

Antônio Augusto Fonseca Júnior

**Vírus da Doença de Aujeszky:
Diagnóstico, Caracterização Molecular e Filodinâmica**

Tese apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais,
Escola de Veterinária, como requisito parcial para obtenção
do grau de Doutor em Ciência Animal.

Área de Concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Jenner Karlisson Pimenta dos Reis

**Belo Horizonte
UFMG – Escola de Veterinária
2011**

F676v Fonseca Júnior, Antônio Augusto, 1980-
Vírus da doença de Aujeszky: diagnóstico, caracterização
molecular e filodinâmica / Antônio Augusto Fonseca Júnior.
- 2011.
103 p.: il.

Orientador: Jenner Karlisson Pimenta dos Reis
.....Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais,
Inclui bibliografia

1. Suíno – Doenças – Teses. 2. Aujeszky, Doença de –
Diagnóstico – Teses. I. Reis, Jenner Karlisson Pimenta dos.
II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária.
III. Título.

CDD – 636.408 96

Tese defendida e aprovada em 13 de dezembro de 2011, pela Comissão Examinadora constituída por:



Prof. Jenner Karlisson Pimenta dos Reis
Presidente



Prof. João Pessoa Araújo Junior



Prof. Marco Antônio Silva Campos



Profª. Zélia Inês Portela Lobato



Profª. Graciela Kunrath Lima

Duas frases me inspiraram a escrever cada vez mais nessa tese:

"Nada em biologia faz sentido a não ser sob a luz da evolução."
Theodosius Dobzhansky (1900-1975)

"No livro da vida, as respostas não estão na contracapa."
Charlie Brown

Duas frases explicam por que escrevi essa tese:

"Escolhe um trabalho de que gostes, e não terás que trabalhar nem um dia na tua vida."
Confúcio



E uma explica o último mês antes da tese:



AGRADECIMENTOS

Primeiramente aos meus pais, cujos ensinamentos me guiaram, cujas palavras me acalentaram e que com exemplos me educaram.

Às minhas irmãs, exemplos maiores do que dona Magda ensinou sobre o que significa estudar.

À Daiane, pelo amor e pelos sorrisos inspiradores, que me despertam dia a dia para os significados das batidas que sinto no peito.

Ao Jenner que aceitou mais uma vez me orientar.

Ao professor Rômulo com quem aprendi muito.

Ao professor Marcos que foi um grande apoio e um amigo durante todo esse trajeto.

Ao coordenador do Lanagro/MG, Ricardo Aurélio Nascimento Pinto, que permitiu que eu participasse do doutorado.

Ao coordenador da DBIO no Lanagro/MG, Pedro Mota, pela confiança e por todo bom humor.

Às duas pessoas que me deram o apoio inicial para todo esse caminho de mestrado e doutorado, Anapolino e Marcelo. Sem eles não teria sido possível começar tudo isso e eu ainda estaria ainda preso no marasmo entre o amanhecer e entardecer. Obrigado, Anapolino, por atender a todas as minhas dúvidas veterinárias com bom humor característico. Obrigado, Marcelo, por dar um exemplo do que é competência.

À Ana Cláudia sem a qual o LBM não teria vingado e eu teria enlouquecido ou me afogado no mar tedioso da burocracia.

Ao Natanael pela disposição e apoio essenciais que nos ajudam a carregar os fardos mais pesados no LBM.

À Tatiana, cujas histórias pós-congresso estão entre os momentos mais divertidos de novembro e outubro.

À Mariana Lázaro Sales, o coringa do laboratório.

À Érica Bravo Sales que enfrentou com bravura os sequenciamentos, a filogenia e a peteca.

À Estefânia Guedes que mostrou que o problema nem sempre está na concentração do gel ou da PCR, mas na classe com que se preparam os mesmos.

À Michele e Naiara, presenças mais recentes, mas importantes.

À turma de sempre, amigos do laboratório que mesmo sem participar dos experimentos ajudaram nas conversas. Alexandre Penna, com o humor e a preocupação. Paulinho, cujos desafios insanos ajudavam a desviar a atenção. Guilherme com os comentários canhestros. Paula, com a presença feminina que colocava o pessoal no eixo moral na academia. Mikael e Fábio, pelas conversas e por sobreviverem ao futebol de toda quinta.

Ao pessoal do Retrolab que tanto participava das reuniões “jennéricas” com artigos interessantes.

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	11
INTRODUÇÃO	12
PARTE 1: A DOENÇA DE AUJESKY	13
1 Histórico	13
2 Taxonomia do SuHV-1	13
3 Aspectos Moleculares	13
4 Latência	16
5 Sinais Clínicos	17
6 Epidemiologia	18
7 Impacto Econômico	18
8 Vacinação	18
9 Controle E Erradicação	19
10 Diagnóstico	20
11 Epidemiologia Molecular	21
PARTE 2: DIAGNÓSTICO MOLECULAR DO VÍRUS DA DOENÇA DE AUJESZKY	22
Capítulo 1: PCR DUPLEX PARA DIFERENCIAÇÃO DE AMOSTRAS VACINAIS E SELVAGENS DO VÍRUS DA DOENÇA DE AUJESZKY	23
ABSTRACT	23
Capítulo 2: DIAGNÓSTICO E GENOTIPAGEM DO VÍRUS DA PSEUDORAIVA POR NESTED-PCR E ANÁLISE DE RESTRIÇÃO ENZIMÁTICA	27
RESUMO	27
INTRODUÇÃO	27
MATERIAL E MÉTODOS	28
RESULTADOS	30
DISCUSSÃO	32
Capítulo 3: PCR EM TEMPO REAL PARA DETECÇÃO DO VÍRUS DA DOENÇA DE AUJESZKY	34
RESUMO	34
INTRODUÇÃO	34
MATERIAL E MÉTODOS	35
RESULTADOS	37
DISCUSSÃO	40
Capítulo 4: PCR MULTIPLEX PARA DETECÇÃO DO HERPESVÍRUS SUÍNO 1, HERPESVÍRUS BOVINO 1, HERPESVÍRUS BOVINO 5 E HERPESVÍRUS OVINO 2	43
RESUMO	43
INTRODUÇÃO	43
MATERIAL E MÉTODOS	44
RESULTADOS	45
DISCUSSÃO	49
Capítulo 5: PCR MULTIPLEX EM TEMPO REAL PARA DETECÇÃO DE AGENTES ASSOCIADOS COM DOENÇAS RESPIRATÓRIAS DE SUÍNOS	51
RESUMO	51
INTRODUÇÃO	51
MATERIAL E MÉTODOS	52
RESULTADOS	53
DISCUSSÃO	54
Parte 3: PADRONIZAÇÃO DE FERRAMENTAS MOLECULARES PARA EPIDEMIOLOGIA DO VÍRUS DA DOENÇA DE AUJESZKY	55
Capítulo 6: GENOTIPAGEM DO VÍRUS DA DOENÇA DE AUJESZKY POR PCR MULTIPLEX E RESTRIÇÃO ENZIMÁTICA	56
RESUMO	56

INTRODUÇÃO.....	56
MATERIAL E MÉTODOS.....	57
RESULTADOS.....	58
DISCUSSÃO.....	60
Capítulo 7: GENOTIPAGEM E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO HERPESVÍRUS SÚIDEO 1 POR SEQUENCIAMENTO PARCIAL DE <i>UL44</i>	62
RESUMO.....	62
INTRODUÇÃO.....	62
MATERIAL E MÉTODOS.....	63
RESULTADOS.....	64
DISCUSSÃO.....	72
Capítulo 8: FILODINÂMICA DO VÍRUS DA DOENÇA DE AUJESZKY.....	75
RESUMO.....	75
INTRODUÇÃO.....	75
MATERIAL E MÉTODOS.....	76
RESULTADOS.....	78
DISCUSSÃO.....	88
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92

LISTA DE TABELAS

	Capítulo 2	
Tabela 1	Amostras padrão e de isolados brasileiros de SuHV-1 utilizadas no estudo.....	25
Tabela 2	Comparação da sensibilidade analítica da <i>nested</i> -PCR e PCR convencional para SuHV-1.....	
	Capítulo 3	32
Tabela 1	Valores médios de Ct e desvios-padrão da qPCR.....	
Tabela 2	Desvio Padrão dos Cts e Picos de Desnaturação na Confirmação do LD.....	40
Tabela 3	Desvio Padrão dos Cts e PD nos testes de REP, RPO, ROB.....	
Tabela 4	Valores de Ct para as amostras clínicas positivas.....	46
	Capítulo 4	47
Tabela 1	Iniciadores utilizados neste trabalho.....	48
Tabela 2	Resultados obtidos a partir da mPCR a partir de amostras clínicas.....	60
	Capítulo 5	
Tabela 1	Iniciadores e sondas utilizados para detecção dos patógenos pesquisados nesse trabalho.....	65
	Capítulo 6	66
Tabela 1	Amostras do SuHV-1 utilizadas nesse trabalho.....	66
Tabela 2	Iniciadores utilizados nesse trabalho.....	67
Tabela 3	Quantidade de sítios de restrição para cada amplicom nos genótipos I, II e III de SuHV-1.....	68
	Capítulo 8	69
Tabela 1	Genes utilizados para as análises filogenéticas desse trabalho.....	70
Tabela 2	Iniciadores utilizados nesse trabalho para amplificação dos genes <i>us9</i> , <i>ul14</i> e <i>ul49.5</i> do SuHV-1.....	72
Tabela 3	Modelos de substituição, reconstrução de árvore filogenética e programas utilizados para cada grupo de sequências estudadas nesse trabalho.....	
	LISTA DE FIGURAS	80
	Capítulo 1	81
Figura 1	Resultado da PCR duplex em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo.	82
	Capítulo 2	83
Figura 1	Padrões de fragmentos de restrição dos genótipos de SuHV-1.....	84
	Capítulo 3	85
Figura 1	Curva de desnaturação (dF/dT versus Temperatura) das amostras positivas e negativas utilizadas no teste de detecção do SuHV-1 em amostras clínicas.....	86
	Capítulo 4	87
Figura 1	Eletroforese em gel de agarose 2% da mPCR.....	88
Figura 2	Eletroforese em gel de agarose 2% da mPCR de resultados positivos para BoHV-1 e BoHV-5 digeridos pela enzima de restrição BtgI.....	
Figura 3	Sensibilidade analítica da PCR multiplex.....	
	Capítulo 6	
Figura 1	Perfis de restrição enzimática por <i>Bam</i> HI para amostras de isolados e amostras clínicas de SuHV-1.....	
	Capítulo 7	
Figura 1	Árvore filogenética reconstruída a partir do método bayesiano.....	

Figura 2	Árvore filogenética do SuHV-1 gerada a partir de sequências parciais do gene <i>ul44</i> com o método de <i>Neighbor-Joining</i> no programa MEGA 4.0.....
Figura 2	Árvore filogenética do SuHV-1 gerada a partir de sequências parciais do gene <i>ul44</i> com o método de Máxima Verosimilhança no programa Seaview.....
Figura 3	Árvore filogenética do SuHV-1 gerada a partir de sequências parciais do gene <i>ul44</i> com o método bayesiano no programa Mr. Bayes.....
Figura 4	Árvore distância por anos. Os valores nos nós da árvore representam a distância em anos em relação à amostra mais recente, 614BWGER, isolada em 2008.....
Figura 5	Resultados do programa Selecton para a região N-terminal de gC.....
Figura 6	Regiões de desordem protéica detectadas nos programas RONN, GlobProt, FoldINdex, VL3 e VLTX na porção N-terminal da glicoproteína C do SuHV-1.....
	Capítulo 8
Figura 1	Árvores filogenéticas para os genes <i>ul14</i> , <i>ul49.5</i> , <i>us6</i> e <i>us9</i>
Figura 2	Árvores filogenéticas para os genes <i>us7</i> e <i>us8</i>
Figura 3	Árvores filogenéticas para sequências completas do gene <i>ul44</i>
Figura 4	Rede filogenética reconstruída a partir de sequências parciais de <i>ul44</i>
Figura 5	Rede filogenética reconstruída a partir do programa Network.....
Figura 6	Análise por dados discretos incorporada à árvore filogenética para amostras de focos de pseudorraiva ocorridos no estado de Illinois, Estados Unidos.....
Figura 7	Análise por dados contínuos incorporada à árvore filogenética para amostras de focos de pseudorraiva ocorridos no estado de Illinois, Estados Unidos.....
Figura 8	Figura 8: Resultados da análise filogeográfica da partir de dados discretos das sequências de <i>ul44</i> do SuHV-1 isolados a partir de javali na Europa entre 1995 e 2008.....
Figura 9	Figura 9: Imagens geradas a partir da análise por <i>time slicer</i> da distribuição genética do SuHV-1 em javalis na Europa.....

