1997.

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE). *International Animal Health Code*. Manual of standards. Disponível em: <http://oie.int/norms/manual>.

OKAZAKI, K., HONDA, E., MINETOMA, T., KUMAGAI, T. Mechanisms of neutralization by monoclonal antibodies to different antigenic sites on the bovine herpesvirus type 1 glycoproteins, *Virology*, v. 150, p. 260-264, 1986.

d'OFFAY, J.M., MOCK, R.E., FULTON, R.W. Isolation and characterization of encephalitic bovine herpesvirus type 1 isolates from cattle in North America. *American Journal of Veterinary Research*, v. 54, p. 534-539, 1993.

d'OFFAY, J.M., ELY R.W., BALDWIN, C.A., WHITENACK, D.L., STAIR, E.L., COLLINS, J.K. Diagnosis of encephalitic bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) infection in cattle: virus isolation and immunohistochemical detection of antigen in formalin-fixed brain tissues. *Journal Veterinary Diagnosis Investigation*, v. 7, p. 247-251, 1995.

OLIVEIRA, M.E. Caracterização de amostras brasileiras de herpesvírus bovino isoladas de animais com diferentes sinais clínicos. Dissertação de Mestrado, Departamento de Microbiologia – UFMG, Belo Horizonte, MG, 2001, 76 p.

OLIVEIRA, M.E., RESENDE, M., BARROS, P.P., KALAPOTHAKIS, E. Studies of biological and genomic relationships between two Brazilian isolates of bovine herpesvirus 1 and 5. *Virus Review and Research*, v. 8, p. 16-28, 2003.

PEREIRA, L. Function of glycoprotein B homologues of the family herpesviridae. *Infectious Agents Disease*, v. 3, p. 9-28, 1994.

PEREZ, S., INMAN, M., DOSSIER, A., JONES, C. Latency-related gene encoded by bovine herpesvirus 1 promotes virus growth and reactivation from latency in tonsils of infected calves. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 43, p. 393-401, 2005.

PEREZ, S.E., BRETSCHEIDER, G., LEUNDA, M.R., OSORIO, E.A., FLORES, E.F., ODEON, A.C. Primary infection, latency, and reactivation of bovine herpesvirus type 5 in the bovine nervous system. *Veterinary Pathology*, v. 39, p. 437-444, 2002.

PETZOLD, S.A., RICKZIEGEL, P.E., PRADO, J.A.P., TEIXEIRA, J.C., WALD, V.B., SPILKI, F.R., ROEHE, P.M. Neutralizing antibodies to BHV-1 and 5 induced by an experimental, oil adjuvanted, BHV-1 vaccine. *Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science*, v. 38, p. 184-187, 2001.

PIDONE, C.L., GALOSI, C.M., ECHEVERRIA, M.G., NOSETTO, E.O., ETCHEVERRIGARAY, M.E. Restriction endonuclease analysis of BHV-1 and BHV-5 strains isolated in Argentina. *Journal Veterinary Medicine B*, v. 46, p. 453-456, 1999.

PITUCO, E. M, DE STEFANO, E, PASSOS, E. C. Diagnóstico sorológico da rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) no período de 1988 a 1992. *Reunião Anual do Instituto Biológico*, São Paulo, p.16, 1993.

RAVAZZOLO, A.P., DAL PIZZOL, M., MOOJEN, V. Evidência da presença de anticorpos para o vírus da rinotraqueíte infecciosa dos bovinos em alguns municípios do Estado do Rio Grande do Sul. *Arquivos da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul*, v. 17, p. 95-98, 1989.

REED, L.D. & MUNCH, H.A. Simple method of estimating fifty percent end points. *American Journal Hygiene*, v. 27, p. 493-497, 1938.

RICHARDS, B., SKOLETSKY, J., SHUBER, A.P., BALFOUR, R., STERN, R.C., DORKIN, H.L., PARAD, R.B., WITT, D., KLINGER, K.W. Multiplex PCR amplification from the CFTR gene using DNA prepared from buccal brushes/swabs. *Human Molecular Genetics*, v. 2, p. 159-163, 1993.

RIET-CORREA, F. & SCILD, A.L. Doenças diagnosticadas pelo Laboratório Regional de Diagnóstico no ano de 1994 e comentários sobre algumas doenças. *Boletim do Laboratório Regional de Diagnóstico*, Pelotas, v. 15, p. 7-19. 1995.

