

Roberto Gregório de Almeida Botelho

**DESENVOLVIMENTO DE TESTES DE PCR PARA BoHV - 5 E SUA
APLICAÇÃO NO DIAGNÓSTICO DE CASOS CLÍNICOS.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária.

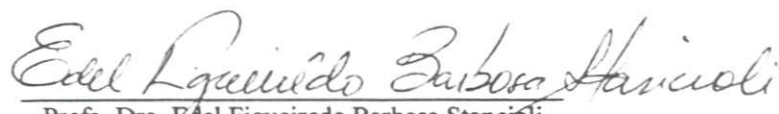
Área: Medicina Veterinária Preventiva

Orientadora: Profª Dr.ª Edel Figueiredo Barbosa Stancioli

**Belo Horizonte
UFMG - Escola de Veterinária
2000**

B748d **Botelho, Roberto Gregório de Almeida, 1972-**
2000 **Desenvolvimento de testes de PCR para BoHV-5 e**
 sua aplicação no diagnóstico de casos clínicos / Roberto
 Gregório de Almeida Botelho. –Belo Horizonte:
 UFMG-Escola de Veterinária, 2000.
 45p.: il.
 Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de
 Minas Gerais, Escola de Veterinária
 1. Bovino – Doenças – Teses. 2. Vírus do herpes em
 animais – Diagnóstico – Teses. I. Título.
 CDD – 636.208 96


Dissertação defendida e aprovada em 2 de agosto de 2000 pela Comissão Examinadora constituída por:



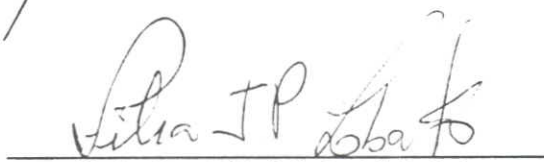
Prof. Dra. Edel Figueiredo Barbosa Stancioli
Orientadora




Prof. Dr. Maurilio Andrade Rocha



Prof. Dr. Rômulo Cerqueira Leite



Prof. Dra. Zélia Inês Portela Lobato



Prof. Dra. Erna Gessien Kroon

*Aos meus pais, por ter chegado
aonde estou e pelo que sou hoje.
Aos meus irmãos, pela força que nos une,
pelo apoio e por aprender o que é uma família.
A meu grande amor, Priscilla, pela paciência e compreensão.*

Com amor, dedico.

Agradecimentos

Agradeço especialmente e incondicionalmente à professora Edcl Figueiredo Barbosa Stancioli, pelo apoio, formação científica, orientação, amizade e, principalmente, por ter acreditado que poderia conseguir.

Ao professor Maurílio Andrade Rocha, pelo apoio, orientação e acima de tudo, pela amizade.

Aos professores do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG, especialmente ao professor Rômulo Cerqueira Leite, pela oportunidade de ingressar no mundo científico, aos professores Andrey Pereira Lage e Zélia Inês Portela Lobato.

Aos colegas do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG e do Laboratório de Biologia de Microorganismos Intracelulares do ICB - UFMG, especialmente à Luciana, Gustavo e Cláudia: demos os primeiros passos juntos, terminamos ou terminaremos o nosso caminho, sairemos e, quem sabe, voltaremos. A Jaqueline, pelo apoio laboratorial no final da minha Dissertação.

À professora Wolfanga pela técnica de extração de DNA em amostras parafinadas.

À professora Erna Geessien Kroon por ter cedido as amostras de Herpesvirus Humanos, aos professores Paulo Michel Roche e Rudi Weiblen pelas amostras de Herpesvirus Bovino 5, professor Roberto Mauricio Carvalho Guedes pelas amostras parafinadas e ao professor Luiz Cláudio Nogueira Mendes pelas amostras de São Paulo.

À Pós-graduação da Escola de Veterinária da UFMG pela confiança em mim depositada.

A FAPEMIG pelo apoio financeiro.

E finalmente, a todos aqueles que, de uma forma ou de outra, acreditaram que eu pudesse conseguir.

*"Dai, pois, como já se disse,
exigir a primeira leitura paciência,
fundada na certeza de que, na segunda,
muita coisa, ou tudo, se entenderá sob luz inteiramente outra."*

Schopenhauer.

*"Talvez porque mais direto colidem com o não-senso,
crê-se, reflete por um triz a coerência do mistério geral,
que nos envolve e cria.
A vida também é para ser lida. Não literalmente,
mas em seu supra-senso. E a gente, por enquanto,
só a lê por tortas linhas. Está-se a achar que se ri."*

João Guimarães Rosa
(Tutamécia)

*"Sertão é onde o pensamento da gente se forma mais forte do que o poder do lugar.
Viver é muito perigoso..." - Saudades de minha terra!!!*

João Guimarães Rosa
(Grande Sertão: Veredas)

ÍNDICE

	Pág.
ABREVIATURAS.....	13
RESUMO	15
ABSTRACT	15
1. INTRODUÇÃO.....	17
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1. Família <i>Herpesviridae</i>	17
2.2. Alphaherpesvírus	18
2.2.1. Multiplicação do vírus.....	18
2.2.2. Montagem.....	18
2.2.3. Imunologia.....	18
2.2.4. Latência.....	19
2.3. Estrutura do genoma do BoHV-5.....	19
2.4. Glicoproteínas	19
2.4.1. Neurovirulência e Neuroinvasividade	20
2.5. Propriedades gerais.....	20
2.6. Patogenia	20
2.7. Transmissão.....	21
2.8. Achados Pós – morte.....	21
2.9. Diagnóstico diferencial.....	21
2.10. Diagnóstico BoHV-1 X BoHV-5.....	22
2.11. PCR em BHV-5	22
3. MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1. Células	23
3.2. Vírus.....	23
3.3. Especificidade.....	23
3.4. Sensibilidade.....	23
3.5. Amostras clínicas.....	23
3.6. Extração do DNA viral.....	24
3.6.1. Extração do DNA viral de cultivo celular.....	24
3.6.2. Extração do DNA viral de amostras clínicas.....	24
3.7. PCR	24
3.7.1. Iniciadores.....	24
3.7.2. Amplificação.....	24
3.8. Análise dos produtos de PCR.....	25
3.8.1. Eletroforese em géis de poliacrilamida e agarose.....	25
3.9. Seqüenciamento do produto de PCR	26
3.9.1. Purificação do produto da PCR.....	26
3.9.2. Seqüenciamento e análise da seqüência.....	26
4. RESULTADOS	26
4.1. Otimização das etapas da PCR.....	26
4.2. Sensibilidade da PCR.....	26
4.2.1. Sensibilidade da PCR com cultivo celular	26
4.2.2. Sensibilidade da PCR com DNA extraído.....	26
4.3. Especificidade da PCR.....	29
4.4. Amostras clínicas.....	29

4.4.1.	PCR	29
4.4.2.	Histórico das amostras de campo.....	29
4.5.	Seqüenciamento, alinhamento e inferência filogenética.....	34
5.	DISCUSSÃO.....	40
6.	CONCLUSÕES.....	41
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Diagrama esquemático da estrutura genômica do BoHV-1.	19
Figura 2.	Amplificação de um fragmento de 592 pb.	27
Figura 3.	Sensibilidade da PCR com o sobrenadante de cultivo celular.....	27
Figura 4.	Sensibilidade da PCR com o DNA extraído.....	27
Figura 5.	Especificidade da PCR.....	29
Figura 6.	Resultado da PCR "nested" com material parafinado.	31
Figura 7.	Seqüência submetida ao GenBank, com seus respectivos códigos e número de acesso.	35
Figura 8.	Alinhamento da seqüência amplificada comparando com outra seqüência de BoHV-5 e quatro seqüência de BoHV-1 depositadas no GenBank.....	37
Figura 9.	Árvore filogenética.	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Seqüência dos iniciadores utilizados e tamanho do fragmento amplificado.	25
Tabela 2.	Combinações dos iniciadores utilizados e resultado da PCR.	31
Tabela 3.	Amostras positivas na PCR com suas respectivas identificações e achados histopatológicos.	33

ABREVIATURAS

AcM - Anticorpo Monoclonal
ACTH - Hormônio Adrenocorticotrófico
BoHV-1 - Herpesvírus bovino 1
BoHV-5 - Herpesvírus bovino 5
ECP - Efeito Citopático
EHV-1 - Herpesvírus eqüino 1
EHV-4 - Herpesvírus eqüino 4
HHV-1 - Herpes simplex vírus 1
HHV-2 - Herpes simplex vírus 2
ICTV - The International Committee on Taxonomy of Viruses
IFI - Imunofluorescência Indireta
MDBK - Madin - Darby Bovine Kidney
MHC - Complexo Principal de Histocompatibilidade
ORF - Janela aberta de leitura
PCR - Reação em cadeia da polimerase
PK - Proteína Quinase
PRV - Vírus da Pseudorraiva
SFB - Soro Fetal Bovino
SNC - Sistema Nervoso Central
TK - Timidina Quinase
UL region - Região Única Longa
US region - Região Única Curta

RESUMO

Os Herpesvírus bovinos são patógenos de grande importância econômica causando uma variedade de síndromes clínicas. Manifestações neurológicas são atualmente atribuídas ao herpesvírus bovino 5 (BoHV-5). Os genomas do BoHV-5 e BoHV-1 possuem 85% de similaridade, dificultando sua diferenciação pelas técnicas tradicionais de diagnóstico. O desenvolvimento de testes para a detecção do BoHV-5 é importante para o diagnóstico diferencial de outras doenças que induzem sintomas neurológicos em bovinos, como a raiva. Foi desenvolvido um teste de PCR para a região US4 do BoHV-5, utilizando amostras de campo EVI-88 e A663 (BoHV-5) como padrão. O teste foi padronizado para a utilização em sobrenadante de cultivo celular ou após extração de DNA. A especificidade do teste foi avaliada frente a amostras de Herpesvírus humanos e animais, e também pelo seqüenciamento do fragmento de DNA obtido da amostra EVI-88. A sensibilidade apresentada foi de $10^{-3,25}$ TCID₅₀/50µl, ou 0,0006 TCID₅₀/50µl para sobrenadante de cultivo celular e $10^{-1,25}$ TCID₅₀/50µl, ou 0,06 TCID₅₀/50µl para DNA extraído. Foram testadas 20 amostras clínicas parafinadas de sistema nervoso central de bovinos que apresentaram encefalite com uma positividade de 35%. A PCR desenvolvida apresenta -se como uma alternativa rápida, sensível e específica para a detecção do BoHV-5 em amostras clínicas.

Palavras-chave: BoHV-5; PCR; Amostras clínicas parafinadas; Bovinos.

ABSTRACT

Bovine Herpesviruses are pathogens that cause serious economic losses due to many clinical syndromes. Although both BoHV-1 and BoHV-5 are neurotropic viruses, the neurovirulent strain has been redesigned BoHV-5. The BoHV-5 and BoHV-1 genomes have about 85% homology and for this reason it's very difficult to distinguish them with traditional diagnostic setting. The tests development for BoHV-5 detection is very important for differential diagnosis from other disease that induce neurological symptoms in bovines like rabies. This report describes a nested PCR assay (US4 region) for BoHV-5 detection. Previously characterized human and animal herpesvirus isolates, including BoHV-5 (EVI-88 and A663) and BoHV-1 (Colorado sample) were used in the development of the PCR. This test was standardized for detection in tissue culture and after DNA extraction. The PCR specificity was achieved by use of multiple herpesviruses samples and by US4 amplicon partial sequence analysis from EVI-88 (BoHV-5). The sensitivity was $10^{-3,25}$ TCID₅₀/50µl or 0,0006 TCID₅₀/50µl for tissue culture supernatant and $10^{-1,25}$ TCID₅₀/50µl or 0,06 TCID₅₀/50µl for DNA. The PCR procedure developed successfully confirmed the presence of BoHV-5 in paraffin-embedded brain tissue from 7/20 (35%) samples, using US4 target sequence.