RESUMO

O *suid herpesvirus 1* (SuHV-1) é o causador da pseudorraiva ou doença de Aujeszky, enfermidade contagiosa e epidêmica que acomete suínos em diversas fases de produção. É uma enfermidade de notificação obrigatória pela Organização Mundial de Saúde Animal, o que pode acarretar sérias barreiras sanitárias no comércio internacional. O objetivo dessa tese foi o desenvolvimento de métodos moleculares para aplicação direta no diagnóstico e epidemiologia do agente etiológico da doença de Aujeszky. Os métodos moleculares de diagnóstico desenvolvidos para a detecção exclusiva do SuHV-1 obtiveram alta concordância com o isolamento e neutralização viral. Além desses, outras técnicas foram desenvolvidas para a detecção do SuHV-1 e outros agentes causadores de enfermidades respiratória de suínos por PCR multiplex em tempo real. Além da alta sensibilidade e especificidade, esses métodos foram considerados rápidos e práticos para a detecção de SuHV-1 e agente relacionados. Uma vez determinados os métodos para diagnóstico do agente da pseudorraiva, foram desenvolvidas metodologias para caracterização molecular do vírus. O primeiro passo foi tornar mais prática e rápida a genotipagem por restrição enzimática do SuHV-1 para em seguida aprofundar os estudos moleculares por sequenciamento dos genes *ul44*, *us9*, *us8*, *u14*, *ul49.5*. Os dados gerados nessas análises permitiram definir grupos filogenéticos desse agente difundidos pelo mundo que podem ainda diferenciar o vírus isolado de suínos e de domésticos. Os trabalhos dessa tese permitiram desenvolver novos métodos de diagnóstico rápidos, sensíveis e específicos para detecção do SuHV-1 que podem ser utilizados em conjunto com técnicas de caracterização molecular que auxiliarão no entendimento da epidemiologia da pseudorraiva.

Palavras chave: Doença de Aujeszky, pseudorraiva, PCR, filogenia, filodiâmica

ABSTRACT

The *suid herpesvirus 1* (SuHV-1) is the causative agent of pseudorabies or Aujeszky's disease, a contagious and epidemic disease that affects pigs in various stages of production. It is a notifiable disease by the World Organization for Animal Health, which can cause serious health barriers in international trade. The aim of this thesis was the development of molecular methods for direct application in the diagnosis and epidemiology of the etiological agent of pseudorabies. The molecular diagnostic methods developed for the detection of SuHV-1 had a high correlation with viral isolation and neutralization. Besides these, other techniques were developed to detect SuHV-1 and other agents causing respiratory diseases in pigs by multiplex PCR in real time. In addition to high sensitivity and specificity, these methods have been considered practical and quick to detect SuHV-1 and related agents. Since certain methods for diagnostic agent for pseudorabies have been developed methods for the molecular characterization of the virus. The first step was to make it practical and fast genotyping by restriction enzyme SuHV-1 then for further study by molecular sequence of the gene *ul44*, *US9*, *US8*, *U14*, *ul49.5*. The data generated in these analyzes allowed to define phylogenetic groups of the virus distributed around the world and to differentiate the viruses isolated from domestic and wild swine. The studies of this thesis developed new rapid, sensitive and specific diagnostics for detection of SuHV-1 which can be used in conjunction with molecular characterization techniques which will aid in the understanding of the epidemiology of pseudorabies.

Key words: Aujeszky's disease, pseudorabies, PCR, phylogeny, phylodynamics

INTRODUÇÃO

O *suid herpesvirus 1* (SuHV-1) é o causador da pseudorraiva, enfermidade contagiosa e epidêmica que acomete suínos em diversas fases de produção. É uma enfermidade de notificação obrigatória pela Organização Mundial de Saúde Animal, o que pode acarretar sérias barreiras sanitárias no comércio internacional (OIE, 2009). A importância dessa enfermidade levou diversos países a trabalharem em programas de erradicação com altos investimentos em melhoria dos métodos de diagnóstico, vacinação e estratégias de prevenção.

Dada a importância dessa enfermidade, essa tese teve como objetivos principais estudar novos testes laboratoriais para

diagnóstico e métodos de análise da evolução e epidemiologia molecular do SuHV-1. Cada um desses objetivos foi desenvolvido separadamente em uma série de trabalhos divididos aqui em três partes principais.

A primeira parte trata de uma revisão bibliográfica da enfermidade e biologia molecular do vírus. A segunda parte aborda os métodos de diagnóstico molecular para a detecção do SuHV-1 em tecido do sistema nervoso central de suínos e, também, para identificação de agentes envolvidos no diagnóstico diferencial de síndromes nervosas de bovinos e doenças respiratórias de suínos. Por fim, a terceira parte desenvolve estudos da análise do genoma dos isolados de SuHV-1 por diversos métodos de tipagem molecular.

Parte 1: A DOENÇA DE AUJESKY

1 Histórico

A doença foi descrita pela primeira vez em bovinos em 1813, apesar da maior importância econômica em suínos. Foi descrita como *mad itch* por causa do prurido intenso e morte ocorridos nos animais acometidos. Devido aos sinais clínicos parecidos com os da raiva, passou a ser denominada pseudorraiva na Suíça, em 1849. A outra denominação, Doença de Aujeszky (DA), passou a ser utilizada depois de 1902, quando Aládar Aujeszky estabeleceu que o agente etiológico não era bacteriano. Apenas em 1934, Sabin e Wright identificaram o agente etiológico da pseudorraiva como um herpesvirus imunologicamente relacionado com o herpes simplex (Köhler e Köhler, 2003).

A DA passou a ser considerada uma doença de alto impacto econômico a partir dos anos 60 do século XX, inclusive no Brasil, onde focos já foram registrados nos estados das regiões sul e sudeste, sendo a primeira ocorrência datada de 1912. Várias razões foram postuladas para o aparente aumento na gravidade, prevalência e distribuição da enfermidade. Uma seria a ocorrência de novas estirpes virais. Outra envolve o declínio da peste suína clássica (PSC) com o desenvolvimento de vacinas efetivas e testes de diagnósticos específicos. Antes do surgimento das técnicas de imunofluorescência, casos de DA podem ter sido diagnosticados como peste suína clássica. Uma terceira razão comumente citada foi a mudança no manejo de suínos nos últimos 30 anos do século XX. O sistema de confinamento total com amplo número de animais e leitegada contínua criaram um ambiente que favorece a manutenção e difusão do vírus dentro do rebanho (Kluge et al., 1999).

2 Taxonomia do SuHV-1

O agente etiológico da DA, também conhecido como vírus da pseudorraiva (PrV) ou vírus da doença de Aujeszky (ADV),

como é denominado em alguns trabalhos na literatura. No entanto, seu nome oficial é *suid herpesvirus 1* e a sigla que o identifica SuHV-1. O SuHV-1 é um membro da subfamília *Alphaherpesvirinae*, gênero *Varicellovirus*, dentro da família *Herpesviridae*, ordem *Herpesvirales* (Davison et al., 2009).

Trabalhos recentes ratificam a taxonomia do SuHV-1 a partir de seqüenciamento e análise filogenética. A comparação de seqüências de DNA altamente conservadas de genes de glicoproteínas dos herpesvirus permitiu demonstrar a semelhança genética entre o SuHV-1 e o BoHV-1, colocando o vírus da pseudorraiva mais próximo do herpesvirus bovino do que do varicella-zoster vírus (Wang et al., 2007).

Os alfa herpesvirus são distinguidos por seu rápido crescimento lítico em cultura celular, neurotropismo, latência em neurônios e amplo espectro de hospedeiros. O SuHV-1, além de ter enorme importância econômica, é um importante modelo para o conhecimento da biologia dos alfa herpesvirus (Enquist et al., 1999). Os mecanismos envolvidos na iniciação da infecção, morfogênese do vírion e liberação das partículas virais, neuroinvasão e espalhamento transneuronal são continuamente estudados para prover maior conhecimento sobre infecção *in vitro* e *in vivo* dessa sub-família (Mettenleiter, 2000).

3 Aspectos Moleculares

Genoma Do SuHV-1

O genoma do vírus da Doença de Aujeszky é uma molécula de DNA linear em fita dupla com o tamanho entre 140 e 150 kb. Estima-se que possua 73 genes. Mais de 70 *open reading frames* (ORFs) foram identificadas com homólogos relacionados com outros alfa herpesvirus, nenhuma única ao SuHV-1. Há um alto percentual de guanina e citosina (68% a 74%), sendo a terceira base do códon aquela com maior incidência G+C. O genoma consiste em uma seqüência única longa (U_L) de 100 kb e uma seqüência única curta (U_S) de 10 kb

suportada por duas seqüências invertidas, a interna (IR) e a terminal (TR). Tal disposição genômica é referida como classe 2 ou D, característica do gênero *Varicellovírus*. A presença de seqüências invertidas é um fenômeno intrigante para o qual não se encontrou significância fenotípica (Klupp et al., 2004).

Variantes genômicas de uma estirpe de campo podem coexistir. Foi comprovado que um conjunto de variantes genômicas do SuHV-1 é uma característica estável de uma estirpe (Christensen, 1995).

Capsídeo, Tegumento e Envelope

O capsídeo do SuHV-1 tem forma icosaédrica e é composto por proteínas codificadas por genes similares aos do HSV-1. É reunido em 162 capsômeros, divididos em 150 hexâmeros e 12 pentâmeros.

Os genes homólogos do capsídeo do SuHV-1 são o UL18 (parte das estruturas triplex entre os capsômeros, em conjunto com UL38, proteína de 295 aminoácidos, 31,6 kDa), UL19 (proteína maior que forma hexons e pentons, 1330 aminoácidos, 146 kDa), UL26 (requerida para formação do capsídeo e maturação, 524 aminoácidos, 54,6 kDa), UL 26.5 (substrato para UL26, 278 aminoácidos, 54,6 kDa), UL35 (103 aminoácidos, 11,5 kDa) e UL38 (forma triplexes com UL18, 368 aminoácidos, 40 kDa) (Klupp et al., 2004).

O tegumento é uma camada proteínica composta por mais de 15 proteínas. Enquanto o capsídeo tem simetria icosaédrica, o tegumento não parece apresentar nenhuma estrutura parecida. Apenas na parte mais interna, ocorre alguma simetria, em ponto de contato com e em volta dos vértices do capsídeo (Zhou et al., 1999). As partículas virais recebem seu tegumento final durante o envelopamento secundário no citosol em um processo complexo que envolve interações específicas proteína-proteína com marcada redundância. As proteínas do tegumento são importantes constituintes do vírion por ligarem envelope e nucleocapsídeo, além

de serem responsáveis pelo seqüestro da maquinaria celular para a replicação viral. Como exemplo, pode-se citar UL41, pelo *shut off*, e UL48 pelo papel de ativação dos genes virais imediatamente precoces. A estrutura do tegumento é composta principalmente pela proteína UL36, a maior encontrada na família dos herpesvírus. Especula-se que UL 37 interaja com UL 36 e forme a segunda camada do tegumento (Mettenleiter, 2002).

O envelope do SuHV-1 é derivado de membranas intracelulares das vesículas na área trans-golgi. Contém proteínas codificadas pelo vírus, sendo a maioria modificada pela adição de cadeias laterais de carboidratos, portanto designadas glicoproteínas. Sendo um constituinte superficial do vírion e das células infectadas, as proteínas do envelope são os alvos dominantes para a resposta imune do hospedeiro (Granzow et al., 1997).

Glicoproteínas

As glicoproteínas do SuHV-1 são homólogas às glicoproteínas do herpesvírus simplex. Depois do 18th International Herpesvirus Workshop (1993) foi recomendado que os nomes dados a essas glicoproteínas do agente da doença de Aujeszky fossem os mesmos das proteínas homólogas do HHV-1.

A glicoproteína gB é essencial para o desenvolvimento do SuHV-1, com importância na penetração e na difusão célula-célula (Mettenleiter, 1996). É a mais conservada entre as proteínas dos alphaherpesvirus, sendo inclusive usada em análises filogenéticas entre as diferentes espécies dessa subfamília (McGeoch et al., 2000).