RIJSEWIJK, F.A.M., MAGDALENA, J., KAASHOEK, M., MARIS-VELDHUIS, M.A. GIELKENS, A.L.J., van OIRSCHOT, J.T. Identification and functional analysis of the glycoprotein E (gE) of bovine herpesvirus type 1. In: *17<sup>th</sup> International Herpesvirus Workshop*, Edinburgh, Scotland, 1992, p. 245.

RIJSEWIJK, F.A.M., KAASHOEK, M., KEIL, G., PAAL, H., RUULS, R., van ENGELBURG, F., van OIRSCHOT, J.T. *In vitro* and *in vivo* role of the non essential glycoproteins gC, gG, gI and gE of bovine herpesvirus 1. In: *Symposium on IBR and other ruminant herpesvirus infections*, European Society for Virology, Liege, Belgium, 1995, p.27.

RIJSEWIJK, F.A.M., KAASHOEK, M., LANGEVELD, J.P.M., MELOEN, R., JUDEK, J. BIÉNKOWSKA-SZEWCZYK, B., MARIS-VELDHUIS, M.A., VAN OIRSCHOT, J.T. Epitopes on glycoprotein C of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) that allow differentiation

between BHV-1.1 and BHV-1.2 strains. *Journal of General Virology*, v. 80, p. 1477-1483, 1999.

ROCHA, M.A., GOUVEIA, A.M.G., LOBATO, R.C. Pesquisa de anticorpos para IBR em amostragem de demanda no estado de Minas Gerais, 1990-1999. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 53, p. 645-647, 2001.

ROCK, D. Latent infection with bovine herpesvirus type 1. *Seminary of Virology*, v. 5, p. 233-240, 1994.

ROEHE, P.M. Atualização no diagnóstico e controle de infecções por herpesvírus bovinos tipos 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5). *Biológico*, v. 59, p. 27-32, 1997.

ROEHE, P.M., SILVA, T.C., NARDI, N.B., OLIVEIRA, L.G., ROSA, J.C.A. Diferenciação entre os vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (BHV-1) e herpesvírus da encefalite bovina (BHV-5) com anticorpos monoclonais. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 17, p. 41-44, 1997.

ROELS, S., CHARLIER, G., LETELLIER, C. MEYER, G., SCHYNTS, F., KERKHOFS, P., THIRY, E., VANOPDENBOSCH, E. Natural case of bovine herpesvirus 1 meningoencephalitis in an adult cow. *Veterinary Record*, v. 146, p. 586-588, 2000.

ROIZMAN, B., DESROSIERS, R.C., FLECKENSTEIN, B., LOPEZ, C., MINSON, A.C., STUDDERT, M.J. The family *Herpesviridae*: An update. *Archives of Virology*, v. 123, p 425-449, 1992.

ROS, C., RIQUELME, M.E., FORSLUND, K.O., BELAK, S. Improved detection of five closely related ruminant alphaherpesviruses by specific amplification of viral genomic sequences. *Journal of Virological Methods*, v. 83, p. 55-65, 1999.

ROS, C. & BELÁK, S. Studies of genetic relationships between bovine, caprine, cervine, and rangiferine alphaherpesviruses and improved molecular methods for virus detection and identification. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 37, p. 1247-1253, 1999.

ROS, C. & BELÀK, S. Characterization of the glycoprotein B gene from ruminant alphaherpesviruses. *Virus Genes*, v. 24, p. 99-105, 2002.

ROSENTHAL, A., COUTELLE, O., CRAXTON, M. Large-scale production of DNA sequencing templates by microtitre format PCR. *Nucleic Acids Research*, v. 21, p. 173-174, 1993.

RYCHLIK, P. & RYCHLIK, W. OLIGO 4.0 – Primer Analysis Software. 1989 – 91.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York: Cold Spring Harbor, 1989. 545p.

SAMPAIO, S.B.K., IKUNO, A.A., RICHTZENHAIN, L.J. Rinotraqueíte infecciosa dos bovinos/vulvovaginite pustular infecciosa (IBR/IPV). *Biológico*, v. 47, p. 197-114, 1981.

SANCHES, A.W.D., LANGOHR, I.M., STIGGER, A.L., BARROS, C.S.L. Doenças do sistema nervoso central em bovinos no sul do Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 20, p. 113-118, 2000.

SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of National Academy of Science of USA*, v. 74, p. 5463-5467, 1977.

SANTURDE, G., SILVA, N., VILLARES, R., TABARES, E., SOLANA, A., BAUTISTA, J.M., CASTRO, J.M. Rapid and high sensitivity test for direct detection of bovine herpesvirus-1 genome in clinical samples. *Veterinary Microbiology*, v. 49 (1): 81-92, 1996.