Keywords: BoHV-5, PCR, paraffin-embedded brain tissue, bovine.

1. INTRODUÇÃO

A infecção pelo Herpesvírus Bovino 1 (BoHV-1) nos rebanhos bovinos é caracterizada pelas diversas formas clínicas que se apresenta, incluindo doença respiratória, vulvovaginite, balanopostite, diminuição nos índices de reprodução e queda brusca na produção de leite. Formas nervosas da doença, até pouco tempo atribuídas ao BoHV-1 são hoje relacionadas a uma diferente amostra vírica, classificada, em 1992, como Herpesvírus Bovino 5 ou BoHV-5.

A diferenciação do BoHV-1 e do BoHV-5 através das técnicas convencionais de diagnóstico como isolamento viral, imunofluorescência, neutralização viral, dentre outros é muito difícil devido à alta similaridade entre estes dois vírus, os quais apresentam reações sorológicas cruzadas.

O diagnóstico de meningoencefalite por BoHV-5 é feito baseado no quadro clínico-epidemiológico e nos achados de necropsia e histopatológicos característicos, devendo ser confirmado pelo isolamento e identificação viral. Isto é de grande importância para o diagnóstico diferencial entre as principais enfermidades que afetam o sistema nervoso central (SNC) de bovinos, como a raiva, o botulismo, a poliencfalomalácia, dentre outras. Os sinais clínicos da infecção pelo BoHV-5 incluem tremores, salivação excessiva, andar em círculo, bruxismo, paralisia da língua, incoordenação, nistagmo, decúbito lateral permanente, movimentos de pedalagem e morte. Estes achados clínicos são encontrados na maioria das doenças de sintomatologia nervosa, sendo, portanto, importante a diferenciação laboratorial das doenças através do exame microscópico detalhado de todos os segmentos do SNC.

A forma clínica caracterizada por encefalite tem sido observada em bovinos na América do Sul e do Norte (Eugster et al., 1974; Metzler et al., 1986), bem como na Austrália (Studdert, 1989) e Hungria (Magyar et al., 1989). A importância do BoHV-5 vem crescendo no Brasil, onde já foram descritos surtos no Rio Grande do Sul (Weiblen et al., 1989), Mato Grosso do Sul (Salvador et al., 1997), São Paulo e Rio de Janeiro (Pituco, M. - comunicação pessoal).

Paraná (Alfieri, A. - comunicação pessoal) e Minas Gerais (Leite, R.C. - comunicação pessoal).

Com os métodos de identificação e diferenciação entre BoHV-5 e BoHV-1 em amostras de campo que estão sendo desenvolvidos, espera-se uma melhor descrição da prevalência do BoHV-5 no país.

Após o isolamento do BoHV-5, é necessária a identificação do agente frente a um soro anti-BoHV-5 ou através de imunofluorescência ou imunoperoxidase com anticorpos específicos, devido à semelhança do efeito citopático entre as amostras de Herpesvírus em geral. A semelhança da estrutura genômica com o BoHV-1, inclusive entre as glicoproteínas, interfere nos resultados de testes sorológicos como ELISA e soroneutralização viral.

Devido à importância deste agente nos rebanhos bovinos e à dificuldade de diferenciação com os outros Herpesvírus Bovinos através das técnicas convencionais, este trabalho teve como objetivo principal o desenvolvimento e padronização de testes de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para o diagnóstico do Herpesvírus Bovino 5 e a padronização de testes de PCR para o estudo retrospectivo de 20 anos (1978-1998) em amostras clínicas parafinadas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Família *Herpesviridae*

O BoHV-5 pertence à família *Herpesviridae* cujas características principais são possuir um cerne contendo DNA linear de fita dupla e um capsídeo icosaédrico de aproximadamente 100-110nm de diâmetro contendo 162 capsômeros. Alguns membros desta família possuem um material amorfo distribuído de forma assimétrica ao redor do capsídeo chamado de tegumento e um envelope. Estes vírus estão altamente disseminados na natureza, já tendo sido caracterizados parcialmente perto de 100 herpesvírus. A família *Herpesviridae* se subdivide em três subfamílias, pertencendo o BoHV-5 à subfamília *alphaherpesvirinae*.

Importantes características dos alphaherpesvírus são sua ampla variedade de hospedeiros, ciclo reprodutivo curto com rápida disseminação em cultivo celular, levando a uma invariável destruição das células hospedeiras durante a multiplicação viral, além da capacidade de estabelecer infecção latente primariamente, mas não exclusivamente, dentro dos gânglios sensoriais. Todos os herpesvírus catalogados até hoje são hábeis em permanecer latentes nos hospedeiros naturais, em células específicas, que variam de vírus para vírus (ICTV, 2000).

Esta subfamília abrange os principais vírus de interesse para a medicina humana e veterinária (HHV 1, HHV 2 e Herpesvírus Bovinos 1 e 5). Existem ainda as subfamílias *Betaherpesvirinae* (Citomegalovírus e Herpesvírus equino 7) e *Gammaherpesvirinae* (Epstein-Barr Vírus e Herpesvírus bovino 4) (ICTV, 2000).

2.2. Alphaherpesvírus

As interações dos vírus com as células envolvem múltiplos processos mediados por várias glicoproteínas e pelo menos dois receptores celulares (Babiuk et al., 1996; Engels e Ackermann, 1996). As glicoproteínas do envelope viral são responsáveis pela ligação, fusão, formação de poros e invaginação da partícula viral e penetração, além da disseminação de célula a célula (Engels e Ackermann, 1996; Wild et al., 1998).

O BoHV-1 e BoHV-5 entram na célula pela fusão única do envelope viral com a membrana plasmática seguida do movimento para dentro do citoplasma através da formação de poros e invaginação da membrana plasmática. Este processo pode ser subdividido em quatro fases: ligação, fusão, formação de poros e penetração (WILD et al., 1998).

2.2.1. Multiplicação do vírus

Os Herpesvírus Bovinos são epitéliotrópicos, multiplicando-se inicialmente nas mucosas da região nasal, faringe e tonsilas. Após um primeiro ciclo de replicação viral na porta de entrada, o vírus pode prosseguir, via terminações nervosas dos ramos maxilar e mandibular do nervo trigêmeo até os gânglios sensoriais no sistema nervoso central, onde pode permanecer em latência, provavelmente

por toda a vida do hospedeiro (Babiuk et al., 1996; Engels e Ackermann, 1996; Flores et al., 1998; Osório, 1998). O BoHV-5, assim como o vírus da pseudorraiva (PRV), são hábeis em replicar dentro dos neurônios e células da glia e invadir o sistema nervoso central (SNC), causando encefalite e/ou distúrbios neurológicos (Engels e Ackermann, 1996).

2.2.2. Montagem

A síntese do DNA viral e a montagem do capsídeo ocorrem dentro do núcleo, e as proteínas estruturais sintetizadas no citoplasma migram para o núcleo para a formação do nucleocapsídeo. A produção da progênie viral invariavelmente é acompanhada de destruição irreversível da célula infectada, já que as partículas virais adquirem o envelope da membrana nuclear interna (Ben-Porat e Kaplan, 1973; Roizman, 1992).

2.2.3. Imunologia

A infecção primária estimula uma forte resposta humoral e a resposta imune mediada por células no hospedeiro. Anticorpos neutralizantes são rapidamente detectados (cerca de 10 dias após a infecção), principalmente IgM seguida por IgG. IgA neutralizante também pode ser encontrada nas secreções. Estes anticorpos neutralizantes são eficazes em eliminar vírus livres, mas a resposta imune mediada por células é sugerida como principal (Babiuk et al., 1996; Engels e Ackermann, 1996).

O organismo infectado é incapaz de eliminar os herpesvírus, apesar da forte resposta imune durante a infecção inicial. A disseminação local através de pontes intercelulares e transporte intra-axonal reduzem a presença de grandes quantidades de vírus livres, portanto, a eficiência da resposta imune humoral fica reduzida, enquanto o vírus se dissemina pelo organismo. Os vírus podem ainda bloquear o sistema de complemento e em infecções contínuas, reduzem a expressão de moléculas de MHC de classe I através do bloqueio do seu transporte até a membrana plasmática da célula infectada (Babiuk et al., 1996; Engels e Ackermann, 1996).

2.2.4. Latência

Biologicamente, o fato mais importante relativo à replicação dos Herpesvírus, reside no estabelecimento de latência. Na infecção latente o vírus não é detectado, porque apenas o seu genoma sob a forma circular é encontrado dentro da célula, não havendo expressão de nenhuma proteína ou polipeptídeo viral na membrana celular e não sendo, desta forma, detectado pelo sistema imune (Engels e Ackermann, 1996).

2.3. Estrutura do genoma do BoHV-5

A família *alphaherpesvirinae* apresenta seis grupos genômicos (designados de A até F). Assim como o BoHV-1, o BoHV-5 pertence ao grupo D e seu genoma se caracteriza por apresentar uma região única longa (UL) e uma região única curta (US) flanqueada por regiões de repetição invertida. Isto resulta na geração de duas fitas isoméricas durante a replicação do DNA viral (Engelhardt e Keil, 1996; Roizman, 1992). O BoHV-1 e 5 possuem a estrutura do seu genoma semelhante, isto é, a localização dos genes codificadores para as glicoproteínas é igual (Whetstone et al., 1993). As amostras do BoHV-1 e BoHV-5 possuem uma similaridade de aproximadamente 85% em seu DNA baseado na hibridização cruzada do genoma completo (Abdelmagid et al., 1995; Chowdhury, 1995; Engelhardt e Keil, 1996) (Fig. 1).

2.4. Glicoproteínas

Diferenças antigênicas têm sido reconhecidas entre a maioria das glicoproteínas do BoHV-5 e BoHV-1 (Belknap et al., 1994).

Os alphaherpesvírus, incluindo o Herpes Simplex (HHV-1 e 2), vírus da pseudorína (PRV) e BoHV-1 e 5, contêm um número de glicoproteínas estruturais e funcionais parcialmente homólogas as três glicoproteínas principais do BoHV-1, gB, gC e gD, anteriormente nomeadas gl, gIII e gIV, respectivamente (Abdelmagid et al., 1995; Chowdhury et al., 1997). A região genômica codificadora destas glicoproteínas - região única curta (US region), tem sido alvo da maioria dos estudos comparativos entre herpesvirus bovino 1 e 5 (Ashbaugh et al., 1997; Chowdhury, 1995; Engelhardt e Keil, 1996; Friedli e Metzler, 1987).

Dentre estas regiões, as codificadoras para as glicoproteínas tem um interesse especial, já que estas desempenham importantes papéis nos herpesvírus, como a interação vírus/célula, ligação e penetração, transmissão de virions entre as células e também com o sistema imune do hospedeiro, como ligações a componentes do sistema complemento ou imunoglobulinas (Abdelmagid et al., 1995; Babiuk et al., 1996; Chowdhury et al., 1997; Engels e Ackermann, 1996).



Figura 1. Diagrama esquemático da estrutura genômica do BoHV-1 (Extraído de Kaashoek et al., 1995).

Na interação do vírus com a célula, as glicoproteínas virais principais (gB, gC e gD) são muito importantes, sendo a gC considerada a proteína de maior envolvimento na fixação pela maioria dos herpesvírus, apesar de outras glicoproteínas também poderem estar envolvidas na fusão e penetração viral (Babiuk et al., 1996). A gC de vários alphaherpesvírus pode se ligar ao C3 dentro de uma espécie-específica, desestabilizando a C3 convertase e bloqueando o sistema complemento. A gC também está antigenicamente relacionada com glicoproteínas expressas na superfície celular de macrófagos e certos leucócitos (CD8+ citotóxicos), fato conhecido como mimetismo celular, bem como a gD, desempenhando importante papel na relação com o sistema imunológico do hospedeiro (Babiuk et al., 1996; Engels e Ackermann, 1996).