A glicoproteína gC é um dos principais componentes na adesão à superfície celular. A ausência de gC causa diminuição da virulência em porcos com mais de três semanas de idade, porém não há efeito em neonatos. Desconhece-se o modo como a idade afeta a virulência (Nauwynck, 1997). A combinação com gE tem papel no egresso do vírus da célula infectada. A

glicoproteína C é imunologicamente importante e o gene que a codifica é uma das regiões mais variáveis do genoma do SuHV-1 (Ishikawa et al., 1996).

O gene da glicoproteína gD está envolvida na adesão e penetração do vírus, sendo essencial nesse sentido, porém não é requerida para a difusão célula-célula (Petrovskis, 1986).

As glicoproteínas gE e gI formam um complexo ligado não-covalentemente que é expresso na membrana da célula infectada (Nauwynck, 1997). Não são essenciais para o desenvolvimento do vírus, porém a ausência de gE reduz a virulência. É comumente deletada nas vacinas atenuadas de SuHV-1. Os vírus deletados possuem uma capacidade reduzida para infectar neurônios de segunda e terceira ordem nas rotas olfatórias e do trigêmeo (Mulder et al., 1994).

A glicoproteína H é a segunda glicoproteína mais conservada entre os herpesvírus (Christensen, 1995). É essencial para o desenvolvimento do vírus com papel de destaque na penetração e na difusão célula-célula (Nauwynck, 1997).

Outras glicoproteínas são gG, que excretada pela célula infectada se liga com alta afinidade a quimiocinas; essa característica permite que o vírus iniba a atividade dessas proteínas, modulando assim a resposta imunológica (Viejo-Borbolla et al., 2009), gK, essencial, conservada entre os alphaherpesvírus e com papel na difusão célula-célula, mais precisamente na liberação do vírion (Klupp et al., 1998), gL, essencial, conservada na família dos herpesvírus e com papel na penetração e difusão célula-célula (Klupp et al., 1997), gM, com função modulada na penetração e conservada na família dos herpesvírus e forma um heterodímero com gN (Christensen, 1995).

Penetração e replicação

O SuHV-1 possui um padrão complexo de replicação e penetração. Até mesmo a

expressão dos seus genes ainda é pouco conhecida e alvo de estudos. Sabe-se até o momento que a dose infectante é fundamental para se determinar se o vírus entrará em estado de latência ou partirá para uma infecção aguda como acontece com outros herpesvírus (Mador et al., 1998). A entrada do SuHV-1 na célula ocorre a partir da interação das glicoproteínas virais com a membrana celular. Primeiro ocorre a adesão pela interação de gC na matriz extracelular; gD liga-se a um receptor celular específico e estabiliza a interação célula-vírion. gB, gH e gL mediam a fusão do envelope viral e da membrana plasmática celular para permitir a penetração do capsídeo e do tegumento no citoplasma celular (Pomeranz et al., 2005). Enquanto o processo de adsorção depende de temperatura e de energia, a fusão independe desses fatores. O tegumento toma controle da maquinaria de síntese protéica celular imediatamente, enquanto as proteínas do capsídeo e do tegumento interno são transportadas através de microtúbulos até o núcleo celular.

Os genes do SuHV-1, como o de outros herpesvírus, podem ser divididos como imediatamente precoces, precoces e tardios coordenados em uma transcrição em cascata. IE180 é o único gene imediatamente precoce e sua transcrição é seguida pelos genes precoces envolvidos na síntese de DNA. Os genes tardios estão envolvidos com a síntese de proteínas do capsídeo e do envelope (Tombácz et al., 2009). Foi demonstrado que a multiplicidade de infecção (MOI) influi diretamente na transcrição do genoma viral. Em alguns casos, altas taxas de MOI podem diminuir sensivelmente a produção do transcrito antissenso, o mesmo que está diretamente ligado ao processo de latência do vírus. Diversos transcritos de genes próximos estão ligados ao mesmo mecanismo regulatório (Toth et al., 2010).

A proteína do IE180 é expressa no citoplasma e levada de volta para o núcleo celular onde ativa a transcrição dos genes precoces pela RNA polimerase II. As proteínas dos genes precoces envolvem-se na síntese de DNA viral ou ativadoras de

transcrição. Supõe-se que a replicação do DNA do SuHV-1 ocorre como a de outros herpesvírus no processo de *rolling circle*. Esse processo sinaliza os estágios mais tardios do ciclo de replicação e a síntese das proteínas verdadeiramente tardias (Roizman e Knipe, 2001). O genoma do SuHV-1 codifica diversas proteínas associadas diretamente com a síntese de DNA, inclusive algumas relacionadas diretamente com a replicação de DNA circular, o que respalda a indicação da replicação em *rolling cycle* (Lehmar e Boehmer, 1999).

As proteínas do capsídeo são transportadas para o núcleo onde ocorre a montagem do capsídeo e a inserção do DNA genômico. Durante a saída do núcleo celular, o nucleocapsídeo viral funde-se com a membrana interna, adquirindo seu envelope primário, e escapa para o espaço perinuclear. A morfogênese segue com a perda do envelope primário e o ganho do envelope final em associação com o tegumento nas organelas de secreção celular. O vírus maduro é levado para a superfície celular em uma espécie de compartimento ou vesícula derivada do compartimento do envelope.

4 Latência

Animais sobreviventes de uma infecção aguda do SuHV-1 estarão inevitavelmente infectados com o vírus em sua forma latente pelo restante de suas vidas. A latência geralmente ocorre no gânglio trigêmeo ou bulbo olfatório dos suínos, podendo também ocorrer nas tonsilas. Esse mecanismo é comum tanto em suínos domésticos quanto selvagens (Romero et al., 2003). Mesmo animais com altos índices de anticorpos detectados por soroneutralização estão sujeitos a infecção que acarretará em latência (McCaw et al., 1997). Esse fato é notado até mesmo em leitões com altos níveis de anticorpos provenientes do colostro. Mesmo que esses animais não apresentem sinais clínicos, tendem a abrigar o vírus em seus principais sítios de latência (Mengeling, 1989).

O vírus não pode ser isolado nesse estado, no entanto seu genoma permanecerá em forma episomal. O genoma permanece ativo para transcrição, mas apenas uma pequena região é transcrita (Cheung, 1989). Essa é denominada LAT ou *latency associated transcripts* e estende por cerca de 12,6 kpb. LAT são transcritos a partir da região de genes imediatamente precoces, porém em direção inversa (Priola e Stevens, 1991). Apesar de ainda se conhecer pouco sobre os LAT, sabe-se que um dos transcritos mais longos tem potencial para transcreever três proteínas diferentes (Cheung, 1995). A regulação desses transcritos está envolvida com genes como o IE180 e também com dois promotores, LAP1, essencial para transcrição em neurônios e dispensável em células de linhagem (Jin et al., 2000) e LAP2, ativo tanto em neurônios quanto em células não-neuronais (Taharaguchi et al., 2002).

A apoptose celular é inibida nos neurônios infectados pelo SuHV-1, apesar de esse efeito parecer ser temporário (Marcaccini et al., 2006). Análises recentes demonstram que a única proteína antiapoptótica conhecida desse vírus, US3, inibe a morte celular programada em neurônios do mesmo modo que ocorre em células de testículo e outras células não-neuronais do gânglio trigêmeo (Geenen et al., 2005).

A replicação do vírus é reativada tanto naturalmente por estresse, quanto experimentalmente por ações de drogas imunossupressivas. As partículas virais deslocam-se então para os sítios periféricos de replicação pelo caminho inverso da infecção. A reativação resulta em um novo episódio de disseminação do SuHV-1. A difusão e multiplicação virais são inversamente proporcionais ao nível de proteção imune do animal (Maes et al., 1997).

Os estudos sobre a latência e a reativação já foram realizados com camundongos para se determinar a importância da prenhez e do parto na reativação. Os resultados encontrados demonstram que nessa espécie animal há poucos indícios de atividade viral e infecção da prole,

porém o organismo maternal pode ser bastante afetado e implicar na diminuição de peso das crias (Tanaka e Mannen, 2008).

A ocorrência do fenômeno de latência é de alta preocupação para a suinocultura. Os animais latentes precisam ser eliminados do rebanho para evitar a recorrência de surtos da DA. Geralmente a eliminação é realizada com o auxílio de técnicas sorológicas que glicoproteínas específicas para diferenciação de animais. Realizam-se múltiplos testes para abate seletivo dos infectados, no entanto existem fenômenos que podem gerar alguns problemas nesse processo. Animais em estado de latência podem apresentar decaimento do nível de anticorpos, acarretando resultados falso-negativos (McCaw et al., 1997). É preciso observar com cuidado qual tipo de marcador utilizado em técnicas de ELISA. A comparação daqueles baseados em gE e gC com gG demonstrou que os primeiros são mais confiáveis (White et al., 1996).

5 Sinais Clínicos

Os sinais desenvolvidos pelos animais infectados pelo SuHV-1 variam principalmente segundo a faixa etária, estando ainda associados à estirpe e dose infecciosa. Há uma predileção pelos tecidos nervosos e respiratórios, sendo os primeiros mais freqüentes em animais jovens e os últimos nos mais velhos. O desenvolvimento da enfermidade nem sempre é aparente, sendo detectável apenas por sorologia em alguns rebanhos enquanto em outros ocorre uma rápida e grave disseminação do agente. A ausência dos sinais clínicos é mais freqüente quando não há animais muito jovens no local, sendo esses os mais susceptíveis à infecção (Kluge et al., 1999).

Os sinais clínicos mais freqüentemente relatados são os seguintes (agrupados por faixa etária):

Dois a quatro dias de idade: Ocorre um período de incubação de dois a quatro dias antes que os sinais clínicos sejam observados. Nota-se então febre (41°C), anorexia e depressão. Dentro de 24 horas,

poderá haver sinais ligados ao sistema nervoso central (SNC) como hipersalivação, incoordenação, ataxia e tremores. Os animais afetados tendem a se sentar como cães devido à paralisia dos membros posteriores. Após a apresentação dos sinais clínicos no SNC, os animais tendem a morrer em 24-36 horas. A mortalidade alcança até 100 %.

Três a nove semanas de idade: A mortalidade diminui nesse grupo, alcançando 50 % nos animais entre três e quatro semanas e 10 % após as cinco semanas de idade. Suas causas são as mesmas citadas anteriormente, no entanto os sinais clínicos tendem a ser menos severos surgindo entre três e seis dias após a infecção. Sintomas respiratórios podem estar presentes, caracterizados por corrimento nasal, dispnéia e progressão a tosse grave. Tais animais perdem uma quantidade significativa de peso, mas recuperam-se após o intervalo de duração dos sintomas (cinco a dez dias). A mortalidade é mais freqüente nos leitões que apresentam sinais no SNC e naqueles que sofrem uma infecção secundária concomitante aos sintomas respiratórios.

Animais de terminação: Há um baixíssimo índice de mortalidade em animais nessa faixa etária (entre 1 % e 2 %), todavia a morbidade alcança alarmantes 100 % que acarretaram na perda de pelo menos uma semana no ciclo de produção. Os sintomas surgem entre três e seis dias pós-infecção, entre os quais se incluem febre, depressão, anorexia e de leves a graves sinais respiratórios. Os sinais no SNC ocorrem esporadicamente, variando entre leves tremores musculares e convulsões violentas. A duração é de seis a dez dias, após os quais a recuperação é rápida com volta do apetite e desaparecimento da febre. As perdas aumentam em caso de infecções secundárias por *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

Reprodutores: Os sinais desenvolvidos são similares aos dos animais de terminação. Fêmeas prenhas abortam freqüentemente. Ocorre a reabsorção do feto no primeiro semestre de gestação. As falhas

reprodutivas entre o segundo e o terceiro trimestres são caracterizadas pelo aborto e nascimento de animais fracos ou prematuros. Esses sintomas ocorrem em cerca de 20% das fêmeas infectadas.

6 Epidemiologia

A transmissão da doença se dá por contato com secreções orais e nasais por aerossol. Também pode ocorrer pelas vias transplacentária e vaginal, além de pelo sêmen e leite. Tipicamente, um foco termina com os animais convalescentes permanentemente infectados com o vírus em estado de latência (Kluge et al., 1999).

A gravidade da infecção varia conforme a imunidade do rebanho. Geralmente, o efeito em um rebanho sem proteção ou contato prévio com o vírus é devastador, com até 90% de mortalidade entre suínos com até uma semana de idade (Kluge et al., 1999).