SALVADOR, S.S., LEMOS, R.A.A., RIET-CORREA, F., ROEHE, P.M., OSÓRIO, A.L.A.R. Meningoencefalite em bovinos causada por herpesvírus bovino-5 no Mato Grosso do Sul e São Paulo. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 18, p. 76-83, 1998.

SANTURDE, G., Da SILVA, N., VILLARES, R., TABARES, E., SOLANA, A., BAUTISTA, J.M., CASTRO, J.M. Rapid and high sensitivity test for direct detection of bovine herpesvirus-1 genome in clinical samples. *Veterinary Microbiology*, v. 49, p. 81-92, 1996.

SCHILD, A.L., RIET-CORREA, F., FERREIRA, J.L.M., MÉNDEZ, M.C. Doenças diagnosticadas pelo Laboratório Regional de Diagnóstico 1993. *Boletim do Laboratório Regional de Diagnóstico*, Pelotas, v. 14, p. 23-26, 1994.

SCHMIDT, N.J. *Cell culture techniques for diagnostic virology*. In: Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections. 5ª edição, Lennette, E.H., Schmidt, N.J., editores. American Public Health Association, Washington, 1979, 74p.

SCHUDEL, A.A., CARRILLO, B.J., WYLER, R., METZLER, A.E. Infections of calves with antigenic variants of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) and neurological disease. *Journal of Veterinary Medicine B.*, v. 33, p. 303-310, 1986.

SEAL, B.S. & WHETSTONE, C.A. Immediate-early gene expression and gene mapping comparisons among isolates of bovine herpesvirus 1 and 5. *Veterinary Microbiology*, v. 38, p. 369-384, 1994.

SHANG, L.M. & JONES, C. Analysis of bovine herpesvirus 1 transcripts during a primary infection of trigeminal ganglia of cattle. *Journal of Virology*, p. 6786-6795, 1997.

SILVA, N., ESCARMIS, C., SOLANA, A., CASTRO, J.M.A. Variabilidad genómica entre cepas del herpes bovino tipo I aisladas de casos clinicos de IBR. *Investigación Agraria Producción Sanidad Animales*, v. 15, p. 59-67, 2000.

SPEAR, P.G. Entry of alphaherpesviruses into cells. *Seminary in Virology*, v. 4, p. 167-180, 1993.

SPIILKI, F.R., ESTEVES, P.A., FRANCO, A.N., LIMA, M., HOLZ, C.L., BATISTA, H.B.R., DRIEMEIER, D., FLORES, E.F., WEIBLEN, R., ROEHE, P.M. Neurovirulência e neuroinvasividade de herpesvírus bovinos tipos 1 e 5 em coelhos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 22, p. 58-63, 2002.

St. GEORGE, T.D. & PHILPOTT, M. Isolation of infectious bovine rhinotracheitis virus from the prepuce of water buffalo bulls in Australia. *Australian Veterinary Journal*, v. 48, p. 126, 1972.

STEVEN, A.C. & SPEAR, P.G. Herpesvirus capsid assembly and envelopment. IN: W. Chiu, R.M. Burnett, and R.L. Garcea (ed), *Structural Biology of Viruses*, Oxford University Press, New York, NY, 1997, p. 312-351.

STRYER, L. *Bioquímica*. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1002p. 1996.

TAMURA, K. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C content bias. *Molecular Biology Evolution*, v. 10, p. 512-526, 1992.

TEIXEIRA, M.B., ESTEVES, P.A., COELHO, C.S.S., OLIVEIRA, L.G., ROEHE, P.M. Diferenças em níveis de anticorpos neutralizantes contra herpesvírus bovinos tipos 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5) por testes de soroneutralização. *Pesquisa Veterinária Gaúcha*, v. 4, p. 61-65, 1998.

THIRY, E., WELLEMANS, G., LIMBOURG, B., BROES, A., PASTORET, P. Effect of repeated intradermal injections of bovine herpesvirus type 1 antigen on seronegative cattle. *Veterinary Record*, v. 130, p. 372-375, 1992.

TIKOO, S.K., FITZPATRICK, D.R., BABIUK, L.A., ZAMB, T.J. Molecular cloning, sequencing and expression of functional bovine herpesvirus type 1 glycoprotein IV in transfected bovine cells. *Journal of Virology*, v. 64, p. 5131-5142, 1990.

TIKOO, S.K., CAMPOS, M., BABIUK, L.A. Bovine herpesvirus 1 (BHV-1): biology, pathogenesis, and control. *Advances in Virus Research*, v. 45, p. 191-223, 1995.