A seqüência completa da região Única Curta (US region) do BoHV-1 foi publicada com a posição das oito Janelas de Leitura (ORF) presentes. Estas incluem uma ORF única para o BoHV-1, designada ORF 1 (ou US1.5), e as outras ORF's que são homólogas ao herpes simplex - US2, Proteína Quinase (PK), gG, gD, gI, gE e US9. No fragmento K da região US do BoHV-1, que contém todas as regiões com exceção da US9, os genes não são necessários à replicação do BoHV-1 em cultura de tecidos, com exceção da gD (Furth et al., 1997).

Kaashoek e colaboradores (1995) relatam ainda que, de 223 isolados clínicos de BoHV-1, todos expressaram as glicoproteínas não essenciais (gC, gG, gI e gE), sugerindo que os genes codificadores para estas proteínas são bastante conservados. É importante salientar que os relatos sobre as proteínas ditas "não - essenciais para a replicação" dos herpesvírus bovinos, foram feitas para replicação *in vitro*, pois *in vivo* elas exercem importantes funções fenotípicas.

Dentro da região US, a janela cinco codifica a gD, janela quatro a gG, janela seis a gI e a janela sete a gE. Entre estas, a gG possui propriedades, localização e organização do gene codificante semelhante entre as gG's dos EHV-1, EHV-4, PRV, HHV-1 e HHV-2; mas, nos herpesvírus bovinos 1 e 5, ela é secretada como um glicoproteoglicano - gpgG (Engelhardt e Keil, 1996; Keil et al., 1996).

A síntese, processamento e secreção da gG e gpgG do BoHV-5 é bastante similar, ou idêntica, ao processo correspondente no BoHV-1 (Engelhardt e Keil, 1996).

2.4.1 Neurovirulência e Neuroinvasividade

Os genes codificadores da Timidina Quinase (TK) e gE estão relacionados com a virulência, mas não são essenciais, assim como a gC, gG e gI. Já a gB e gD são essenciais para a replicação viral. As gI e gE provavelmente formam um complexo funcional para exercerem suas funções, mas isto ainda não está bem explicado. A gD, gI e gE são relacionadas com a disseminação do vírus célula a célula. A função da gG ainda não está bem estabelecida (Kaashoek et al., 1995). A gE é proposta como participante da difusão de célula a célula, assim como a gH e gL também podem participar na interação do vírus com a célula. É sabido também, que para algumas amostras de herpesvírus, a gE e gI se acumulam em complexos, os quais agem como receptores Fc (Engels e Ackermann, 1996).

2.5. Propriedades Gerais

Os herpesvírus são especialmente sensíveis aos solventes lipídicos portanto, o BoHV-5 é inativado frente ao clorofórmio ou quando exposto por 15 segundos à temperatura de 60°C. Conserva-se em pH entre seis e nove, podendo permanecer no ambiente por até 30 dias, com temperaturas baixas e umidade relativa do ar de 90% (Gentry e Randall, 1973; Wentink et al., 1993).

2.6. Patogenia

Após um primeiro ciclo de replicação viral que ocorre no local de entrada, dentro das células epiteliais, inicia-se a fase aguda da infecção, que é caracterizada por sintomas clínicos evidentes e excreção abundante de altos títulos de vírus infecciosos com franca expansão da infecção para animais susceptíveis. Durante este período, há uma extensiva replicação viral nas membranas mucosas e, a partir deste ponto, o vírus é transportado centripetamente via retrógrada rapidamente pelo transporte axonal para os neurônios nos sítios primários de latência (gânglios sensoriais). O estado físico exato destas partículas virais ou subvirais

durante este processo de translocação ainda é desconhecido. No estado agudo da infecção ganglionar há uma infecção lítica dentro dos neurônios e células acessórias (Babiuk et al., 1996; Engels e Ackermann, 1996; Flores et al., 1998; Osório, 1998).

Ao final desta infecção aguda ganglionar, o vírus persiste dentro dos neurônios, provavelmente por toda a vida do hospedeiro, sob a forma de uma molécula circular fechada, onde somente uma pequena porção do gene viral é expressa. Nos animais infectados, estes vírus latentes podem ser reativados em resposta a diferentes estímulos como parição, estresse, superinfecção por outros agentes, tratamentos com dexametasona, ACTH, dentre outros, em diferentes frequências por toda a vida do hospedeiro carreador. Após a reativação, o vírus pode voltar aos sítios de entrada e ser reexcretado produzindo lesões primárias em contato com hospedeiros susceptíveis (Babiuk et al., 1996; Engels e Ackermann, 1996; Flores et al., 1998; Osório, 1998).

Tanto o BoHV-1 quanto o BoHV-5 são vírus neurotrópicos, mas, diferem em sua capacidade de causar encefalite (Belknap et al., 1994). Para avaliar esta diferença, Meyer e colaboradores (1996) inocularam BoHV-1 e BoHV-5 em coelhos (via intranasal). Além da presença do BoHV-5 ter sido confirmada no sistema nervoso central através de isolamento viral, somente os animais inoculados com este vírus apresentaram sinais clínicos de meningoencefalite. Em outro experimento, bezerros inoculados com BoHV-5 mostraram evidências de intensa replicação deste vírus no cérebro. Diferentemente, os bezerros inoculados com BoHV-1 não apresentaram lesão cerebral, e, o vírus não pode ser recuperado do tecido neural (Chowdhury et al., 1997).

A enfermidade neurológica é caracterizada por meningoencefalite, de curso geralmente fatal, afetando principalmente animais jovens (Lovato, 1998; Roche et al., 1998).

A multiplicação do vírus causa distúrbios na arquitetura celular, com o aparecimento de inclusões intranucleares, marginalização da cromatina e destruição dos nucléolos. O vírus adquire o envelope quando brota através da membrana celular (Fenner et al., 1993).

2.7. Transmissão

O BoHV-5 afeta principalmente os bovinos, sendo estes a principal fonte de infecção e disseminação da doença nos rebanhos. Wentink e colaboradores (1993) afirmam que apenas o contato íntimo entre mucosas tem importância epidemiológica, embora a disseminação através do ar, outros animais e pelo homem possa ser possível, mesmo não apresentando importância epidemiológica significativa. A disseminação viral ocorre principalmente por aerossóis e secreções corpóreas (Weiblen, 1996; citado por Salvador et al., 1998). A manutenção do vírus no rebanho depende da eficácia dos mecanismos de transmissão e, principalmente, da presença de hospedeiros susceptíveis (Salvador et al., 1998).

2.8. Achados Pós - mortem

A necrópsia, não se observam lesões significativas, mas achados como áreas de malácia, que se caracterizam por áreas de depressão com um a dois centímetros de diâmetro e coloração amarelada ou avermelhada no córtex cerebral; edema cerebral, visualizado pelo achatamento das circunvoluções cerebrais e projeção do cerebelo através do forâmen magno, foram descritos por Salvador e colaboradores (1998).

As principais alterações histológicas encontradas no SNC características da infecção por BoHV-5 são meningoencefalite difusa, não supurativa, associada à necrose do córtex cerebral e presença de corpúsculos de inclusão intranuclear eosinofílicos ou basofílicos em astrócitos e neurônios (Bagust e Clark, 1972; Hill et al., 1984 citados por Salvador et al., 1998).

2.9. Diagnóstico diferencial

Apesar de já terem sido descritos surtos no Brasil (Salvador et al., 1998; Weiblen et al., 1989), ainda há uma dificuldade de diagnóstico diferencial entre as principais enfermidades que afetam o sistema nervoso central de bovinos, como raiva, botulismo, poliencfalomalácia e encefalite por BHV-5, devido à semelhança dos sinais clínicos (Flores et al., 1998; Roche et al., 1998).

Atualmente, a lesão causada pelo BoHV-5 e poliencfalomalácia têm sido diferenciadas através da histopatologia. Já foram relatados erros de diagnóstico clínico e histológico entre BoHV-5 e poliencfalomalácia, devido às lesões inflamatórias discretas e necrose neuronal serem as principais alterações histológicas encontradas no SNC em ambas as enfermidades. Isto reforça a necessidade de um exame microscópico detalhado de todos os segmentos do encéfalo e se possível de todo o SNC, além de um bom levantamento e acompanhamento clínico - epidemiológico, aliado ao correto envio de amostras ao laboratório para o seu diagnóstico diferencial (Salvador et al., 1998).

A raiva apresenta encefalite e mielite linfocitária focal a difusa com presença de corpúsculos de Negri. O vírus pode ainda ser identificado por imunofluorescência e inoculação em camundongos. O botulismo não apresenta lesões histológicas significativas no SNC e a toxina pode ser identificada no soro, fígado e trato gastrointestinal (Salvador et al., 1998).

2.10. Diagnóstico BoHV-1 x BoHV-5

Os vírus isolados de casos de encefalite foram inicialmente identificados como BoHV-1, com base em seu efeito citopático em cultura de tecido, testes de imunofluorescência e testes de soroneutralização viral (Eugster et al., 1974; Friedli e Metzler, 1987). As amostras neurovirulentas de herpesvírus bovino, previamente classificadas como BoHV 1.3 foram recentemente reclassificadas como herpesvírus bovino 5 (BoHV-5) (ICTV, 2000).

O BoHV-5 e o BoHV-1 estão antigenicamente, geneticamente e biologicamente relacionados. Desta forma, a maioria dos testes laboratoriais não são capazes de distinguir estes dois vírus (Lovato, 1998; Roehle et al., 1998). Apenas recentemente, métodos sorológicos e virológicos de identificação e diferenciação de BoHV-5 e BoHV-1, em escala de campo, tem sido desenvolvidos (Silva et al., 1999).

Seal e Whetstone (1994) relatam que em cultivos celulares não existem diferenças morfológicas entre os isolados de BoHV-1 e BoHV-5, e o efeito citopático (ECP) visualizado nas células infectadas pelos Herpesvírus em geral é caracterizado por uma macrocitose, perda da

morfologia celular ficando estas bastante arredondadas, seguida da degeneração celular, podendo haver também formação de sincícios (Darlington e Granoff, 1973), tornando desta forma, o isolamento viral inconclusivo no diagnóstico diferencial, sendo necessário recorrer a outros métodos de diagnóstico para sua diferenciação, como foi também discutido por Salvador et al. (1998).

Como ambos os vírus são neurotrópicos, diferindo apenas na sua capacidade de invadir e replicar no sistema nervoso central, torna-se de grande importância a diferenciação entre eles. Anticorpos monoclonais contra as glicoproteínas virais podem identificar estes vírus, mas normalmente, os testes sorológicos reconhecem igualmente o BoHV-5 e o BoHV-1 (Ashbaugh et al., 1997).

Mulunch e Liebermann (1992), relatam que anticorpos que reagem em IFI contra amostras de referência falham em reagir nos testes de neutralização viral com as amostras isoladas de campo. No isolamento viral, após a visualização do efeito citopático, o agente envolvido é confirmado por testes de neutralização viral frente a um soro anti-BoHV-1 ou 5, ou através de imunofluorescência / imunoperoxidase com anticorpos específicos, policlonais ou monoclonais (Salvador et al., 1998).

Estes vírus também podem ser diferenciados através do uso de restrição enzimática ou pela PCR (Ashbaugh et al., 1997). Devido às dificuldades em se diferenciar estes vírus, a PCR vem se tornando a escolha para o desenvolvimento de um teste eficiente, principalmente, devido à sua especificidade, sensibilidade e rapidez. (Bellak e Ballagi-Pordány, 1993).

2.11. PCR em BoHV-5

A maioria dos estudos para a diferenciação entre o BoHV-1 e o BoHV-5 se concentra em biologia molecular, principalmente em estudos de restrição enzimática (Chowdhury, 1995; Engelhardt e Keil, 1996; Osório et al., 1985; Seal e Whetstone, 1994; Whetstone et al., 1993) e na infecção experimental e pesquisa de outros modelos animais para a compreensão da sua patogenia (Belknap et al., 1994; Chowdhury et al., 1997; Meyer et al., 1996; Silva et al., 1999).