Focos já foram registrados em vários estados brasileiros como Minas Gerais, Rio de Janeiro e todos os estados da região Sul (Groff et al., 2005). Estudos realizados entre 1982 e 1986 em São Paulo relataram a existência de 66 focos da DA, além de um levantamento sorológico que determinou uma prevalência de 2,6% (Cunha et al., 1998). O estado de Santa Catarina registra a ocorrência da enfermidade desde 1983 com um aumento gradativo das granjas afetadas até o início do século XXI, quando se notou uma diminuição no número de relatos (Groff et al., 2005).

7 Impacto Econômico

A DA está difundida mundialmente e é considerada uma importante causa de perdas econômicas na criação de suínos (Piatti, 2001). Campanhas de erradicação já foram feitas em vários países, sendo que o programa de erradicação da DA na Inglaterra teve uma duração de dez anos. Nos Estados Unidos, a estimativa do custo do programa de erradicação foi de 197,1 milhões de dólares, sendo que haveria um ganho de 336,5 milhões de dólares para o

consumidor e 35,9 milhões de dólares para o produtor (Miller, 1996).

A erradicação da DA é importante para um país como o Brasil. Os suínos constituem o quarto maior rebanho brasileiro, com cerca de 31.949.106 cabeças em 2006, de acordo com dados do IBGE. A produção é de 2.298.242 toneladas por ano com um consumo per capita de 12 kg/habitante/ano. As exportações somam 528,2 mil toneladas com uma receita de 1,04 bilhão de reais. Sendo uma produção importante para o país, é fundamental o estudo de enfermidades que podem causar alto impacto como a DA. A enfermidade teve um impacto de quase um milhão de reais para o estado de Santa Catarina (Zanella, 2001). Em 2003, 5.075 animais foram destruídos e 29.350 foram abatidos. Nos anos seguintes, houve uma diminuição de focos, com apenas três focos relatados em 2005 (OIE, 2009).

8 Vacinação

A utilização de vacinas tem um papel importante na redução das perdas econômicas causadas pela DA. Sua função principal é a de reduzir ou até prevenir as consequências clínicas da DA, apesar de não impedir a infecção pelo SuHV-1 (Gerts et al., 1999). Possuem um potencial para interferir na disseminação do vírus, ainda que os animais não estejam protegidos contra infecções subseqüentes. A escolha de sua utilização é parte importante de um programa de erradicação, podendo ser necessária em propriedades localizadas em regiões de alto risco. Soma-se a isso a possibilidade de a vacinação reduzir a disseminação do vírus em um rebanho infectado, facilitando os testes e remoção dos infectados (Mengeling et al., 1997). A eficiência da imunização está diretamente relacionada com a via de vacinação e com a dose de desafio. Altas doses infecciosas são capazes de superar a imunidade adquirida, deixando os animais sujeitos até a uma disseminação de títulos virais comparáveis aos dos não vacinados. Quando desafiados com baixas doses infecciosas e vacinados por via intranasal, os animais excretam menor quantidade de

vírus e por menos tempo do que aqueles não vacinados ou do que aqueles vacinados via intramuscular (Arellano et al., 1992).

As vacinas para a DA estão disponíveis como vacinas atenuadas ou inativadas. A deleção de genes específicos é essencial para a posterior diferenciação dos animais vacinados. Existem diferentes tipos de vacinas atenuadas no mercado com deleções em porções variadas do genoma para permitir tanto a atenuação do vírus quanto a posterior diferenciação dos animais vacinados daqueles infectados (Vannier, 2003). Os genes para timidina quinase, gE, gI, gC, UL21 e gG são os mais comumente encontrados. Nem todas essas deleções provocam a redução da virulência, como acontece com gG e gC (Mettenleiter, 1990). A deleção para certas proteínas como gE e gI reduz consideravelmente a difusão neuronal, porém nenhuma das deleções impede que as vacinas atenuadas produzam infecções latentes (Maes al., 1997). Em alguns casos, essas infecções latentes podem até ser reativadas e difundir o vírus vacinal (Mengeling et al., 1992).

Existem diferenças entre os tipos de deleções na proteção induzida pela vacinação. A via intranasal foi considerada a melhor para a administração das vacinas atenuadas. Além da via, o genótipo vacinal foi um fator importante na capacidade de gerar latência, incluindo na carga viral encontrada no gânglio trigêmeo e a quantidade de vírus excretado após o desafio (Vilnis et al., 1998).

A utilização de vacinas pode ser crucial para a eliminação do SuHV-1, no entanto é preciso se tomar alguns cuidados para que eficiência máxima seja alcançada como utilizar a via adequada de vacinação, repetir os *boosters* e evitar a entrada de novos animais positivos nos rebanhos ou aqueles vacinados com outros marcadores (Pensaert et al., 2004).

O Plano de Contingência da Doença de Aujeszky prevê a utilização de vacinas atenuadas ou inativadas com deleção para gE, mas apenas em focos com diagnóstico laboratorial positivo para DA. A

diferenciação de animais vacinados é feita por ELISA, mas ainda existe a possibilidade de diagnóstico por PCR para identificação de animais únicos reativos.

9 Controle e erradicação

A Instrução Normativa nº 8 de três de abril de 2007 do MAPA prevê a necessidade de cada estado brasileiro criar um plano estadual de combate à DA de acordo com a regulamentação prevista no Plano de Contingência. Entre os requisitos do mesmo estão um serviço de defesa sanitária animal estruturado, implementação de educação da população e normas complementares à legislação federal.

Antes do desenvolvimento do plano estadual, a unidade federativa deverá realizar um inquérito soropidemiológico nos estabelecimentos de criação ou vacinação. Uma vez aplicadas as normas, haverá a necessidade de um segundo inquérito para se solicitar a certificação de zona livre ou provisoriamente livre. Em caso de a atividade viral não ser observada já no primeiro inquérito e o estado estiver de acordo com as normas e exigências sanitárias federais e da OIE, poderá haver a solicitação direta da certificação.

Prevê-se o diagnóstico por ELISA (triagem ou para gE em caso de vacinação) e teste de neutralização viral. As técnicas de PCR e isolamento viral poderão ser utilizadas como confirmatórias. A vacinação é prevista apenas para propriedades com diagnóstico laboratorial para a DA.

Focos confirmados implicam em medidas de saneamento, desde a vacinação até o inquérito soropidemiológico em estabelecimentos de criação de suínos em um raio de cinco quilômetros. Aplica-se então o despovoamento imediato, gradual ou a erradicação por sorologia.

Um programa nacional bem fundamentado é imprescindível para a erradicação da DA. Países como a Alemanha só conseguiram eliminar a enfermidade após a implantação

de um programa oficial de erradicação. Nesse caso, em um prazo de catorze anos, reduziu-se o número de focos de dois mil por ano para zero (Müller et al., 20003). A Holanda também conseguiu a erradicação e certificação de suas granjas como livres de DA graças a um programa que incluía vacinação e eliminação de animais positivos. Em sete anos, o país pode parar a vacinação e passar apenas para a etapa de vigilância (Elbers et al., 2000).

A DA já foi erradicada em outros países como Estados Unidos e Alemanha, principalmente com a utilização de vacinas deletadas. Os estudos mais recentes se voltaram para o diagnóstico em porcos ferais ou javalis, atuais responsáveis pela manutenção do vírus na vida selvagem (Ruiz-Fons et al., 2007; Wyckoff et al., 2009)

10 Diagnóstico

O Manual de Testes de Diagnóstico e Vacinas de Animais Terrestres (OIE, 2009) prevê o diagnóstico da DA utilizando-se isolamento viral em células de linhagem suscetíveis como PK15. Testes sorológicos e de detecção de DNA também são indicados.

A neutralização viral é prevista como o método sorológico de referência, porém os ELISAs são mais comumente utilizados em diagnósticos. A primeira tem a desvantagem de necessitar de técnicas de cultivo celular e de um prazo maior para o resultado. Os kits de ELISA disponíveis comercialmente são mais sensíveis do que a neutralização viral, além de existirem versões que permitem a diferenciação entre animais vacinados e naturalmente infectados.

As técnicas de PCR são previstas para a o diagnóstico, mas ainda sem um procedimento padrão. Recomenda-se a utilização de regiões conservadas como os genes para gB e gD. A técnica pode contribuir para o diagnóstico da DA e identificação rápida dos vírus em campanhas de monitoramento ou de erradicação para se analisar a presença de animais únicos reativos, i. e., indivíduos do rebanho que reagem positivamente nos

testes de ELISA utilizados no monitoramento que aparentemente não são infectados (Bascuñana, 1997). A PCR já foi aplicada em outras situações, como vigilância epidemiológica e análise do número de cópias do vírus em animais com infecção latente na China (Yoon et al., 2005). A utilização de vacinas deletadas para gE é uma vantagem que também pode ser aproveitada pela PCR. Iniciadores podem ser desenhados para terem como alvo os genes para alguma glicoproteína conversada do vírus e gE, permitindo assim a detecção da presença do SuHV-1 e ainda sua diferenciação. Essa pode ser uma ferramenta importante para avaliar a biossegurança na utilização de vacinas atenuadas, permitindo detectar a presença dessas no rebanho suíno (Ma et al., 2008).

O diagnóstico diferencial da DA é um fator importante em um programa de erradicação. Os diferentes sinais podem causar confusão com aqueles causados por outras infecções virais como influenza suína (IS), peste suína clássica (PSC) e síndrome reprodutiva respiratória suína (PRRS). Métodos moleculares baseados na PCR estão disponíveis na literatura, permitindo a detecção de diversos agentes, o que aumenta a qualidade de um diagnóstico ao definir não apenas a ausência de uma enfermidade, mas outros prováveis motivos para os sintomas encontrados nos animais. É possível desenvolver PCR multiplex para diagnóstico simultâneo de circovírus suíno 2, parvovírus suíno, vírus da PRRS e SuHV-1 (Ye et al., 2009) ou circovírus suíno, citomegalovírus suíno e SuHV-1 (Lee et al., 2007). Avanços na tecnologia e na biologia molecular já permitem o diagnóstico rápido e simultâneo, em cerca de sessenta minutos, do SuHV-1, vírus da PRRS e parvovírus suíno (Sámi et al., 2007).

A publicação desses trabalhos demonstra a importância de associar o avanço das técnicas de biologia molecular e os métodos de diagnóstico nos programas de erradicação. À medida que programas de erradicação avançam, técnicas como o isolamento viral tornam-se de difícil execução devido ao aumento dos níveis de biossegurança exigidos. A utilização da

PCR com fins de diagnóstico também permite utilizar os resultados para outras análises de epidemiologia molecular. Em alguns países, como Estados Unidos, isolar o vírus tornou-se prática menos comum quando os avanços da biologia molecular permitiram o desenvolvimento de técnicas sensíveis e específicas (USDA, 2008).

11 Epidemiologia molecular

As técnicas da biologia molecular fazem parte do diagnóstico de doenças infecciosas há alguns anos, mas não se restringem a essa área. Podem ser amplamente utilizadas para a caracterização dos microorganismos. Essas informações podem ser facilmente integradas a dados epidemiológicos.

O polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP, *restriction fragment length polymorphism*) trabalha com o corte do DNA do microorganismo por enzimas de restrição. O genoma fragmentado é então analisado através de eletroforese em gel onde são visualizadas bandas de tamanhos diferentes de acordo com os cortes. As diferenças no perfil de bandas são geradas por polimorfismos que afetam os sítios de restrição, permitindo então diferenciar amostras virais.

Os isolados de campo do SuHV-1 foram subdivididos em tipos genômicos através da análise de padrões de fragmentos de restrição do genoma completo, principalmente com o uso da enzima *BamHI*. Uma sistematização foi sugerida por

Hermann et al. (1984) propondo três tipos genômicos para os isolados europeus. Foi confirmada e incrementada posteriormente, criando divisões dentro dos tipos genômicos (Christensen, 1988). As subdivisões são tipo genômico I (Ia, Iia, Ib, In, Ip, Is, Iip), encontrado no Reino Unido, Suécia e Nova Zelândia, tipo genômico II (IIa, IIp), encontrado no Japão e Europa Central, tipo genômico III (IIIa, IIIp), encontrado na Dinamarca.

A genotipagem por RFLP já foi realizada no Brasil. O genótipo II foi o mais comumente encontrado com apenas alguns exemplares do tipo I. O primeiro tipo genômico a ser introduzido no Brasil parece ter sido o II, como nota-se pela caracterização de um isolado de 1954 do Rio Grande do Sul. Essa estirpe se difundiu pelo Brasil, sendo a principal responsável pelos focos entre 1983 e 2003 em Santa Catarina e na década de 1990 em São Paulo (Piatti et al., 2001; Silva et al., 2005; Schaeffer et al., 2006).