TURIN, L. & RUSSO, S. BHV-1 infection in cattle: an update. *Veterinary Bulletin*, v. 8, p. 15R – 21R, 2003.

van DRUNEN LITTEL-van den HURK, S., BABIUK, L.A. Synthesis and processing of bovine herpesvirus 1 glycoproteins. *Journal of Virology*, v. 59, p. 401-410, 1986.

van ENGELBURG, F.A.C., MAES, R.K., VAN OIRSCHOT, J.T., RIJSEWIJK, F.A. Development of a rapid and sensitive polymerase chain reaction assay for detection of bovine herpesvirus type 1 in bovine semen. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 31, p. 3129-3135, 1993.

van OIRSCHOT, J.T., KAASHOEK, M.J., RIJSEWIJK, F.A. Advances in the development and evaluation of bovine herpesvirus 1 vaccines. *Veterinary Microbiology*, v. 53, p. 43-54, 1996.

van OIRSCHOT, J.T., KAASHOEK, M.J., MARIS-VELDHUIS, M.A., WEERDMEESTER, K., RIJSEWIJK, F.A. An enzyme-linked immunosorbent assay to detect antibodies against glycoprotein gE of bovine herpesvirus 1 allows differentiation between infected and vaccinated cattle. *Journal of Virological Methods*, v. 67, p. 23-34, 1997.

VASCONCELOS, R.O., VARASCHIN, N.S., WOUTERS, F., NOBRE, V.M.T., BARTH, A.T. Meningoencefalite bovina por herpesvírus. *Anais VI Encontro Nacional de Patologia Veterinária*, Santa Maria, 64 p., 1993.

VIDOR, T., HALFEN D.C., LEITE, T.E., COSWIG, L.T. Herpes bovino tipo 1 (BHV-1): sorologia de rebanhos com problemas reprodutivos. *Ciência Rural*, v. 25, p. 421-424, 1995.

VIEIRA, S., BRITO, W.M.E.D., SOUZA, W.J., ALFAIA, B.T., LINHARES, D.C.L. Anticorpos para o herpesvírus bovino 1 (BHV-1) em bovinos do estado de Goiás. *Ciência Animal Brasileira*, v. 4, p. 131-137, 2003.

VILCEK, S. Detection of the bovine herpesvirus-1 (BHV-1) genome by PCR. *Journal of Virological Methods*, v. 41, p. 245-247, 1993.

VILCEK, S., NETTLETON, P.F., HERRING, A.J. Rapid detection of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) using the polymerase chain reaction. *Veterinary Microbiology*, v. 42, p. 53-64, 1994.

VILCEK, S., NETTLETON, P.F., HERRING, A.J. Detection of bovine herpesvirus 1 in clinical samples by the polymerase chain reaction. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*, v. 102, p. 249-250, 1995.

VOGEL, F.S.F., LIMA, M., FLORES, E.F., WEIBLEN, R., WINKELMANN, E.R., MAYER, S.V., MAZZUTI, K.C, ARENHART, S. Replicação e excreção viral durante a infecção aguda e após a reativação da latência induzida por dexametasona em bezerros inoculados com os herpesvírus bovinos tipo 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5). *Ciência Rural*, v. 34, p. 1619-1621, 2004.

WALKER, A.H., NAJARIAN, D., WHITE, D.L., JAFFE, J.F., KANETSKY, P.A., REBBECK, T.R.. Collection of genomic DNA by buccal swabs for polymerase chain reaction-based biomarker assays. *Environmental Health Perspectives*, v. 107, p. 517-520, 1999.

WALSH, P.S., METZGER, D.A., HIGUCHI, R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*, v. 10, p. 506-513, 1991.

WEIBLEN, R., DE BARROS, C.S., CANABARRO, T.F., FLORES, I.E. Bovine meningoencephalitis from IBR virus. *Veterinary Records*, v. 124, p. 666-667, 1989.

WEIBLEN, R., MORAES, M.P., REBELATTO, M.C., LOVATO, L.T., CANABARRO, T.F. Bovine herpesvirus isolates. *Revista de Microbiologia*, v. 27, p. 208-211, 1996.

WHITBECK, J.C., BELLO, L.J., LAWRENCE, W.C.M. Comparison of the bovine herpesvirus type gI gene and the herpes simplex virus type 1 B gene. *Journal of Virology*, v. 62, p. 3319-3327, 1988.

WIEDMANN, M., BRANDON, R., WAGNER, P., DUBOVI, E.J., BATT, C.A. Detection of bovine herpesvirus-1 in bovine semen by a nested PCR assay. *Journal of Virological Methods*, v. 44, p. 129-139, 1993.