Poucos estudos foram desenvolvidos utilizando a PCR como sistema diagnóstico para esta virose. Nos artigos demonstrando a técnica até a presente data, houve uma necessidade de utilização de pares de iniciadores internos (PCR "nested") para se conseguir uma amplificação de amostras clínicas. Segundo Rocha (1998), as reações de PCR "nested" utilizando iniciadores internos a um fragmento facilitam a amplificação dos Herpesvírus, principalmente em amostras de campo. Este segundo produto amplificado rende grande quantidade de DNA. Forghani e Erdman (1995), afirmam que o uso da PCR "nested" não só aumenta a sensibilidade do teste, como se mostra importante em amostras que contenham inibidores.

Para amostras parafinadas, cujo DNA pode estar degradado ou fragmentado, além da possibilidade de conter inibidores químicos, se recomenda também o uso da PCR "nested" (Wright e Manos, 1990).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Células

Foi utilizada a linhagem contínua de células renais de bovino (Madin-Darby Bovine Kidney - MDBK) cultivada em meio de crescimento mínimo de Eagle, suplementado com soro fetal bovino (SFB) inativado e livre de vírus e anticorpos para o vírus da Diarréia Bovina a Vírus e BoHV-1, com uma confluência de 80% para inoculação das amostras padrão.

3.2. Vírus

Foram utilizadas as amostras EVI - 88 (isolado brasileiro) e A663 (isolado argentino) de BoHV-5, ambas recebidas na 7ª passagem em células MDBK, cedidas pelos doutores Paulo Roche (Centro de Pesquisas Veterinárias "Desidério Finamor" / FEPAGRO, Porto Alegre RS) e Rudi Weiblen (Departamento de Medicina Veterinária Preventiva / Microbiologia da Universidade Federal de Santa Maria, RS), respectivamente. A amostra padrão Colorado do BHV-1 (ATCC - VR 864) também foi utilizada como referência. As amostras foram cultivadas (Laboratório de Vírus / Departamento de Medicina Veterinária Preventiva / Escola de Veterinária / UFMG) e o título de cada amostra

de BHV-5 foi calculado pelo método de Reed e Muench (1938).

3.3. Especificidade

Para avaliar a especificidade do teste desenvolvido, foram utilizadas as seguintes amostras de Herpesvírus Humanos: Herpes simplex 1, Herpes simplex 2, Herpesvírus humano 6, isolado clínico de Varicela zooster e Citomegalovírus, cedidos pela Doutora Erna Geessien Kroon (Laboratório de Vírus/ICB/UFMG), e as seguintes amostras animais: Herpesvírus Equino 1 e Herpesvírus Bovino 1, amostra Colorado (ATCC - VR 864), cedidas pelo Departamento de Medicina Veterinária Preventiva / Escola de Veterinária / UFMG.

3.4. Sensibilidade

Sobrenadante de cultivo celular (Células MDBK), inoculados com a amostra EVI-88, com o título inicial calculado em $10^{6,25}$ TCID₅₀/50µl pelo método de Reed e Muench (1938), foi diluído de forma seriada decimal obtendo uma diluição final de $10^{-4,25}$, para avaliação da sensibilidade da PCR. Este procedimento foi também realizado com o DNA destas mesmas amostras diluídas, extraído com a resina Chelex 100®.

3.5. Amostras clínicas

Foram utilizadas 17 amostras de material parafinado (SNC) provenientes de animais que apresentaram quadros de sintomatologia nervosa; este material faz parte do acervo do Setor de Patologia da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais e foram cedidas pelo professor Roberto Mauricio Carvalho Guedes. Estas amostras tiveram o diagnóstico inconclusivo e constituem um estudo retrospectivo de 20 anos (1978-1998). Utilizou-se também três amostras de material parafinado provenientes do estado de São Paulo, cedidas pelo professor Luiz Cláudio Nogueira Mendes, do Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal da Unesp - Campus de Araçatuba. Estas amostras são provenientes de animais que morreram com sintomatologia nervosa. Após exame histopatológico foi diagnosticada meningoencefalite e encefalite não-supurativa de provável etiologia viral.

3.6. Extração do DNA viral

3.6.1. Extração do DNA viral de cultivo celular

O DNA das amostras víricas crescidas em células foi obtido por fervura utilizando-se a resina Chelex 100® (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) segundo Walsh e colaboradores (1991) com modificações: adicionou-se 200 µl de Chelex 100 a 5% em água ultrapura; sete µl de DTT 1M (BioRad, CA, USA), dois µl de proteinase K - 10 mg/ml (Merck, Germany) e 50 µl de sobrenadante de cultivo celular. Após inverter o tubo suavemente para homogeneizar seu conteúdo, as amostras foram incubadas a 56°C por 45 minutos. Em seguida as amostras foram agitadas rapidamente e centrifugadas por 30 segundos a 13.000 g. Os tubos foram então aquecidos a 95°C por oito minutos, novamente agitados rapidamente e subseqüentemente centrifugados por três minutos a 13.000 g e refrigerados até o uso na PCR.

3.6.2. Extração do DNA viral de amostras clínicas

As amostras clínicas em blocos de parafina, foram cortadas (5µm) e montadas em lâminas de microscopia. O DNA foi extraído através de um protocolo montado com base em Ben - Ezra e colaboradores (1991) e Greer e colaboradores (1991), com algumas modificações: o excesso de parafina da lâmina foi removido com uma chama, e em seguida foi retirado o material com uma agulha nova flambada, através de raspagem para um tubo de 1,5 ml. O resto da parafina foi removido por incubação em 900 µl de Xilol à temperatura ambiente, sob vigorosa agitação por trinta minutos. A amostra foi centrifugada a 1400 rpm por quinze a vinte minutos, formando um sedimento. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado duas vezes com Etanol 100% (900 µl) e centrifugando a 13.000 g por quinze a vinte minutos. Após, o sobrenadante foi desprezado com micropipeta. O sedimento formado foi secado a vácuo por quinze minutos à temperatura ambiente. Ressuspendeu-se o sedimento em 100 µl de tampão de digestão (Tris 50mM pH 8,5; EDTA 1 mM; Tween 20 - 0,5%), adicionando-se, somente na hora do uso proteinase K em uma concentração final no total do tampão utilizado de 0,2 mg / ml. Incubou-se a 37°C por três dias, adicionando, a cada dia,

três µl de proteinase K a 20 mg/ml. Após este período, centrifugou-se a 1400 rpm por quinze minutos e o sobrenadante foi transferido para um tubo novo e aquecido a 95°C por oito minutos para inativar a proteinase K. O material foi estocado a 4°C até o momento do uso.

3.7. PCR

3.7.1. Iniciadores

O desenho dos pares de iniciadores foi baseado na seqüência da região US4 (codificadora do glicoproteoglicano G) do BoHV-5 - GenBank acesso X99755 (Engelhardt e Keil, 1996). A síntese foi efetuada pela Gibco-BRL (USA). O estudo dos iniciadores no tocante às temperaturas de utilização e condições salinas foi feito utilizando-se o programa Oligo Primer Analysis (Rychlik e Rhoads, 1989). A seqüência dos iniciadores e suas respectivas localizações estão descritas na Tabela 1.

3.7.2. Amplificação

A PCR foi realizada diretamente a partir do cultivo celular (após três ciclos de congelamento / descongelamento) ou a partir do DNA extraído do sobrenadante de cultivo celular e diluído 1/10 com as amostras padrão (EVI 88 - BoHV-5, A663 - BoHV-5 e Colorado - BoHV-1) e os iniciadores de 592 pb (Tab. 1). A temperatura de pareamento foi variada de 60°C, até 63°C e a concentração de MgCl₂ entre 0,5 e 2,5 mM, sendo escolhida a concentração de 1,5 mM e temperatura de 61°C. As reações foram realizadas em um volume total de 20 µl, contendo tampão da Taq 10X, MgCl₂ 1,5 mM, 1,0µl de cada iniciador 10 pM/µl, glicerol 1% (v/v), DMSO 1% (v/v), dNTPs 200 µM, 0,5 U de Taq DNA polimerase, água q.s.p. para 20µl e 1,0 µl da amostra. Uma fina camada de óleo mineral foi adicionada a cada tubo. O programa utilizado consistiu de uma etapa a 98°C por um minuto, seguida por 35 ciclos de 95°C por um minuto, 61°C durante um minuto, de 72°C por um minuto e uma etapa final de extensão de seis minutos a 72°C.

Para avaliação das amostras parafinadas utilizou-se sempre PCR "nested". Após a extração do DNA das amostras parafinadas (Bem - Ezra et al., 1991; Greer et al., 1991) e

diluição 1/10, procedeu-se a PCR utilizando as combinações de iniciadores, como descrito na Tabela 2.

3.8. Análise dos produtos de PCR

3.8.1. Eletroforese em géis de poliacrilamida e agarose

Nove microlitros de cada reação de PCR foram submetidos à eletroforese (100 V por duas horas) em géis de poliacrilamida 6% , corridos

em tampão TBE (89 mM Tris-Borato, 2 mM EDTA, pH 8.2) e corados pela prata segundo Dias Neto (1996). Alternativamente, o produto de PCR foi visualizado em géis de agarose, corados com brometo de etídeo. Para determinação do tamanho dos produtos de PCR foram incluídos em cada corrida um marcador de tamanho molecular, o plasmídeo pEL 45 digerido com a enzima Hind III, com fragmentos variando entre 265 a 3801 pares de base.

Tabela 1 Sequência dos iniciadores utilizados e tamanho do fragmento amplificado.

Tamanho do fragmento amplificado (posição na sequência X99755)	Sequência do iniciador senso	Sequência do iniciador anti-senso
1297 (s - 179-199; as - 1476-1456)	gct gtt ttg ggg cgc ccc gcg	gta ggg gaa act gcg ggc aga
592 (s - 873-892; as - 1465-1446)	ccg gcg att acg agg acg ag	tgc ggg cag acg cgg gcg cg
222 (s - 937-956; as - 1158-1133)	tac gga ctg ccg gat taa ca	gtc acc act acc acc gcc gcc aac at

s - senso

as - anti-senso

3.9. Seqüenciamento do produto de PCR

3.9.1. Purificação do produto da PCR

A amostra padrão EVI - 88 foi novamente amplificada em um volume de 50 µl. A banda desejada foi visualizada através de ondas curtas de luz ultravioleta em gel de agarose 1% corado por brometo de etídio. A banda foi então retirada do gel com auxílio de bisturi, colocada em tubo de 1.5 ml e purificada com o kit WIZARD® PCR Preps DNA Purification System (Promega) conforme protocolo do fabricante. Alternativamente utilizou-se a purificação diretamente do produto de PCR.

3.9.2. Seqüenciamento e análise da seqüência

A reação de seqüenciamento foi feita por ciclagem térmica em um seqüenciador automático (ALF, Pharmacia, Sweden), no Instituto Ludwig, São Paulo, SP. A seqüência obtida foi editada e avaliada para a remoção de seqüências dos iniciadores, além da possível resolução de algumas ambigüidades e verificação da existência de quimeras. A seqüência editada foi então analisada para a determinação de similaridades em relação aos ácidos nucléicos e aminoácidos, utilizando-se os programas Blast N e Blast X, na versão "gapped", contra os bancos de dados nr e dbEST. Estes programas se encontram disponíveis no endereço eletrônico do "National Institute of Health-NCBI" (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). O alinhamento foi efetuado através do programa MultiAlin (<http://www.toulouse.inra.fr/multalin.html>). As amostras utilizadas foram as seguintes: X99755 (BoHV-5), X99754, Z98199 e AJ004801 (BoHV-1), e Z23068 (BoHV-1.2). Utilizou-se também o programa Treecon® 3.1 para windows (Van der Peer e Wachter, 1994) com correção de Jukes e Cantor e análise de "Bootstrap" para a montagem da árvore filogenética da seqüência amplificada, comparando esta com outras seqüências depositadas no GenBank (X99755 (BoHV-5),

X99754, Z98199 e AJ004801 (BoHV-1), e Z23068 (BoHV-1.2))

4. RESULTADOS

4.1. Otimização das etapas da PCR

A Figura 2 apresenta a amplificação de um fragmento de aproximadamente 592 pb. Utilizou-se a temperatura de 61°C e concentração de MgCl₂ de 1.5 mM. Nenhuma amplificação foi visualizada quando utilizou-se como molde o BoHV-1 (Canaletas 4 e 7).