A restrição genômica por *BamHI* é ainda uma técnica importante, principalmente para a comparação com dados mais antigos, no entanto, publicações mais recentes têm utilizados a técnica de sequenciamento da região codificante da porção N-terminal de gC (gene *UL44*). A variabilidade da região foi descrita pela primeira vez por Ishikawa et al. (1996) e utilizada para a reconstrução da filogenia por Goldberg et al. (2001). Desde então, outros trabalhos basearam-se nas mesmas informações gênicas para a construção de árvores filogenéticas (Fonseca Jr. et al., 2010; Hahn et al., 2010; Müller et al., 2010).

PARTE 2: DIAGNÓSTICO MOLECULAR DO VÍRUS DA DOENÇA DE AUJESZKY

As ferramentas de diagnóstico molecular representam um grande avanço na detecção de microrganismos infecciosos. As vantagens desses métodos sobre os imunológicos são variadas, dependendo inclusive do tipo de técnica e quais os reagentes utilizados.

Na segunda parte dessa tese, pretende-se descrever como a PCR colabora no diagnóstico da DA. Em cada capítulo um método específico e inédito é descrito, cada um com um foco em uma das peculiaridades do vírus ou da enfermidade. Os métodos desenvolvidos em cada etapa abordam tanto problemas na detecção específica do vírus em suínos quanto àqueles acarretados pela infecção em outras espécies. Por fim, abordam-se outros aspectos, os sinais clínicos respiratórios característicos pela infecção de animais adultos.

O Capítulo 1 trata de um projeto piloto desenvolvido para avaliar a possibilidade de utilizar um protocolo básico de validação de testes de diagnóstico molecular. A partir desse, também foi possível desenvolver um método prático para diferenciar estirpes vacinais do SuHV-1 das selvagens.

O Capítulo 2 avança para uma técnica de elevada sensibilidade no diagnóstico de

SuHV-1. A nested PCR desenvolvida permite a detecção do DNA viral com alta precisão e ainda, a partir do resultado final, diferenciar os genótipos presentes no Brasil sendo recomendada como confirmatório em resultados duvidosos.

A PCR em tempo real descrita no Capítulo 3 trabalha com um método rápido e sensível para a detecção do vírus. Os procedimentos de validação descritos são extensos e sua descrição é a primeira na área de diagnóstico molecular de herpesvírus animais. Essa PCR utiliza uma das químicas mais baratas para as reações moleculares em tempo real, os agentes intercalantes de DNA. O baixo custo e a velocidade do diagnóstico são de grande valia na rotina do laboratório.

O SuHV-1 não causa doença apenas em suínos. Faz parte de um grupo de agentes capaz de causar encefalite em bovinos. No capítulo 4, o objetivo foi desenvolver um diagnóstico rápido e eficiente para se detectar quatro herpesvírus que causam doenças nervosas. Além do SuHV-1, somam-se o BoHV-1, o BoHV-5 e OvHV-2.

A segunda parte dessa tese se encerra no capítulo 5 com a descrição de dois métodos de PCR multiplex em tempo real para detecção de seis agentes causadores de doenças respiratórias. Todos esses podem agravar os sinais quando coinfetam suínos, sendo causadores de grandes prejuízos na suinocultura.

Capítulo 1: PCR DUPLEX PARA DIFERENCIAÇÃO DE AMOSTRAS VACINAIS E SELVAGENS DO VÍRUS DA DOENÇA DE AUJESZKY

Publicado como:

Fonseca Jr., A.A., Dias, N. L., Leite, R. C., Heineman, M. B., Reis, J. K. P. PCR duplex para diferenciação de amostras vacinais e selvagens do vírus da doença de Aujeszky. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, vol.62, n.5, pp. 1259-1262, 2010.

ABSTRACT

A duplex PCR was developed to differentiate the wild-type virus from the attenuated virus used in vaccinations. The PCR was able to amplify fragments of 493bp for glycoprotein E (gE) gene and 207bp for glycoprotein B (gB) gene. The analytical sensitivity was determined by addition of a virus field sample titled in the brain samples of pigs. The standard virus strain Shope, the vaccine strain Bartha, and ten other field isolates were subjected to PCR. The PCR was able to amplify fragments of gE and gB in all field samples and only fragments of gB were amplified in the attenuated virus, as expected. The technique was able to detect up to 10^{0.5} TCID₅₀/mL virus in samples of brain. Duplex PCR proved to be an important tool for differentiation of naturally-infected animals and animals vaccinated with the virus deleted for gE.

Keywords: *Aujeszky's disease, PCR, Vaccine*

A doença de Aujeszky (DA) é uma enfermidade de grande relevância na suinocultura, sendo de notificação obrigatória pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE, 2009). Sua importância não se dá apenas pelo impacto econômico causado pelo elevado índice de letalidade em leitões, mas também por barreiras sanitárias na exportação de carne suína (Bascuñana et al., 1997).

O agente etiológico da DA é o *suid herpesvirus 1* (SuHV-1), classificado como um membro da família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*, gênero *Varicellovirus* (Pomeranz et al., 2005).

Nos suínos, a DA é caracterizada pelos sinais neurológicos e elevada letalidade em animais jovens. Em animais mais velhos, a letalidade diminui, porém há uma alta morbidade e a predominância de sinais respiratórios. Todo suíno sobrevivente poderá ser considerado um portador latente, tornando-se uma fonte de infecção quando o vírus é reativado devido à imunossupressão normalmente desencadeada por estresse (Pomeranz et al., 2005).

Um dos principais métodos de controle da DA é a vacinação utilizando vírus atenuados deletados para uma das glicoproteínas do SuHV-1. A glicoproteína E (gE) é comumente deletada nessas amostras, de modo que animais vacinados possam ser posteriormente diferenciados por testes sorológicos (Dambros et al., 2007). Apesar da especificidade dos testes baseados na detecção de anticorpos, como ELISA e soroneutralização, eles têm a desvantagem de depender da soroconversão do animal. A utilização desses testes durante a fase aguda da doença pode levar a resultados falso-negativos, pois são necessários pelo menos 10 dias, em média, para a detecção dos anticorpos específicos (Kinker et al., 1997). Animais mais jovens podem morrer antes da soroconversão, inviabilizando o diagnóstico sorológico (Kinker et al., 1997). O problema não se resume somente à fase aguda da infecção, pois animais portadores do vírus latente podem apresentar decaimento do nível de anticorpos, acarretando também resultados falso-negativos (McCaw et al., 1997).

Em 2007, o Plano de Erradicação da Doença de Aujeszky foi aprovado pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA - Brasil, 2007). A

vacinação é utilizada no Brasil somente em casos de focos confirmados, sendo permitido o uso de vacinas atenuadas e inativadas, desde que não produzam anticorpos para gE. O plano também preconiza a proibição do trânsito de animais vacinados, a menos que seja para o abate.

O objetivo deste trabalho foi padronizar uma PCR duplex para diferenciação do vírus vacinal do vírus selvagem, visto que a PCR pode ser uma ferramenta importante não só para o diagnóstico da enfermidade, mas também por permitir a diferenciação de animais reativos que não puderam ser discriminados pelos testes sorológicos.

A estirpe padrão Shope e a vacinal Bartha foram utilizadas para padronização da técnica. A amostra Shope foi titulada em células de rim de suíno (PK15), obtendo-se o resultado de $10^{4.5}$ TCID₅₀/mL. Após a padronização, a PCR foi avaliada em amostras clínicas. Dez amostras de cérebro de suínos positivos para SuHV-1, por meio do isolamento e identificação em cultivo celular segundo recomendação do manual da OIE (2009), foram utilizadas neste trabalho. Outras 20 amostras de cérebro de suíno de rebanhos livres do SuHV-1 foram colhidas em um abatedouro e submetidas ao isolamento viral (OIE, 2009), e todas elas foram consideradas negativas em trabalhos anteriores (Fonseca Jr. et al., 2010a). A extração de DNA foi realizada pelo método descrito por Sambrook et al. (1989).

Os alvos da PCR duplex foram a glicoproteína E (gE) e a glicoproteína B (gB), sendo gB altamente conservada e essencial para a replicação do vírus (Pomeranz et al., 2005). A mistura da PCR duplex foi constituída de: 6pmoles de cada iniciador para gB (gBF 5'GAACCTGACGCTGCTGGAGGACCGAC CG3' e gBR 5'AGGCCCTGGAAGAAG'ITGGCGATGCAT GC3' (Bascuñana et al., 1997)) (IDT, Estados Unidos), 7,5pmoles de cada iniciador para gE (gEF 5'CCGCGGGCCGTGTTCTTTGT3' e gER 5'CGTGGCCGTTGTGGGTCAT3' (Huang et al., 2004)) (IDT, USA), 2U de Taq DNA Polimerase Platinum (Invitrogen, Estados

Unidos), 2µL de Tampão 10x, MgCl₂ 1,5mmol/L, 6% de DMSO, DNTP 200 µmol/L (Invitrogen, Estados Unidos). As condições utilizadas para a PCR duplex foram as seguintes: um estágio de desnaturação a 95°C por 5min, 35 ciclos a 95°C por 45s, 60°C por 45s, 72°C por 15s e um estágio final de extensão a 72°C por 5min. O tamanho do fragmento para o gene gB era de 207pb e para gE de 498pb.

A determinação da sensibilidade analítica da PCR duplex foi realizada com a estirpe padrão Shope como descrito por Fonseca Jr. et al. (2010a). Nove isolados de campo do SuHV-1 previamente caracterizados (Fonseca Jr. et al., 2010b) foram utilizados para verificar se os iniciadores eram capazes de detectar estirpes dos vírus circulantes no Brasil. Também foi utilizada a amostra NIA-4 que é deletada para gE. O DNA foi extraído conforme descrito anteriormente.

A PCR duplex foi capaz de diferenciar a amostra vacinal Bartha da amostra padrão Shope. Visualizou-se apenas uma banda de 207pb (Fig. 1A), referente ao gene codificante de gB, quando a estirpe Bartha é submetida à reação. A estirpe padrão Shope apresenta um perfil com duas bandas, resultado da amplificação dos genes de gB e gE com os tamanhos de 207pb e 498pb, respectivamente (Fig. 1A). Todas as amostras clínicas positivas amplificaram para os dois genes na PCR duplex (Fig. 1B). Não houve a formação de bandas inespecíficas nos testes das amostras negativas (Fig. 1 A e B).

A sensibilidade analítica da técnica foi de $10^{0.5}$ TCID₅₀/mL em cérebro de suíno (Fig. 1B). Não houve nenhuma ausência de amplificação nesse limite. Uma reação com concentração de vírus correspondente a $10^{1.5}$ TCID₅₀/mL amplificou em apenas uma das três repetições.

Todas os isolados testados amplificaram para ambos os genes, gB e gE na PCR duplex, sem demonstrarem divergências nos tamanhos das bandas. A amostra NIA-4 apresentou um perfil de amplificação idêntico ao da estirpe vacinal Bartha, como

esperado (Fig. 1A). A utilização de dois pares de iniciadores para amplificação das duas regiões gênicas em estudo diminuiu a sensibilidade da PCR duplex em cerca de 10 vezes.

O diagnóstico de enfermidades virais tem como teste de referência, em sua maioria, o isolamento do agente infeccioso em sistemas celulares (OIE, 2009). Para a DA, a OIE (2009) aconselha em seu manual de diagnóstico, sempre que possível, a utilização do isolamento viral. Essa técnica, no entanto, tem como desvantagens a necessidade do cultivo de células de linhagem contínua e o fato de contar com o vírus ainda ativo. Outros problemas

dificultam o processo, como as várias passagens e o risco de contaminação dos cultivos celulares com bactérias e fungos presentes na própria amostra clínica. Os métodos imunológicos são uma boa alternativa para esse diagnóstico, porém estão sujeitos a resultados falso-negativos quando os animais ainda estão na fase aguda da infecção ou quando ocorre queda do título de anticorpos na infecção latente (McCaw et al., 1997). Caso o animal morra antes da soroconversão, as técnicas sorológicas não são de grande valia. Nesses casos, a PCR duplex é uma alternativa importante no laboratório de diagnóstico.