WILD, P., SCHRANER, E.M., PETER, J., LOEPFE, E., ENGELS, M. Novel entry pathway of bovine herpesvirus 1 and 5. *Journal of Virology*, v. 72, p. 9561-9566. 1998.

WILDY, P. Herpesvirus. *Intervirology*, v. 25, n. 3, p. 117-140, 1986.

WILLIAMS, S.D. & KWOK, S. Polymerase chain reaction: applications for viral detection. In: Lenette, E.H. (ed), *Laboratory Diagnosis of Viral Infection*, 2<sup>nd</sup> edn, p. 147-174. Marcel Dekker, New York, 1992.

WIRTH, U.V., FRAEFEL, C., VOGT, B., VLCEK, C., PACES, V., SCHWYER, M. Immediate-early RNA 2.9 and early RNA 2.6 of bovine herpesvirus1 are 3' coterminal and encode a putative zinc finger transactivator protein. *Journal of Virology*, v. 66, p. 2763-2772, 1992.

WITTMANN, G. *Herpesvirus disease of cattle, horses, and pigs*. Boston: Kluwer Academic, 345p. 1989.

WIZIGMAN, G., VIDOR, T., RICCI, Z.M.T. Investigações sorológicas sobre a ocorrência e incidência dos vírus PI-3, IBR e da Diarréia a vírus-enfermidade das mucosas dos bovinos no estado do Rio Grande do Sul. *Anais do Instituto de Pesquisa Veterinária*, 1972.

WU, S.X., ZHU, X.P., LETCHWORTH, G.J., Bovine herpesvirus 1 glycoprotein M forms a disulfide-linked heterodimer with the U(L) 49.5 protein. *Journal of Virology*, v. 72, p. 3029-36, 1998.

WYLER, R., ENGELS, M., SCHWYZER, M., Infectious bovine rhinotracheitis/vulvovaginitis BHV-1. *Herpesvirus disease of cattle, horses, and pigs*. Kluwer Academic Publisher, 1989, p. 1-72.

YASON, C.V., HARRIS, L.M., MCKENNA, P.K., WADOWSKA, D., KIBENGE, F.S. Establishment of conditions for the detection of bovine herpesvirus-1 by polymerase chain reaction using primers in the thymidine kinase region. *Canadian Journal of Veterinary Research*, v. 59, p. 94-101, 1995.

YATES, W.D.G. A review of infectious bovine rhinotracheitis, shipping fever pneumonia and viral bacterial synergism in respiratory disease of cattle. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, v. 46, p. 225-263, 1982.

ZHENG, C., BABIUK, L.A., van DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S. Bovine herpesvirus 1 VP22 enhances the efficacy of a DNA vaccine in cattle. *Journal of Virology*, v, 79, p. 1948-1953, 2005.

ZHOU, J., LYAKU, J., FREDRICKSON, R.A., KIBENGE, F.S.B. Improved detection of bovine herpesvirus 1 in artificially infected bovine semen by protein amplification. *Journal of Virological Methods*, v. 79, p. 181-189, 1999.

## **13. ANEXOS**

## 13. ANEXOS

### MEIOS E SOLUÇÕES

#### **Agar LB**

10 g de peptona 140  
5 g de extrato de levedura  
10 g de NaCl  
15 g de ágar  
1 litro de água destilada

#### **Meio LB**

10 g de peptona 140  
5 g de extrato de levedura  
10 g de NaCl  
1 litro de água destilada

#### **TBE**

89 mM Tris-borato pH 8.3  
25 mM EDTA

**TAMPÃO DE AMOSTRA**

15% de Ficool 400  
0,03% de azul de bromofenol  
0,03% de xileno cianol FF  
0,4% de orange G  
10 mM de Tris-HCL pH 7,5

**TAMPÃO DE LAVAGEM**

Etanol 50% (v/v)  
50 mM de Tris-HCl pH 8,0  
10 mM de EDTA pH 8,0

**TAMPÃO DE LIGAÇÃO**

Iodeto de Sódio (NaI) 6 M

**TAMPÃO DE PCR 10X**

500 mM de KCl  
15 mM de MgCl<sub>2</sub>  
100 mM de Tris-HCl (pH 8,4)  
1 mg/mL de gelatina

**TAMPÃO DE CONGELAMENTO DE BACTÉRIAS**

100 mM de KCl  
45 mM de MnCl<sub>2</sub>. 4H<sub>2</sub>O  
10 mM de NaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O  
3 mM de HAcCoCl<sub>3</sub>  
10 mM de acetato de potássio