4.2. Sensibilidade da PCR

As amostras padrão do BoHV-5 crescidas em células MDBK foram tituladas pelo método de Reed E Muench, sendo encontrado título de 10^{6.25} TCID₅₀/50µl e 10^{6.55} TCID₅₀/50µl para o EVI-88 e A663, respectivamente. Para avaliar a sensibilidade da PCR, foi escolhida a amostra EVI-88, por ser um isolado brasileiro. A partir do título inicial foram feitas diluições seriadas até a concentração de 10^{-4.25} TCID₅₀/50µl do sobrenadante do cultivo celular. De cada uma destas diluições foi extraído o DNA e submetidos a PCR.

4.2.1. Sensibilidade com o cultivo celular

A Figura 3 apresenta a amplificação de um fragmento de 592 pb do sobrenadante de cultivo celular, observando-se a amplificação da concentração inicial 10^{6.25} TCID₅₀/50µl até a décima diluição 10^{-3.25} TCID₅₀/50µl.

4.2.2 Sensibilidade com o DNA extraído

Após a diluição seriada do sobrenadante de cultivo celular (4.2.1), cada alíquota teve o DNA extraído por chelex para avaliação da sensibilidade. Na Figura 4 observa-se a amplificação de um fragmento de 592 pb da concentração 10^{5.25} TCID₅₀/50µl (canaleta 3) até 10^{-1.25} TCID₅₀/50µl (canaleta 9).

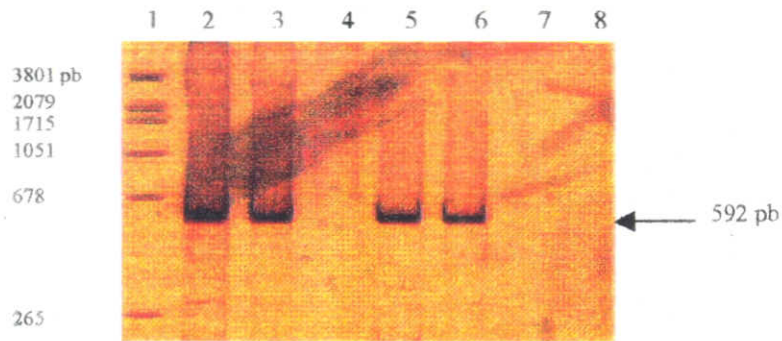


Figura 2: Gel de poliacrilamida 6%, corado pela prata, apresentando um amplificado de 592 pb. Canaleta 1 - Padrão de tamanho molecular (pEL Hind III). Amostras do sobrenadante de cultivo celular: Canaleta 2 - EVI 88, Canaleta 3 - A663, Canaleta 4 - BoHV-1. Amostras de DNA diluídas 1/10 após extração do sobrenadante de cultivo celular: Canaleta 5 - EVI 88, Canaleta 6 - A663, Canaleta 7 - BoHV-1. Canaleta 8 - Controle negativo.

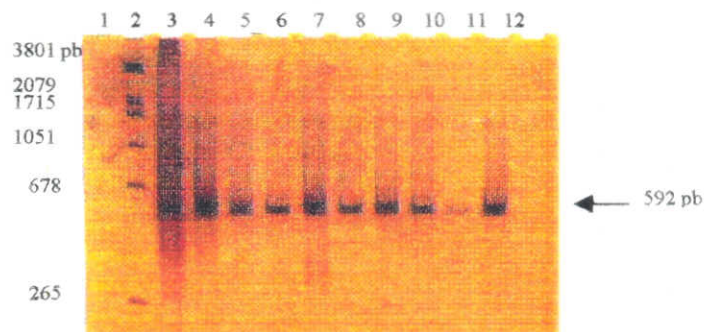


Figura 3: Gel de poliacrilamida 6%, corado pela prata, apresentando a sensibilidade da PCR com a diluição do sobrenadante de cultivo celular da amostra EVI 88 do BoHV-5. Canaleta 1 - Controle negativo, Canaleta 2 - Padrão de tamanho molecular (pEL Hind III), Canaletas 3 a 13: diluições decimais seriadas do sobrenadante de cultivo celular da amostra EVI 88 do BoHV-5, de $10^{6,25}$ até $10^{-4,25}$ TCID₅₀/50µl.

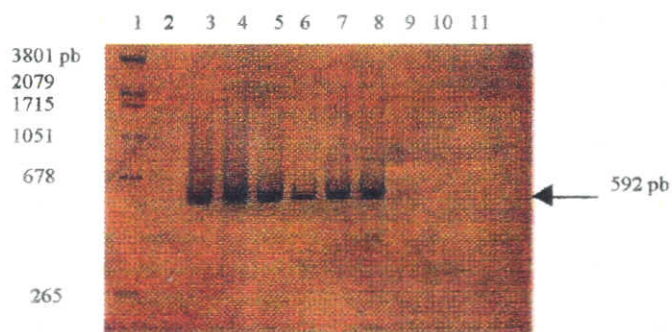


Figura 4: Gel de poliacrilamida 6%, corado pela prata, apresentando a sensibilidade da PCR com as amostras de DNA extraído. Canaleta 1 - Padrão de tamanho molecular (pEL Hind III), Canaletas 2 a 11 - DNA extraído com chelex à partir das diluições seriadas do sobrenadante de cultivo celular (EVI 88 - BoHV-5).

4.3. Especificidade da PCR

Amostras de Herpesvírus animais e humanos foram utilizadas para o teste de especificidade. Excetuando as amostras de BoHV-5, nenhuma outra amostra de Herpesvírus submetida a este teste de PCR foi amplificada (Fig. 5).

4.4. Amostras clínicas

4.4.1 PCR

Das 20 amostras parafinadas testadas, sete (35%) foram positivas. De 17 amostras provenientes do estudo retrospectivo de 20 anos com resultados inconclusivos sobre a causa da sintomatologia nervosa, cinco foram positivos pela PCR (29%). Das três amostras obtidas de casos clínicos ocorridos em São Paulo, duas (67%) foram positivas. Do total de sete amostras positivas em PCR, duas amplificaram com as três combinações de iniciadores, três com duas

combinações e duas somente com uma combinação. A Figura 6 apresenta o resultado obtido com os iniciadores de 222 pb.

4.4.2. Histórico das amostras de campo

A Tabela 3 apresenta os dados referentes às amostras parafinadas positivas em PCR. No estudo retrospectivo com amostras provenientes do acervo da Escola de Veterinária (Departamento de Patologia), amostras 20179, 20241, 21356, 21909 e 21511, observou-se que em quatro das cinco amostras positivas (80%), os animais possuíam de cinco a dezoito meses, o mesmo se repetindo nas duas amostras provenientes dos surtos ocorridos no estado de São Paulo. A sintomatologia relatada foi semelhante, incluindo incoordenação motora, dificuldade de deglutição, andar cambaleante, andar em círculos, movimentos de pedalagem e salivação.

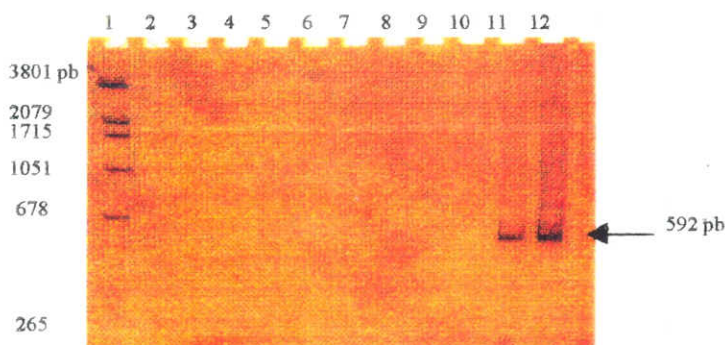


Figura 5: Gel de poliacrilamida 6%, corado pela prata, apresentando a especificidade da PCR. Canaleta 1 - Padrão de tamanho molecular (pEL Hind III), Canaleta 2 - Controle negativo, Canaleta 3 - Citomegalovírus, Canaleta 4 - Herpesvírus Humano 6, Canaleta 5 - Varicela zooster, Canaleta 6 - Herpes simplex 1, Canaleta 7 - Herpes simplex 2, Canaleta 8 - Herpesvírus Equino, Canaleta 9 - BoHV-1 sobrenadante de cultivo celular, Canaleta 10 - BoHV-1 DNA extraído e diluído 1/10, Canaleta 11 - EVI 88 DNA extraído e diluído 1/10 e Canaleta 12 - EVI 88 sobrenadante de cultivo celular.

Tabela 2 Combinações dos iniciadores utilizados e resultados da PCR.

Combinação de iniciadores	Ext. 1297/Int. 592	Ext. 1297/Int. 222	Ext. 592/Int. 222
Amostras			
20179 - MG	+ ¹	+	+
21909 - MG	+	+	+
20241 - ES	- ²	+	+
21511 - MG	-	-	+
21356 - MG	-	+	-
N 33 / 96 - SP	-	+	+
N 148 / 93 - SP	-	+	+

1: + (Positivo) na PCR.

2: - (Negativo) na PCR.

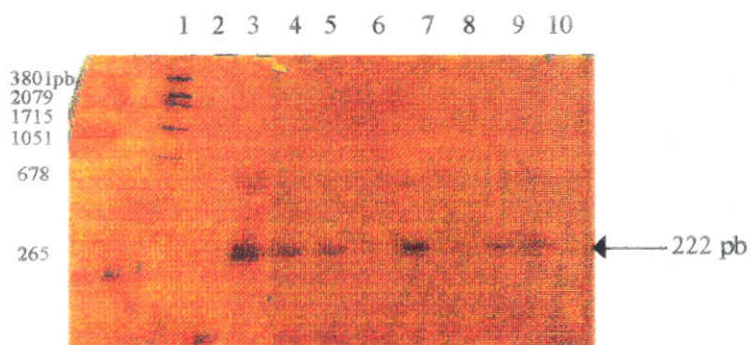


Figura 6: Gel de poliacrilamida 6%, corado pela prata, apresentando o resultado da PCR "nested" com material parafinado. Canaleta 1 - Padrão de tamanho molecular (pEL Hind III), Canaleta 2 - Controle negativo, Canaleta 3 - Amostra padrão BoHV-5 - EVI 88, Canaletas 4 a 10 - Amostras parafinadas amplificadas utilizando os iniciadores Externo 1297 e Interno 222 pb.