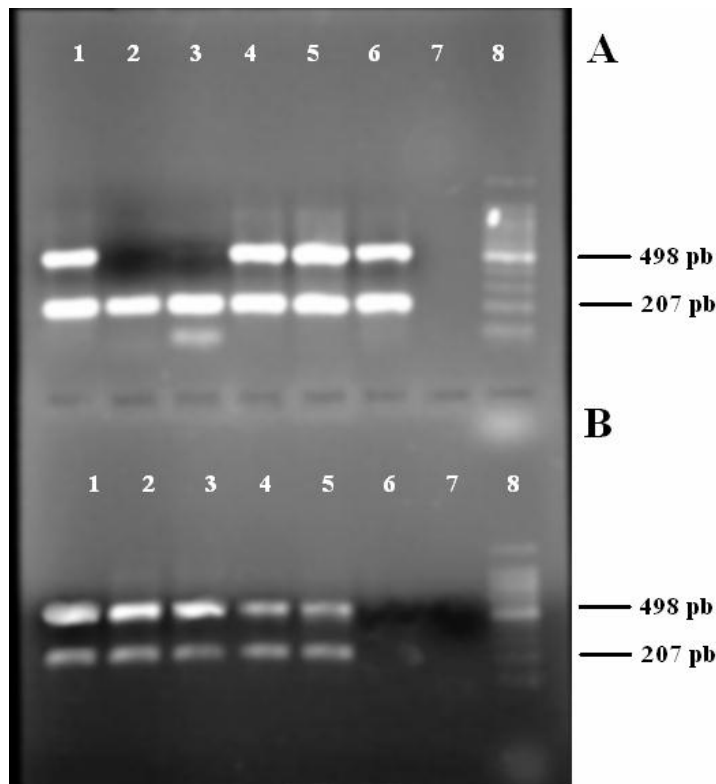


Figura 1. Resultado da PCR duplex em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo. A: 1 – amostra padrão Shope; 2 – amostra vacinal Bartha; 3 – isolado de campo NIA-4; 4 – amostra clínica; 5 – isolado de campo 031; 6 – isolado de campo F3319; 7 – controle negativo; 8 – marcador de tamanho molecular. B: determinação da sensibilidade analítica: 1 - $10^{4,5}$ TCID₅₀/mL; 2 - $10^{3,5}$ TCID₅₀/mL; 3 - $10^{2,5}$ TCID₅₀/mL; 4 - $10^{1,5}$ TCID₅₀/mL; 5 - $10^{0,5}$ TCID₅₀/mL; 6 - $10^{-1,5}$ TCID₅₀/mL; 7 - $10^{-2,5}$ TCID₅₀/mL, 8 – marcador de tamanho molecular.

O Plano de Erradicação da DA do MAPA determina que apenas vacinas deletadas para gE podem ser utilizadas nos focos (Brasil, 2007). Além da diferenciação de amostras vacinais e selvagens, a PCR duplex desenvolvida neste trabalho pode ser utilizada para estudar o risco de difusão do vírus vacinal nos rebanhos, sendo, portanto, uma ferramenta importante até mesmo em questões de biossegurança. As vacinas atenuadas, apesar de mais eficientes em sua proteção, oferecem risco por ainda serem infectantes.

O SuHV-1 é um vírus geneticamente estável, no entanto existem dois genótipos distintos no Brasil, o I e o II (Fonseca Jr. et al., 2001b). Amostras desses genótipos foram testadas e todas amplificaram com perfil idêntico ao do padrão Shope, indicando que a PCR duplex é capaz de detectar os vírus circulantes no país a despeito dos polimorfismos nos genes utilizados na PCR duplex.

A detecção de animais únicos reativos (animais infectados que reagem nos testes imunológicos de diferenciação vacinal, mas não no de triagem) é importante nos programas de erradicação e na certificação de granjas. Esse fenômeno foi descrito nos Estados Unidos, Holanda, Alemanha, Reino

Unido e Suécia (Bascuñana et al., 1997). PCRs convencionais foram utilizadas para a confirmação do diagnóstico em todos esses casos. A utilização da PCR duplex economiza tempo e reagentes ao distinguir vírus selvagens de vírus vacinal com apenas uma reação.

Outros autores salientaram a importância da PCR no diagnóstico da DA (Yoon et al., 2006). À medida que os programas de erradicação avançam, as normas sobre manipulação dos agentes infecciosos tornam-se mais rígidas. Em estágios mais avançados dos programas de erradicação, o isolamento viral não é aconselhado. A PCR duplex padronizada neste trabalho é, então, uma ferramenta alternativa muito útil e de custo baixo para detecção e diferenciação do SuHV-1. Além disso, seus produtos ainda podem ser utilizados em sequenciamento para análises de epidemiologia molecular.

A PCR duplex padronizada para detecção e diferenciação de SuHV-1 vacinal e selvagem foi sensível, sendo que a técnica molecular é menos trabalhosa que o isolamento e pode ser utilizada tanto como rotina de diagnóstico quanto ferramenta auxiliar na presença de resultados inconclusivos nas provas sorológicas.

Capítulo 2: DIAGNÓSTICO E GENOTIPAGEM DO VÍRUS DA PSEUDORAIVA POR NESTED-PCR E ANÁLISE DE RESTRIÇÃO ENZIMÁTICA

Fonseca Jr., A. A.¹, Carmagos, M. F.¹, D'Ambros, R. M.², Braga, A. C.³, Ciacci-Zanella, J.⁴, Heinemann, M. B.⁵, Leite, R. C.⁵, Reis, J. K. P.⁵

¹Laboratório Nacional Agropecuário, MAPA, Pedro Leopoldo-MG, Brazil;

²Centro de Diagnóstico em Sanidade Animal, Concórdia-SC, Brazil ;

³Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), Fepagro, Eldorado do Sul-RS, Brazil;

⁴Laboratório de Sanidade, EMBRAPA Suínos e Aves, Concórdia-SC, Brazil

⁵Laboratório de Retrovírus - Escola de Veterinária da UFMG, Belo Horizonte-MG, Brazil

Publicado como:

Fonseca Jr., A.A., Carmagos, M. F., D'Ambros, R. M., Braga, A. C., Ciacci-Zanella, J., Heinemann, M. B., Leite, R. C., Reis, J. K. P. Diagnóstico e genotipagem do vírus da pseudorraiva por nested-pcr e análise de restrição enzimática. *Ciência Rural*, vol.40, n. 4, 2010.

RESUMO

A doença de Aujeszky (DA) ou pseudorraiva é uma enfermidade viral responsável por consideráveis perdas econômicas na indústria de suínos. O vírus da pseudorraiva (SuHV-1) apresenta apenas um sorotipo, mas por análise de restrição enzimática, foi classificado em quatro genótipos denominados I, II, III e IV. Os métodos usados para genotipagem dependem do isolamento do vírus, purificação do DNA viral, restrição enzimática do genoma completo e visualização após eletroforese. O objetivo desse trabalho foi estabelecer um método mais rápido e sensível para detectar e genotipar o SuHV-1 por *nested*-PCR e análise de restrição enzimática. Vinte isolados do SuHV-1 das regiões sul e sudeste do Brasil e a estirpe padrão Shope foram replicadas em células PK-15 e submetidas à *nested*-PCR para o gene da glicoproteína E. Além desses vírus previamente isolados, foram avaliadas 75 amostras clínicas de cérebro de suíno em um total de 25 animais positivos para a DA tanto no isolamento quanto na soroneutralização viral e 50 amostras negativas provenientes de animais negativos na soroneutralização viral e de granjas sem histórico de DA. Todas as amostras clínicas tiveram resultados compatíveis com o isolamento e a soroneutralização, sendo que a totalidade

das amostras positivas foi classificada como genótipo II. A sensibilidade analítica da *nested*-PCR foi de $10^{-1,3}$ TCID₅₀ mL⁻¹. A combinação da *nested*-PCR e da restrição enzimática foi capaz de detectar e genotipar o vírus com resultados em 1-2 dias, sendo mais rápida que os métodos convencionais de restrição do genoma completo que podem demorar até 7 dias.

Palavras-chave: genotipagem, *nested*-PCR, pseudorraiva, restrição enzimática.

INTRODUÇÃO

A doença de Aujeszky (DA) ou pseudorraiva é uma enfermidade de grande importância na suinocultura devido aos elevados prejuízos que causa na cadeia produtiva da indústria suína, seja por danos diretos nas granjas como também por barreiras sanitárias. O agente etiológico da enfermidade é o vírus da pseudorraiva (SuHV-1) também denominado herpesvírus suíno 1, um membro da família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*, que possui apenas um sorotipo (Murphy et al., 1995). A transmissão do vírus usualmente ocorre pela via oro-nasal. O suíno é o hospedeiro natural do SuHV-1, mas o vírus pode infectar outros animais domésticos como cães e bovinos. A intensidade dos sinais clínicos e a mortalidade dependem da idade do

hospedeiro, e a infecção latente é sempre estabelecida após a recuperação do animal (Mettenleiter et al., 1999).

Apesar do vírus possuir apenas um sorotipo, diferentes genótipos do SuHV-1 podem ser identificados pela análise por endonucleases de restrição, sendo que a identificação dos genótipos é de relevante importância para estudos epidemiológicos (Kluge et al., 1999). O método baseado em análise de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) com a enzima *BamHI* foi descrito previamente e provou ser capaz de dividir o SuHV-1 em quatro genótipos. Os genótipos I e II estão distribuídos mundialmente e os genótipos III e IV estiveram restritos à Dinamarca e Tailândia, respectivamente, e não foram mais relatados (Christensen, 1995).

No Brasil foram identificados os genótipos I e II por meio do RFLP (Piatti et al., 2001; Schaeffer et al., 2006). O Rio Grande do Sul (RS) manteve-se sem relato da DA durante 49 anos, até o foco de 2003, causado por um vírus pertencente ao genótipo II. Análises de RFLP permitiram detectar que esse era o mesmo tipo genômico presente no estado de Santa Catarina que ainda não havia completado seu programa de erradicação na época do surto no RS (Silva et al., 2005). O mesmo método identificou amostras do genótipo I no estado do Paraná, um tipo incomum no Brasil, mas presente na Argentina, o que indica a possível introdução desse genótipo por animais com o vírus latente daquele país (Schaeffer et al., 2006).

O método de RFLP com *BamHI* é útil na diferenciação do SuHV-1, mas muito complexo pois requer o isolamento do vírus, processos de ultra-centrifugação para purificação do DNA e uma eletroforese de temperatura controlada que pode durar até 20 horas. Além da boa qualidade da amostra para evitar contaminações e destruição do vírus, é necessário que o mesmo esteja ativo, já que o SuHV-1 não pode ser isolado quando se encontra em latência (Pomeranz et al., 2005).

A detecção do vírus, seja ele no estado latente ou replicativo, pela PCR é uma ferramenta importante no controle da doença (Yoon et al., 2005; Yoon et al., 2006; Sámi et al., 2007). Esta metodologia foi sugerida no plano de erradicação da DA no Brasil elaborado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil, 2007) e recomendada pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE, 2008).

O objetivo desse trabalho foi associar as técnicas de *nested*-PCR e a análise de restrição enzimática visando a obtenção de um método rápido e sensível para detecção e caracterização genotípica do SuHV-1.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Vinte amostras do SuHV-1 isoladas nas regiões Sul e Sudeste do Brasil previamente genotipadas como tipo I e II (Piatti et al., 2001; Silva et al., 2005) e a estirpe padrão Shope foram multiplicadas em células PK-15 (Tabela 1). Amostras do genótipo III e IV não foram utilizadas por terem sido descritas exclusivamente na Dinamarca, onde a DA já foi erradicada, e na Tailândia, também livre de novos focos com esses genótipos nos últimos anos (Christensen, 1995). A amostra padrão Shope, com título viral de $10^{4.5}$ TCID₅₀/50 µL foi utilizada na padronização da reação.

O DNA de todas as amostras utilizadas nesse trabalho foi extraído pelo Kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega, Estados Unidos) segundo recomendações do fabricante e armazenado a -20°C.

Análise *in silico* dos sítios de restrição enzimática

A restrição enzimática para o gene codificante da glicoproteína E foi baseada na seqüências obtidas por Fonseca Jr. et al. (2010) que foram submetidas ao programa pDraw32 (Kjeld, 2006) para a escolha de uma enzima de restrição que clivasse os amplicons e diferenciasse os genótipos. Os

iniciadores desenhados com o intuito de flanquear a região do polimorfismo e a enzima *BtgI* foram escolhidos para a utilização na *nested*-PCR seguida da restrição enzimática. A enzima *HphI* foi selecionada no mesmo programa para ser o controle da restrição enzimática para garantir que a reação de digestão não sofria inibição.