Tabela 3 Amostras positivas na PCR com suas respectivas identificações e achados histopatológicos

Amostra	Data	Peça	Raça	Sexo	Idade	Procedência	Sintomas clínicos	Diagnóstico Histopatológico
20179	31/05/88	Encefalo	HPE *	F	18 meses	Monsenhor Paulo - MG	Incoordenação motora, dificuldade de locomoção dificuldade de deglutição e hemoglobinúria.	-
20241	10/08/88	Cérebro	Mestiça	F	6 anos	Ecoporanga ES	Sintomatologia nervosa, morte em 3-4 dias (IF para Raiva negativa).	Encefalite não supurada aguda.
21356	16/03/93	Cérebro, cerebelo e medula	Gir	F	-	MG	Animais jovens (8 a 10 meses) com problemas respiratórios, tosse, conjuntivite e lacrimejamento.	Meningoencefalite não supurada crônica.
21909	18/01/95	Cérebro, cerebelo, medula oblonga e gânglio trigeminal	Girolando	F	5 meses	Matozinhos MG	"Suspeita de Raiva"	Cérebro - Manguito perivascular com células linfocitárias e congestão. Cerebelo - congestão de meninges e vasos da córtex, manguito perivascular com células linfocitárias. Gânglio trigeminal - ganglioneurite não supurada. Medula - Manguito semelhante ao acima descrito e focos hemorrágicos. Encefalomielite não purulenta e gangliomielite não purulenta.
21511	09/09/93	Cérebro, cerebelo, medula e hipocampo	-	M	9 meses	Itauna - MG	Alimentando normalmente, babando, cambaleante, andando em círculos e movimentos de pedalagem.	Mielite não supurada.
N - 148	1993	Encefalo	SRD **	M	15 meses	Guararapes - SP	Apatia e anorexia, seguido de decubito e sialorréia. Após trismo mandibular, andar em círculos e movimentos de pedalagem.	Meningoencefalite de provável etiologia viral.
N - 33	1996	Cérebro	SRD **	F	6 meses	Birigui - SP	Proprietário relata a morte de 7 animais de diferentes idades. Animais a pasto. Salivando e segundo o proprietário, com os olhos "vidrados".	Infiltrado mononuclear intersticial discreto, predominante ao redor dos vasos. Congestão vascular accentuada. Encefalite não - supurativa multifocal moderada, sugestivo de infecção viral.

* HPE - Holandês Preto e Branco.

** SRD - Sem Raça Definida

4.5. Seqüenciamento, alinhamento e inferência filogenética

A amostra EVI-88 foi amplificada e o fragmento de 592 pb (seqüência parcial da região US4) foi seqüenciado após purificação (3.9.2). Após a edição, a seqüência foi submetido ao GenBank (461 pb), tendo recebido o número de acesso AF250038 (Fig. 7).

Na Figura 8, observou-se entre as duas amostra de BoHV-5, 11 trocas distribuídas ao longo do fragmento genômico. Comparando-se a amostra EVI 88 com as amostras de Herpesvírus Bovino 1, observa-se 114 trocas ao longo do fragmento genômico. Importante notar a ocorrência de deleções: Uma deleção (posição 566) e duas outras deleções de três bases (posição 23, 24 e 25; e 37, 38 e 39) e duas inserções de seis bases (posição 247 a 252) e nove bases (posição 276 a

284), que claramente mostram a diferença entre as amostras de BoHV-5 e BoHV-1, neste fragmento genômico analisado.

A árvore filogenética foi construída com as amostras de BoHV-5 (EVI-88 / AF250038 e X99755) e algumas amostras de BoHV-1 depositadas no GenBank (X99754 /BoHV-1; Z23068 /BoHV-1.2; AJ004801 / BoHV-1 e Z98199 / BoHV-1). Pode ser observado na Figura 9 a formação de um "Cluster" entre as amostras EVI-88 e X99755 (BoHV-5), com um bootstrap de 100. As amostras de BHV-1 formam um outro "Cluster" com um bootstrap também de 100, sendo este braço separado em um "Cluster" contendo as três amostras de BoHV-1 (Bootstrap 90) e um outro braço onde foi alocada a amostra de BoHV-1.2 (amostras que se replicam no sistema genital).

AF250038. Bovine herpesvirus...[gi:7595951]
 LOCUS AF250038 561 bp DNA VRL 19-APR-2000
 DEFINITION Bovine herpesvirus 5 glycoproteoglycan G (US4) gene, partial cds.
 ACCESSION AF250038
 VERSION AF250038.1 GI:7595951
 KEYWORDS
 SOURCE Bovine herpesvirus 5.
 ORGANISM Bovine herpesvirus 5
 Viruses: dsDNA viruses, no RNA stage; Herpesviridae;
 Alphaherpesvirinae.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 561)
 AUTHORS Barbosa,E.F., Rocha,M.A., Roehle,P.M. and Botelho,R.G.A.
 TITLE Bovine herpes virus 5 partial sequence of US4 gene from Brazilian
 isolate EVI-88
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 561)
 AUTHORS Barbosa,E.F., Rocha,M.A., Roehle,P.M. and Botelho,R.G.A.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (28-MAR-2000) Microbiologia / ICB, Universidade Federal
 de Minas Gerais, Avenida Antonio Carlos 6627. Caixa Postal 486,
 Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..561
 /organism="Bovine herpesvirus 5"
 /isolate="EVI-88"
 /db_xref="taxon:35244"
 /country="Brazil"
 /note="PCR product; isolated in 1995 from a bovine with
 encephalitis."
 gene <1..543
 /gene="US4"
 CDS <1..543
 /gene="US4"
 /codon_start=1
 /product="glycoproteoglycan G"
 /protein_id="AAF64513.1"
 /db_xref="GI:7595952"
 /translation="DGSASGDRQEKDPDLTECRINRLFDESDFRNASGPDSSLIGAV
 AKGILTMPLGLPVGRSYEALRNASLECNARMRETGEMLAADVVTPTPPPKSARSERR
 SDSRAITDSDFGLFGLPTDPA'RRAILIGLAIALLVLLFSLVIVICACQLARKATAER
 RARAAQFGKDNPA'YEPIVRV"
 BASE COUNT 88 a 201 c 174 g 98 t
 ORIGIN
 1 gacgggagcg ctacggggga ccgacaggaa aaagaccccg atcttacgga gtgccggatt
 61 aacaggctct tcgacgagag cgacatgttc cggaaagcca gcgggcccga ctgctgcta
 121 atcggcgccg tcgcaaggcg catcttgacc atgccccttg gcctgccggt tggccgctct
 181 tacgaggccc tcggaacgc ctgctggag tgcaacgccc gcatgcgca gaccggcgag
 241 atgttgccgg cggtggtagt ggtgacgcca ccaccgccc agaagtcgc cgcctccgag
 301 cgccgctccg attccgggc aaccgactcg gattttgggc tctttgctt gccactgat
 361 cccgccacgc ggcgcgcat cctcatcgc ctcgcgatc ctttctagt gctgctgtc
 421 tcgctggtta ttgtatcat ctgccttgc cagctcggc gcaaggccac cgccgaacgg
 481 cgggcccgcg ccgcccagtt tggcaaat aacctgcgt acgagccat tgcccgcgtc
 541 taggaccccc cggcgcgccc g
 //

Figura 7: Sequência submetida ao GenBank, com seus respectivos códigos e número de acesso.

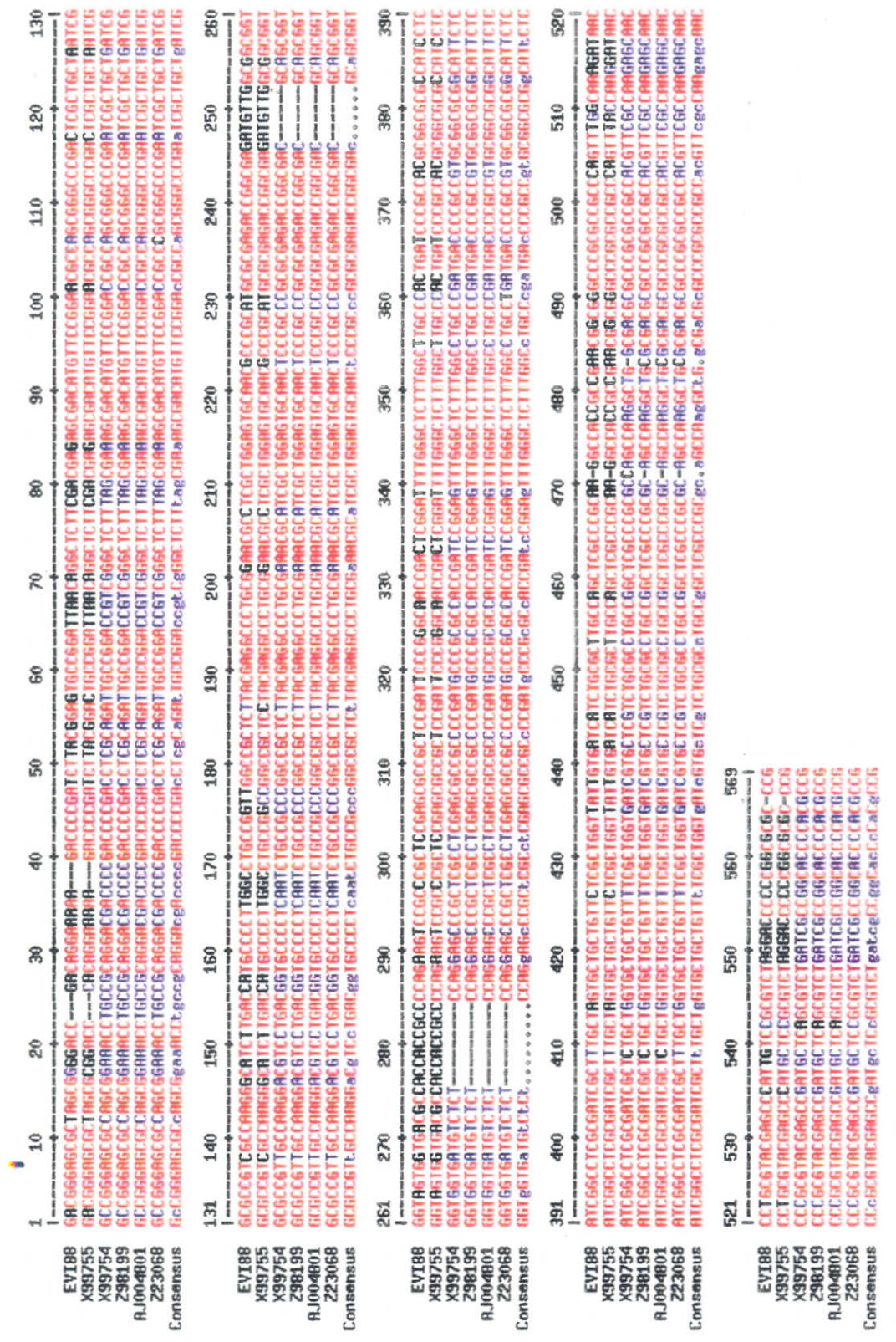


Figura 8: Alinhamento da sequência amplificada comparando com outra sequência de BoHV-5 e quatro sequências de BoHV-1 depositadas no GenBank.

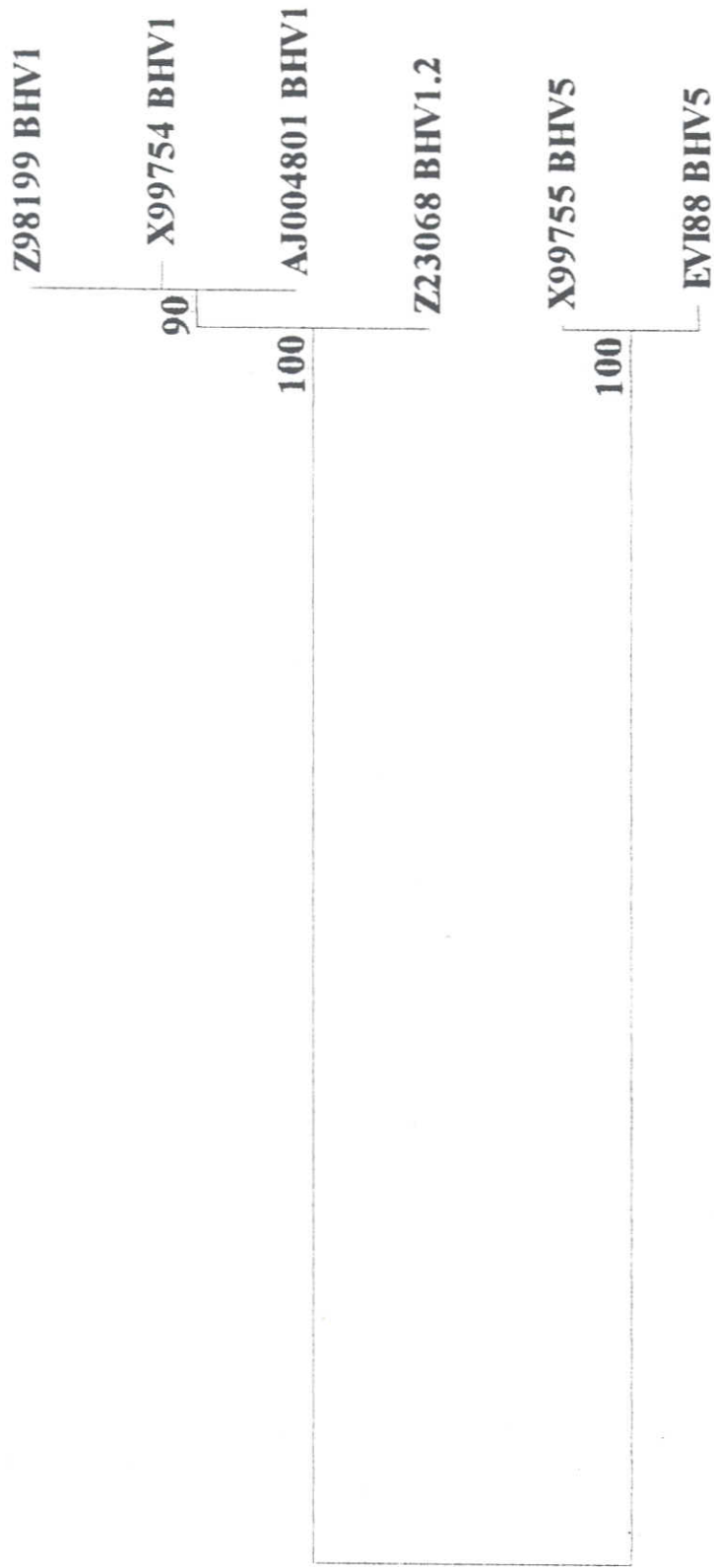


Figura 9: Árvore Filogenética construída com o programa Treecon® utilizando a sequência parcial da região US4 e amostras de herpesvirus Bovino 1 e 5. Os valores dos nós representam análise de Bootstrap (valores acima de 90%).

5. DISCUSSÃO

Neste trabalho foram desenvolvidos testes de PCR para a detecção do Herpesvirus Bovino 5, tanto em amostras isoladas em cultivo celular, quanto em DNA extraído de amostras parafinadas do SNC, provenientes de casos clínicos. Os iniciadores utilizados foram desenhados com base na região US4 do genoma do BoHV-5, utilizando a amostra depositada no GenBank - acesso X99755 (Engelhardt e Keil, 1996). A escolha desta região se deveu ao fato de ser extremamente conservada nos herpesvírus (Engelhardt e Keil, 1996; Furth et al., 1997; Kaashoek et al., 1995; Keil et al., 1996), embora apresente regiões diferenciadas para os herpesvírus bovinos 1 e 5, o que possibilitou o desenvolvimento de uma PCR capaz de detectar especificamente o BoHV-5.

A necessidade de desenvolvimento de testes de PCR para o diagnóstico dos herpesvírus bovinos é reforçada devido à dificuldade em se diferenciar as viroses induzidas por BoHV-1 e BoHV-5 por métodos tradicionais, como o cultivo ou sorologia (Engelhardt e Keil, 1996; Furth et al., 1997; Kaashoek et al., 1995; Keil et al., 1996).

A PCR foi inicialmente padronizada utilizando-se os iniciadores de 592 pb (Tab. 1), e como molde o sobrenadante do cultivo das amostras padrão EVI 88 (BoHV-5), A663 (BoHV-5) e Colorado (BoHV-1). Após o ajuste de $MgCl_2$, temperatura e outros componentes, o teste foi capaz de amplificar especificamente as duas amostras de BoHV-5, utilizando uma só etapa de PCR, não necessitando, nesta fase, o uso de reação "nested". A sensibilidade foi avaliada com a amostra EVI 88 (BoHV-5), e o limite de detecção foi de $10^{-3,25}$ TCID₅₀/50µl, ou 0,0006 TCID₅₀/50µl. Após a extração do DNA dos mesmos sobrenadantes já diluídos, utilizando a resina Chelex[®], a sensibilidade foi de $10^{-1,25}$ TCID₅₀/50µl, ou 0,06 TCID₅₀/50µl, demonstrando que durante a extração do DNA com este método, que utiliza fervura, pode haver uma perda de material, embora seja ainda uma sensibilidade bastante alta.

A utilização de géis de poliacrilamida seguido da coloração pela prata, para a visualização dos amplicons, também favoreceu a alta da

sensibilidade do teste desenvolvido, como já foi descrito por outros autores (Caballero et al., 1997; Rocha et al., 1998 e 1999; Sanguinetti et al., 1994).

Devido à grande similaridade entre as principais glicoproteínas dos membros da família herpesviridae, testou-se a PCR desenvolvida frente a sete outros membros da família (Herpes simplex 1 e 2, Herpesvirus humano 6, Varicela zoster, Citomegalovírus, Herpesvirus equino e Herpesvírus bovino 1), não amplificando nenhum destes, com exceção das amostras de BoHV-5. Para confirmação desta especificidade, também foi realizado o seqüenciamento do fragmento amplificado, o qual foi depositado no GenBank obtendo o acesso AF250038. Como pôde ser verificado através do alinhamento, trocas, inserções e deleções foram observadas entre a amostra utilizada como padrão para o desenvolvimento do teste (EVI 88) e as amostras de BoHV-1 e BoHV-1.2 escolhidas, confirmando mais uma vez a especificidade do fragmento amplificado. A partir deste seqüenciamento também foi montada a árvore filogenética com estas amostras, sendo que a amostra EVI 88 (AF250038) formou um "Cluster" apenas com a outra amostra de BoHV-5 (X99755) alocada, com um bootstrap de 100%.

Padronizadas as amplificações tanto diretamente do sobrenadante de cultivo celular, quanto após a extração do DNA das amostras padrão cultivadas (A663 e EVI 88), foi iniciado o trabalho com as amostras de campo. Nesta etapa padronizou-se uma extração de DNA para material parafinado (Ben-Ezra et al., 1991; Greer et al., 1991) com um bom rendimento. Foram utilizados dois pares adicionais de iniciadores internos (Tab. 1), pois nenhuma amostra clínica foi amplificada sem a utilização da PCR "nested" nos testes iniciais. É discutido na literatura o aumento da sensibilidade da PCR, para amostras clínicas, através do uso da reação "nested" (Forghani e Erdman, 1995; Wright e Manos, 1990). Rocha et al. (1998, 1999), utilizaram o sistema "nested" para amplificação de BoHV-1 em amostras clínicas de sêmen e feto abortado. Ely e colaboradores (1996), desenvolveram um sistema de PCR "nested", baseado no gene da TK, para diagnóstico diferencial entre BoHV-5 e BoHV-1, utilizando material parafinado. Este ensaio amplificou igualmente um fragmento de 302 pb tanto do BoHV-5 quanto o BoHV-1,

necessitando do uso de restrição enzimática para sua diferenciação, o que dificulta e encarece este teste para diagnóstico de campo. Trabalhando com animais experimentalmente inoculados, Ashbaugh e colaboradores (1997), desenvolveram um sistema de PCR "nested", baseado na região que codifica a glicoproteína C, que é um gene bastante conservado nos Herpesvirus Bovinos, mas é homólogo entre vários membros da família *Herpesviridae* (Abdelmagid et al., 1995; Chowdhury et al., 1997; Kaashoek et al., 1995). Este teste também amplificou tanto o BoHV-5 quanto o BoHV-1, diferenciando-os no resultado pelo tamanho (pb) do material amplificado.

Utilizando a PCR aqui descrita, 17 amostras parafinadas de SNC pertencentes ao acervo da Escola de Veterinária, cinco foram positivas (29%), e de três amostras provenientes de surtos de encefalite no estado de São Paulo, duas foram positivas (67%), com uma positividade total de 35%; e foi amplificado apenas o BoHV - 5, não necessitando de nenhum outro teste para a confirmação ou diferenciação com o BoHV - 1.

Como visto na Tabela 2, algumas amostras amplificaram com as três combinações de iniciadores, outras só em duas combinações e outra ainda somente com uma combinação. Segundo Wright e Manos (1990), pode ocorrer fragmentação e degradação do DNA no material parafinado bem como a existência de inibidores, dificultando a amplificação neste tipo de material. Ben-Ezra e colaboradores (1991), discutem ainda a qualidade do preparo das lâminas, principalmente a etapa de fixação no tocante ao tempo e fixador utilizados, como essenciais para o sucesso da amplificação, devido ao aumento ou diminuição da ligação DNA / Proteína. Autores relatam a amplificação de produtos de até 800 pb em lâminas novas e fragmentos de até 450 a 650 pb em amostras estocadas por mais tempo (Wright e Manos, 1990). Trabalhou-se aqui com material parafinado de 1978 a 1998, e foram amplificados materiais de amostras estocadas há 12 anos (Tab. 3). Importante observar que em duas das combinações utilizadas os iniciadores externos amplificaram um fragmento de 1297 pb (Tab. 2). Portanto, talvez seja muito mais importante o uso de diferentes pares de iniciadores para o trabalho em amostras parafinadas, que somente a

observação do tempo de estoque e tamanho do fragmento.

Segundo os dados obtidos nas fichas dos animais, desde, pelo menos, o ano de 1988, ocorrem surtos de BoHV-5 na região Sudeste do Brasil (MG, ES e SP). Em relação à faixa etária, seis de sete animais (86%) estavam entre a faixa etária de 5 a 18 meses. Em trabalho semelhante, encontrou-se dois de sete animais positivos para BoHV-5 em amostras parafinadas com cinco a doze meses, e os cinco restantes, possuíam a idade de dois a quatro anos (Ely et al., 1996).

No Brasil, assim como em outros locais do mundo, trabalhos relatam a ocorrência deste vírus em animais de 2 a 60 meses (Belknap et al., 1994; Roche et al., 1998).

Uma das amostras (21356), que pertencia a um rebanho com idade entre oito a dez meses, e que apresentaram sintomas de BoHV-1, ressaltando a importância do diagnóstico diferencial entre estas duas viroses, já que, segundo estes dados, elas podem ocorrer ao mesmo tempo no mesmo rebanho e no mesmo animal.

A PCR desenvolvida durante este trabalho mostrou-se sensível e específica para o Herpesvirus Bovino 5, tanto em amostras isoladas em cultivo celular, quanto em amostras parafinadas de SNC, podendo servir como instrumento eficiente no auxílio ao diagnóstico do Herpesvirus Bovino 5.

6. CONCLUSÕES

1. O sistema de PCR desenvolvido é eficiente em amplificar amostras de herpesvirus bovino 5 diretamente de cultivo celular e a partir de DNA extraído do sobrenadante destes cultivos.
2. A sensibilidade apresentada pelo teste foi de $10^{-3,25}$ TCID₅₀/50 µl para cultivo celular infectado e $10^{-1,25}$ TCID₅₀/50 µl para DNA extraído de sobrenadante de cultivo celular infectado.
3. A especificidade do teste foi avaliada pela utilização de amostras de Herpesvirus humanos e animais, incluindo BoHV-1, não tendo sido amplificadas nenhuma destas nas condições utilizadas.