Nested-PCR

Os iniciadores externos gE-E-F (5'-CCAACGACACGGGCTCTAC-3') e gE-E-R (5'-CGAGCGTGTAGTCCCAGGTG-3') e internos gE-I-R (5'-GCGTTCGTGTGCACCTCCT-3') e gE-I-F (GGGGACACGTTTCGACCTGAT), foram desenhados com o auxílio do programa Primer3 (Rozen e Skaletsky, 1998). A *nested*-PCR foi realizada nas seguintes condições: a primeira reação de 20 μ L com 0,25 pmol/ μ L de cada iniciador (gE-E-F e gE-E-R), 1,5U de Taq polimerase (GoTaq, Promega, Estados Unidos), tampão GoTaq 5x, MgCl₂ 1.9 mmol L⁻¹, 4% DMSO e DNTP a 200 μ mol L⁻¹, 2 μ L de DNA. Os ciclos da reação foram os seguintes: desnaturação a 95°C por 5min, 35 ciclos de 95°C por 50s,

58°C por 40 seg, 72°C por 50 seg. e extensão a 72°C por 5min. A segunda reação foi realizada como a seguir: iniciadores gE-I-F e gE-I-R e soluções de 20 μ L com 0,3 pmol/ μ L de cada iniciador, 1.0U de Taq polimerase (GoTaq), Tampão GoTaq 5x, 1.5mmol L⁻¹ MgCl₂, 4% DMSO, 200 μ mol L⁻¹ DNTP e 2 μ L da reação externa. As temperaturas e tempos da reação foram: 95°C por 5min, 15 ciclos de 95°C por 40s, 64°C por 40s, 72°C por 40s, 20 ciclos de 95°C por 40s, 59°C por 40s, 72°C por 40s e extensão a 72°C for 3min. O fragmento amplificado de 317pb foi visualizado em gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídeo (0,5 μ g mL⁻¹), sob luz ultravioleta.

Especificidade Analítica

A amostra padrão Shope, cinco amostras do genótipo I e 14 amostras do genótipo II do SuHV-1 isoladas no Brasil em Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina, e Rio Grande do Sul, previamente caracterizadas por Fonseca Jr. et al. (2009), mais amostras de herpesvírus bovino 1 (BoHV-1), herpesvírus bovino 5 (BoHV-5) e *Streptococcus suis* foram utilizadas para análise da especificidade analítica.

Tabela 1 - Amostras padrão e de isolados brasileiros de SuHV-1 utilizadas no estudo

Vírus	Isolado de	Origem	Características	Ano de isolamento	Genótipo
Shope	Bovino	ATCC; Hungria	Padrão	1942	I
Nova Prata	Bovino	RS	Isolado	1956	II
031	Suíno	Coronel Vívica – PR	Isolado	1984	I
673	Suíno	M. Cândido Rondon – PR	Isolado	1984	I
936	Suíno	Santa Rosa – PR	Isolado	1983	I
Piau	Suíno	Igarapé - MG	Isolado	1984	I
3288	Suíno	Seara - SC	Isolado	2002	II
3293	Suíno	Xanxerê - SC	Isolado	1983	II
3303	Suíno	Toledo – PR	Isolado	1984	I
3308	Suíno	Rio do Sul - SC	Isolado	1989	II
3333	Suíno	Desconhecido - SC	Isolado	2002	II
3338	Suíno	Ipumirim - SC	Isolado	1983	II
3380	Suíno	Concórdia - SC	Isolado	1986	II
3356	Suíno	Concórdia - SC	Isolado	1988	II
3370	Suíno	Concórdia - SC	Isolado	1984	II
3319	Suíno	Concórdia - SC	Isolado	1989	II
EVI-192/03	Suíno	Ponte Preta - RS	Isolado	2003	II
EVI-193/03	Suíno	Erechim - RS	Isolado	2003	II
EVI-011/03	Suíno	Pinheirinho do Vale - RS	Isolado	2003	II

Limite de Detecção (LD)

A determinação do limite de detecção foi realizada a partir de diluição do controle positivo e contaminação de amostras clínicas. A amostra Padrão Shope foi diluída em base dez e utilizada para contaminar amostras de cérebro de suíno negativas para o SuHV-1. As diluições de 10^{-4} a 10^{-6} , equivalentes às concentrações $10^{0,5}$ TCID₅₀/50 µL, $10^{-0,5}$ TCID₅₀/50 µL, $10^{-1,5}$ TCID₅₀/50 µL foram utilizadas para contaminar sete replicatas biológicas de cada. Cada uma foi extraída independentemente e submetida à PCR.

O LD foi determinado como a diluição em que todas as amostras fossem positivas. A confirmação foi realizada com contaminação nesse mesmo limite e nova extração independente de sete amostras (sete replicatas biológicas). As mesmas foram repetidas em três dias diferentes. A análise permite uma falha, garantindo o resultado com 95% de confiança.

Sensibilidade e Especificidades Clínicas

A PCR foi testada em 25 amostras de cérebro de suínos naturalmente infectados pelo SuHV-1, sendo positivos no isolamento e soroneutralização viral. Estas amostras são provenientes do banco de amostras do laboratório CEDISA (Santa Catarina, Brasil).

A especificidade clínica foi testada a partir de sessenta amostras de cérebro suíno foram colhidas durante o abate de animais provenientes de uma granja sem histórico de DA. Foi realizada uma coleta do sangue dos suínos abatidos. Os mesmos foram submetidos ao teste de soroneutralização segundo OIE (2009).

Repetitividade, Reprodutibilidade e Robustez

A repetitividade, reprodutibilidade e a robustez foram analisadas com número idêntico de amostras. Foram analisadas sete amostras diferentes em triplicata em três dias, administrando-se até uma falha em cada grupo de replicatas. Duas dessas

amostras estão no LD detectado anteriormente. A robustez foi analisada com mudança de enzima, MgCl₂ e tampão (Jumpstart polimerase, Sigma, Estados Unidos). A reprodutibilidade foi analisada quando um segundo indivíduo realizou os mesmos testes.

Restrição enzimática

Os produtos internos da amplificação do gene da glicoproteína E obtidos na *nested*-PCR (317 pb) foram digeridos com a enzima de restrição *BtgI* de acordo com as instruções do fabricante (New England, EUA). Todos os amplicons também foram submetidos à outra reação de restrição com *HphI* (New England, EUA). A amostra padrão Shope foi utilizada como controle positivo para se verificar o corte dos amplicons derivados dos isolados do genótipo I. O DNA digerido foi fracionado por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídeo (0,5µg mL⁻¹) e visualizado sob luz ultravioleta.

Comparação da *nested*-PCR com PCR convencional

A comparação entre a *nested*-PCR e a PCR convencional descrita por Bascuñana et al. (1997) foi realizada a partir de amostras negativas contaminadas com diluições da amostra viral Shope no mesmo processo definido no item Limite de Detecção. A mistura para a reação foi constituída de: 0,375 pmol/µL pmoles de cada iniciador (gBI GAACCTGACGCTGCTGGAGGACCGACCG e gBII-AGGCCCTGGAAGAAGTGGCGATGCATGC), 1,5U de Taq polimerase (GoTaq, Promega, EUA), Tampão GoTaq 5x, MgCl₂ 1,5mmol L⁻¹, 4% de DMSO, DNTP 200µmol L⁻¹, 2µL de DNA. Os ciclos da reação foram os seguintes: desnaturação a 95°C por 5min, 35 ciclos de 95°C por 40s, 59°C por 40s, 72°C por 40s e extensão a 72°C por 5min.

RESULTADOS

A *nested*-PCR descrita teve sensibilidade analítica de $10^{-1,5}$ TCID₅₀ mL⁻¹ correspondente ao menor título detectado

após contaminação. Na comparação com a PCR convencional, a *nested*-PCR foi 100 vezes mais sensível (Tabela 2). Todas as amostras de isolados de SuHV-1 foram amplificadas pela *nested*-PCR, exceto a amostra vacinal Bartha por ser deletada para o gene da glicoproteína E. Não houve

amplificação inespecífica quando foi utilizada amostra do DNA de herpesvírus bovino. Também não houve amplificação para amostras de *S. suis*, agente causador de uma doença neurológica semelhante à PR.

Tabela 2 - Comparação da sensibilidade analítica da *nested*-PCR e PCR convencional para SuHV-1

Concentração (TCID _{50/mL})	Número de repetições	Número de amostras positivas	
		<i>Nested</i> PCR gE	PCR gB*
10 ^{4,3}	10	10	10
10 ^{3,3}	10	10	10
10 ^{2,3}	10	10	10
10 ^{1,3}	10	10	10
10 ^{0,3}	10	10	8
10 ^{-1,3}	10	10	2
10 ^{-2,3}	10	3	0

* PCR descrita por BASCUNANA et al., 1997.

O teste de verificação da sensibilidade e especificidades clínicas da *nested*-PCR teve resultados compatíveis com os obtidos no isolamento viral e a soroneutralização viral em amostras clínicas com um valor de Kappa igual a 1,0, nível de confiança de 95% (Tabela 3), significando concordância de 100% entre os testes. Todas as amostras clínicas positivas pela *nested*-PCR foram identificadas como pertencentes ao genótipo II. Não houve amplificação do fragmento de gE ou a formação de bandas inespecíficas nas 50 amostras negativas testadas.

Os resultados de repetitividade de robustez demonstraram que a *nested* PCR não está sujeita a grandes variações. Mesmo realizada em dias diferentes, com outros

reagentes ou por outros técnicos, os resultados foram semelhantes amplificando todas as amostras e repetições.

Polimorfismos de nucleotídeo único foram detectados nos genótipos I e II. A enzima *BtgI*, selecionada na análise computacional das sequências, teve sua eficiência confirmada nos testes de laboratório com duas bandas formadas para o genótipo I (uma banda com 217pb e outra com 100pb) e apenas uma banda de 317pb para o genótipo II. A enzima *HphI* clivou os produtos da *nested*-PCR de ambos os genótipos em fragmentos de 54, 129 e 134pb. O fragmento menor não foi detectado no gel e os dois últimos apareceram como apenas um devido à semelhança nos tamanhos (Figura 1).

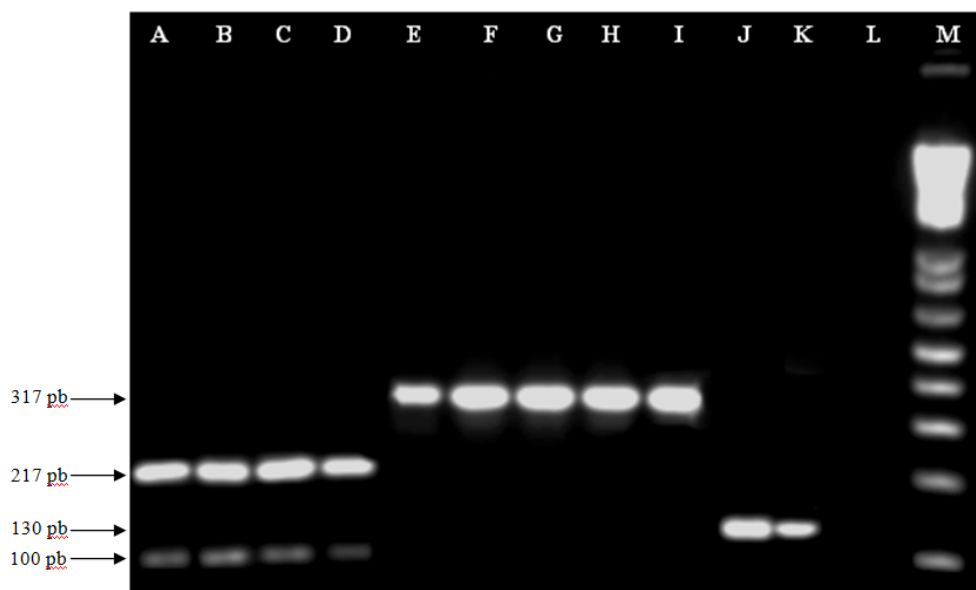


Figura 1 – Padrões de fragmentos de restrição dos genótipos de SuHV-1. O genótipo I é clivado em dois fragmentos (100 e 217pb) pela enzima *Btgl*. O genótipo II não é clivado por *Btgl*. Canaletas: A – Shope (controle positivo); B- Piau; C – 3303; D – 936, representando genótipo I; E – 3293; F – 3288; G – EVI192/03; H – 3319; I – 3338, representando genótipo II; J – Shope; K – 3293, clivados com *HphI*, L – Controle negativo; M - Marcador de tamanho molecular com intervalo de 100pb.