4. O teste foi eficiente em diferenciar o BoHV-5 do BoHV-1, sendo, portanto, um instrumento importante no diagnóstico diferencial destas viroses.
5. O teste mostrou-se eficiente na amplificação do BoHV-5 de amostras de campo em material parafinado, com o auxílio de iniciadores internos (PCR - "nested"), nas condições utilizadas.
6. O uso de vários iniciadores pode ser indicado para estudos retrospectivos por PCR em amostras parafinadas.
7. Através da análise do histórico clínico, podemos afirmar que o BoHV - 5 circula, nos rebanhos bovinos da região Sudeste, pelo menos desde 1988.
8. O seqüenciamento permite, após amplificação da região US4 (codificadora da glicoproteína G), diferenciar o BoHV - 5 do BoHV - 1.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELMAGID, 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.
- ASHBAUGH, S.E., THOMPSON, K.E., BELKNAP, K.E. et al. Specific detection of shedding and latency of bovine herpesvirus 1 and 5 using a nested polymerase chain reaction. *J. of Vet. Diagn. Invest.*, n.9, p.387-394, 1997.
- BABIUK, L.A., VAN DEN HURK, S.D.L., TIKOO, S.K. Immunology of bovine herpesvirus 1 infection. *Vet. Microbiol.*, v.53, p.31-42, 1996.
- BAGUST, T.J., CLARK, L. Pathogenesis of meningoencephalitis produced in calves by infectious bovine rhinotracheitis herpesvirus. *J. Comp. Pathol.*, n.82, p.375-382, 1972.
- BELÁK, S., BALLAGI-PORDÁNY, A. Application of the polymerase chain reaction (PCR) in veterinary diagnostic virology. *Vet. Res. Com.*, v.17, n.1, p.55-72, 1993.
- BELKNAP, E.B., COLLINS, J.K., AYERS, V.K., SCHULTHEISS, P.C. Experimental infection of neonatal calves with neurovirulent bovine herpesvirus type 1.3. *Vet. Pathol.*, n.31, p. 358-365, 1994.
- BEM-PORAT, T., KAPLAN, A.S. Replication - biochemical aspects. In: KAPLAN, A.S. *The herpesviruses*. New York: Academic Press. p.164-216, 1973.
- BEN-EZRA, J., JOHNSON, D.A., ROSSI, J. et al. Effect of fixation on the amplification of nucleic acids paraffin-embedded material by polymerase chain reaction. *J. Histo. Cyto.*, v.39, n.3, p.351-354, 1991.
- CABALLERO, O.L., MENEZES, C.L.P., COSTA, M.C.S.L. et al. Highly sensitive single-step PCR protocol for diagnosis and monitoring of human cytomegalovirus infection in renal transplant recipients. *J. Clin. Microbiol.*, n.35, p.3192-3197, 1997.
- CHOWDHURY, S.I. Molecular basis of antigenic variation between the glycoproteins 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., MOSIER, D. et al. Neuropathology of bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) meningo-encephalitis in a rabbit seizure model. *J. Comp. Path.*, v.117, p.295-310, 1997.
- DARLINGTON, R.W., GRANOFF, A. Replication-biological aspects. In: KAPLAN, A.S. *The herpesviruses*. New York: Academic Press. p.94-127, 1973.
- DEACON, N.J., LAH, M. The potential of the polymerase chain reaction in veterinary research and diagnosis. *Australian Vet. J.*, v.66, n.12, p.442-444, 1989.

- DIAS NETO, E., RAHAL, P., CABALLERO, O.L.S.D. et al. DNA ligation quality control by competitive PCR. *Trends Genet.*, v.12, n.9, p.341-342, 1996.
- d'OFFAY, J.M., ELY, R.W., BALDWIN, C. A. et al. Diagnosis of encephalitic bovine herpesvirus type 5 (BHV - 5) infection in cattle and virus isolation and immunohistochemical detection of antigen in formalin - fixed bovine brain tissue. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.2, n.7, p. 247-251, 1995.
- ENGELHARDT, T.; KEIL, G.M. Identification and characterization of the bovine herpesvirus 5 US4 gene and gene products. *Virology*, v.225, v.1: p.126-135, 1996.
- ELY, R.W. D'OFFAY, J.M., RUEFER, A.H., CASH, C.Y. Bovine herpesviral encephalitis: a retrospective study on archived formalin-fixed, paraffin-embedded brain tissue. *J. Vet. Diagn. Invest.*, n.8, p.487-492, 1996.
- ENGELS, M., ACKERMANN, M. Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. *Vet. Microbiol.*, v.53, n.1-2, p.3-15, 1996.
- EUGSTER, M., ANGULOS, A. B., JONES, L. P. Herpesvirus encephalitis in range calves. *Pro. Ann. Mtg. Am. Assoc. Vet. Lab. Diagn.*, v.17: p.267-290, 1974.
- FENNER, F.J., GIBBS, E.P., MURPHY, F.A. et al. *Veterinary virology.*, San Diego: Academic Press, 2ed., 1993.
- FLORES, E.F., SILVA, A.M., WEIBLEN, R. Neuropatogenicidade do herpesvírus bovino tipo 5 (HVB-5)-avaliação de ovinos e coelhos como modelos experimentais. In: ANAIS DO SIMPÓSIO INTERNACIONAL, 1998, Santa Maria. *Anais...*, Santa Maria: UFSM, p.97-101, 1998.
- FORGHANI, B., ERDMAN, D.D. Amplification and detection of viral nucleic acids. In: *Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections*. Washington: American Public Health Association, 7ed., p.97-120, 1995.
- FRIEDLI, K., METZLER, A. E. Reactivity of monoclonal antibodies to proteins of a neurotropic bovine herpesvirus (BHV-1) strain to protein of representative BHV-1 strains. *Arch. Virol.*, v.94: p.109-122, 1987.
- FURTH, J.J., WHITBECK, J.C., LAWRENCE, W.C., BELLO L.J. Construction of a viable BHV 1 mutant lacking most of the short unique region. *Arch. of Virol.*, n.142, p.2373-2387, 1997.
- GENTRY, G.A., RANDALL, C.C. The physical and chemical properties of the herpesviruses. In: KAPLAN, A.S. *The herpesviruses*, New York: Academic Press, p.45-86, 1973.
- GREER, C.E. et al. *Amer. J. Clinical Pathology*, n.95, p.117-124, 1991.
- HILL, B.D., HILL, M.W.M., CHUNG, Y.S., WHITTLE, R.J. Meningoencephalitis in calves due to bovine herpesvirus type 1 infection. *Aust. Vet. J.*, n.61, p.242-243, 1984.
- KAASHOEK, M.J. Marker vaccines against bovine herpesvirus 1 infections. Utrecht: Universiteit Utrecht, p.154, 1995.
- KEIL, G.M., ENGELHARDT, T., KARGER, A.; ENZ, M. Bovine herpesvirus 1 Us open reading frame 4 encodes a glycoproteoglycan. *J. Virol.*, v.70, n.5, p.3032-3038, 1996.
- LOVATO, L.T. BHV-1 e BHV-5, isolamentos e sorologia no Rio Grande do Sul. In: ANAIS DO SIMPÓSIO INTERNACIONAL, 1998, Santa Maria. *Anais...*, Santa Maria: UFSM, p.97-101, 1998.
- MAGYAR, G., BENKO, M., HARRACH, L. et al. DNA restriction enzyme analysis of bovine herpesvirus 1 strain isolated from encephalitis in Hungary. *Acta. Vet. Hung.*, v.37, p.3-4, 1989.
- MEYER, G., LEMAIRE, M., LYAKU, J. et al. Establishment of a rabbit model for bovine herpesvirus type 5 neurological acute infection. *Vet. Microbiol.*, V.51, n.1-2: 27-40, 1996.

- METZLER, A.E.; SCHUDEL, A.A.; ENGELS, M. Bovine herpesvirus 1: molecular and antigenic characteristics of variant viruses isolated from calves with neurologic disease. *Arch. Virol.*, v.87, p.205-217, 1986.
- MULUNEH, A., LIEBERMANN, H. Studies concerning etiology of sheep-associated malignant catarrhal fever in Europe. *Dtsch. Tier. Wschr.*, v.9, n.99, p.353-392, 1992.
- OSÓRIO, F.A., REED, D.E., VAN DER MAATEN, M.J., METZ, C.A. Comparison of the herpesvirus of cattle by DNA restriction endonucleases analysis and serologic analysis. *Am. J. Vet. Res.*, v.46, n.10, p.2104-2106, 1985.
- OSÓRIO, F.A. Latency of bovine herpesvirus - 1. In: ANAIS DO SIMPÓSIO INTERNACIONAL, 1998, Santa Maria. *Anais...*, Santa Maria: UFSM, p.117-126, 1998.
- REED, L.J., MUENCH, H.A. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. of Hygiene*, n.27, p.493-497, 1938.
- ROCHA, M.A., BARBOSA, E.F., GUIMARÃES, S.E.F. et al. A high sensitivity-nested PCR assay for BHV-1 detection in semen of naturally infected bulls. *Vet. Microbiol.*, n.63, p.1-11, 1998.
- ROCHA, M.A., BARBOSA, E.F., GUEDES, R.M.C. et al. Detection of BHV-1 in a naturally infected bovine fetus by a nested PCR assay. *Vet. Res. Commun.*, n.23, p.133-141, 1999.
- ROEHE, P.M., TEIXEIRA, M.B., ESTEVES, P.A. et al. Situação do BHV-1 e BHV-5 no Brasil. In: ANAIS DO SIMPÓSIO INTERNACIONAL, 1998, Santa Maria. *Anais...*, Santa Maria: UFSM, p.89-96, 1998.
- ROIZMAN, B., DESROSIERS, R.C.; FLECKENSTEIN, B., LOPEZ, C. et al. The family Herpesviridae: an update. *Arch. Virol.*, v.123, p.425-449, 1992.
- ROIZMAN, B. *HERPESVIRIDAE*. In: FIELDS, B. N., KNIPE, D. M., HOWLEY, P.M. et al. *Fields Virology*, New York: Raven Press, v.2, 1992.
- SALVADOR, S.C., LEMOS, R.A.A., ROEHE, P.M. Encefalite por HVB tipo 5. In: LEMOS, R.A.A. *Principais enfermidades de bovinos de corte do Mato Grosso do Sul*. Campo Grande: Universidade do Mato Grosso do Sul, p.109-139, 1998.
- SANGUINETTI, C.J., DIAS NETO, E., SIMPSON, A.J.G. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques*, n.17, p.915-918, 1994.
- SEAL, B.S., WHETSTONE, C.A. Immediately early gene expression and gene mapping comparisons among isolates of bovine herpesvirus 1 and 5. *Vet. Microbiol.*, v.38, p.369-384, 1994.
- SILVA, A.M.; WEINBLIN, R., IRIGOYEN, L.F. et al. Experimental infection of sheep with bovine herpesvirus type-5 (BHV-5): acute and latent infection. *Vet. Microbiol.*, v.66, p.89-99, 1999.
- STUDDERT, M.J. Bovine encephalitis herpesvirus. *Vet. Rec.*, v.25, p.584, 1989.
- 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*, n.1, p.506-513, 1991.
- WEIBLEIN, R., LOMBARDO DE BARRROS, C.S., CANABARRO, T.F. et al. Bovine meningoencephalitis from IBR virus. *Vet. Record*, v.124, n.25, p.666-667, 1989.
- WENTINK, G.H., OIRSCHOT, J.T., VERHOEF, J. Risk of infection with bovine herpes virus-1 (BHV-1). A Review. *Vet. Quarterly*, n.15, p.30-33, 1993.

- WILD, P., SCHRANER, E.M., PETER, J. et al.
Novel entry pathway of bovine herpesvirus
1 and 5. **J. of Virol.**, v.72, n.12, p.9561-
9566, 1998.
- WHETSTONE, C.A., SEAL, B.S., MILLER,
J.M. Variability occurs in the inverted
repeat region of genomic DNA from bovine
herpesvirus 1 respiratory, genital and bovine
herpesvirus 5 encephalitic isolates. **Vet.**
Microbiol., v.38, p.181-189, 1993.
- WRIGHT, D.K., MANOS, M.M. Sample
preparation from paraffin-embedded tissues.
In: INNIS, M.A. et al. **PCR protocols: a
guide to methods and applications**. San
Diego: Academic Press, CA., p.153-159,
1990.
- VAN DER PEER, Y., DE WACHTER, R.
Treecon for windows: a software package
for the construction and drawing of
evolutionary trees for the microsoft
windows environment. **Comput. Applic.**
Biosci., n.10, p.569-570, 1994.