DISCUSSÃO

A rápida detecção e a caracterização de agentes infecciosos são essenciais para os programas de defesa sanitária animal. Uma doença como a DA, listada pela OIE, pode causar grandes impactos nas granjas acometidas assim como gerar barreiras sanitárias relevantes para a suinocultura. O tempo gasto para realização do teste descrito nesse trabalho foi de no máximo dois dias, bem inferior aos métodos descritos anteriormente que podiam levar até sete dias entre o isolamento viral e a eletroforese (Piatti et al., 2001; Schaeffer et al., 2006). A enzima selecionada clivou seletivamente o polimorfismo encontrado nas análises de bioinformática, permitindo diferenciar os genótipos virais I e II com precisão. A *nested*-PCR foi cem vezes mais sensível do que uma PCR convencional descrita na literatura (Bascuñana et al. (1997).

A caracterização genotípica do SuHV-1 por análise de restrição enzimática foi utilizada por vários autores em estudos epidemiológicos sendo o método baseado na restrição do genoma completo do SuHV-1 com *BamHI* com variações no método de purificação do DNA viral o mais utilizado (Christensen, 1987; Christensen, 1988; Nishimori et al., 1987, Yamada et al., 1992; Christensen, 1995; Piatti et al., 2001; Silva et al., 2005; Schaefer et al., 2006). Isolados de campo foram identificados por esse mesmo método como derivados de amostras vacinais na Polônia e Hungria (Christensen et al., 1992). Isolados britânicos foram discriminados por amplificação de um fragmento longo do gene da glicoproteína D e posterior digestão por *BamHI* (Banks, 1993). Em outro estudo, um algoritmo quantitativo foi desenvolvido para estimar a similaridade de isolados e amostras vacinais a partir das bandas geradas no gel após restrição enzimática do DNA viral (Weigel e Scherba, 1997). Os métodos de seqüenciamento possuem

custo relativamente alto quando comparado a digestão enzimática, além de serem tecnicamente mais elaborados. Além disso, no caso de vírus muito conservados como os herpesvírus, podem não oferecer mais do que dois grandes grupos em suas árvores filogenéticas se as amostras forem muito próximas (Goldberg et al., 2003). A combinação da *nested*-PCR com a restrição enzimática é mais vantajosa por ser mais rápida, apresentar menor custo, ser simples e ainda poder ser utilizada em qualquer laboratório com o mínimo de equipamentos de biologia molecular.

Outras PCRs descritas na literatura, porém não comparadas com as amostras desse trabalho, têm relatos de sensibilidade por volta de $10^{1.5}$ TCDI₅₀ mL⁻¹ (Lee et al., 2007; Pérez e Arce, 2009), o que é cem vezes menos sensível do que quando a reação é feita pela metodologia com a etapa de *nested* padronizada nesse trabalho. Adicionalmente outra *nested*-PCR também baseada em gE obteve acurácia de apenas 57,5% em cérebros de suínos (Yoon, 2005). Os resultados de sensibilidade obtidos por esses autores são diferentes quando comparados aos deste trabalho provavelmente devido à região de amplificação da PCR, reagentes utilizados ou método de extração, características que comumente alteram o desempenho da PCR (Espy et al., 2006).

A *nested*-PCR descrita nesse trabalho demonstrou ser confiável para o diagnóstico da DA podendo ser utilizada como padrão na detecção do SuHV-1. A técnica também pode ser útil como método auxiliar em programas de erradicação em que animais reativos em um método de triagem como o ELISA gB e negativos no ELISA de diferenciação de animais vacinados precisam ser confirmados por técnicas moleculares (Bascunãna et al., 1997).

O método usual de genotipagem do SuHV-1 pode demorar até sete dias já que o isolamento viral é requerido. Além da alta sensibilidade, detectando até $10^{-1.3}$ TCID₅₀ mL⁻¹ de vírus nas amostras clínicas, o teste descrito foi relativamente mais rápido, com resultados em dois dias. O desenvolvimento desta metodologia para diferenciação do SuHV-1 é muito relevante para estudos epidemiológicos, podendo deste modo identificar os fluxos de infecção nos rebanhos brasileiros nos últimos surtos relatados bem como estabelecer estratégias de prevenção de novos focos da doença.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos à FAPEMIG e LANAGRO/MG-MAPA pelo suporte financeiro ao trabalho, EMBRAPA Suínos e Aves, CEDISA, IPVDF pelo fornecimento das amostras clínicas.

Capítulo 3: PCR EM TEMPO REAL PARA DETECÇÃO DO VÍRUS DA DOENÇA DE AUJESZKY

Fonseca Jr., A. A.¹, Carmagos, M. F.¹, D'Ambros, R. M.², Heinemann, M. B.³, Leite, R. C.³, Reis, J. K. P.³

¹ Laboratório Nacional Agropecuário, MAPA, Pedro Leopoldo-MG, Brazil;

² Centro de Diagnóstico em Sanidade Animal, Concórdia-SC, Brazil ;

³ Laboratório de Retrovírus - Escola de Veterinária da UFMG, Belo Horizonte-MG, Brazil

RESUMO

A Doença de Aujeszky é uma enfermidade viral de grande impacto na suinocultura. O objetivo deste trabalho foi validar uma PCR em tempo real (qPCR) de baixo custo para o diagnóstico rápido e sensível da Doença de Aujeszky. Para tanto utilizamos o reagente Eva Green, um agente intercalante do DNA e uma das químicas mais baratas para utilização em qPCR. Os iniciadores amplificaram um fragmento de 123 pares de base do gene codificante da glicoproteína D. A qPCR foi testada em 25 amostras de cérebro de suíno positivos para DA no isolamento viral e soroneutralização. Além disso, foram testadas 60 amostras de cérebro suíno, 12 de tonsilas, 7 de bulbo olfatório e 5 amostras de rim colhidas durante o abate de animais provenientes de uma granja sem histórico de DA. O soro desses animais também foi coletado e submetido à soroneutralização. A sensibilidade analítica foi calculada com acréscimo de um isolado brasileiro do SuHV-1 titulado em amostras de cérebro de suíno negativas na soroneutralização e na PCR. A técnica apresentou uma sensibilidade analítica de $10^{0,3}$ TCID₅₀/mL. A qPCR foi capaz de distinguir reações inespecíficas, evitando assim os falsos positivos e foi 10 vezes mais sensível do que a PCR convencional, além de obter resultados mais rápidos.

Palavras-chave: qPCR, Validação, Doença de Aujeszky

INTRODUÇÃO

A Doença de Aujeszky (DA) ou pseudorraiva é uma enfermidade de grande

importância na suinocultura. O agente etiológico é o herpesvírus suíno tipo 1 (SuHV-1 ou PrV) pertencente à subfamília *Alphaherpesvirinae*, um grupo de vírus conhecido pela sua rapidez na replicação, efeito citopático e espectro amplo de hospedeiros (Pomeranz et al., 2005). Espécies como cães, gatos e bovinos também são suscetíveis à infecção e apresentam uma encefalite de curso agudo fatal (Sobestiansky et al. 1999).

O vírus replica-se principalmente em suídeos, causando sinais neurológicos e alta letalidade em animais com menos de cinco semanas de idade. O índice de mortalidade cai em animais mais velhos, que tendem a apresentar sinais respiratórios. Todo animal sobrevivente à infecção pelo SuHV-1 será portador do vírus em sua forma latente pelo restante de sua vida (Kluge et al., 1999). A latência geralmente ocorre no gânglio trigêmeo ou bulbo olfatório dos suínos. O vírus não pode ser isolado nesse estado, no entanto seu genoma permanecerá em forma nucleossomal (Pomeranz et al., 2005). A replicação do vírus é reativada após imunossupressão induzida por estresse ou por drogas (Maes et al., 1997).

Focos da DA já foram registrados nos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Estudos realizados entre 1982 e 1986 em São Paulo relataram a existência de 66 focos da DA, com soroprevalência de 2,6% (Cunha et al., 1998). Santa Catarina registra a ocorrência da enfermidade desde 1983 com um aumento gradativo das granjas afetadas até o início do século XXI, quando se notou

uma diminuição no número de relatos devido ao programa de erradicação implantado no estado (Groff et al., 2003). A enfermidade teve um impacto anual de quase um milhão de reais nesse mesmo estado (Zanella, 2001).

A Instrução Normativa nº 8 de três de abril de 2007 (Brasil, 2007) prevê a necessidade de cada estado brasileiro criar um plano estadual de combate à DA de acordo com a regulamentação prevista no Plano de Contingência. Prevê-se o diagnóstico por ELISA (triagem ou para gE em caso de vacinação) e teste de neutralização viral. As técnicas de PCR e isolamento viral poderão ser utilizadas como confirmatórias. A vacinação é prevista apenas para propriedades com diagnóstico laboratorial positivo para a DA.

As atuais metodologias de diagnóstico como, por exemplo, o isolamento e a neutralização viral, são específicas e muito utilizadas nos laboratórios, mas contam com determinados problemas que podem comprometer a velocidade das análises ou mesmo os resultados. O isolamento e a neutralização viral têm a desvantagem de necessitar de cultivos celulares, o que as torna mais trabalhosas (OIE, 2009). Esses dois métodos ainda necessitam de utilização do próprio vírus, o que pode dificultar seu uso à medida que o programa de erradicação avance e restrições sejam indicadas para a manipulação do SuHV-1.

Testes baseados na detecção de anticorpos, como ELISA e soroneutralização, dependem da soroconversão do animal. O diagnóstico sorológico realizado durante a fase aguda da doença pode levar a resultados negativos, por serem necessários pelo menos 10 dias, em média, para a detecção dos anticorpos específicos (JACOBS et al., 1996; KINKER et al., 1997). Existe o risco de animais mais jovens morrerem antes da soroconversão, pois são mais suscetíveis aos sinais neurológicos, o que inviabilizaria o diagnóstico sorológico (KINKER et al., 1997). O problema não se resume somente à fase aguda da infecção, pois animais em estado de latência podem apresentar

decaimento do nível de anticorpos, acarretando resultados falso-negativos (McCaw et al., 1997).

As técnicas de PCR têm grande valia no diagnóstico, inclusive quando se trata de avaliação de animais em inquéritos (Yoon, et al., 2005, Yoon et al., 2006). No programa de erradicação da DA na Suécia, encontrou-se uma série de animais aparentemente não-infectados denominados indivíduos de reação única, que apresentaram resultados positivos para o ELISA para gB e quase sempre negativos para gE (Bascunãna et al., 1997). Através da técnica de PCR detectou-se o DNA viral nesses animais. No programa de erradicação dos Estados Unidos, o isolamento viral foi sendo gradualmente substituído pela PCR como método de diagnóstico (USDA, 2008).

A validação de uma metodologia de diagnóstico baseada em PCR em tempo real (qPCR) implicará em benefícios na velocidade e qualidade do diagnóstico da DA. Além das vantagens da PCR convencional, existem outras qualidades inerentes a técnica de qPCR. As principais vantagens são a rapidez do diagnóstico, a elevada sensibilidade analítica e diagnóstica e o risco mínimo de contaminação por não exigir a manipulação dos amplicons (Yeh et al., 2009). Outro ponto significativo é amplificação do DNA do agente e visualização do resultado sem a necessidade de utilização de eletroforese em gel de agarose como ocorre nas PCRs convencionais.

O objetivo do trabalho foi padronizar uma PCR em tempo real (qPCR) para diagnóstico da DA.

MATERIAL E MÉTODOS

Desenho dos Iniciadores

O gene codificante para a glicoproteína D (gD) foi escolhido como alvo para a qPCR por ser altamente conservado no SuHV-1, mas permitindo diferenciá-lo de outros herpesvírus, diminuindo deste modo a probabilidade de ampliações cruzadas.

Para definição da região de amplificação fez-se o alinhamento de seqüências do gene D de SuHV-1, herpesvírus bovino 1, herpesvírus bovino 5, herpesvírus eqüino 1 disponíveis no GenBank no programa Bioedit (Hall, 1999). Após verificação das regiões mais conservadas em SuHV-1, o fragmento foi submetido à análise no programa Primer3 para desenho dos iniciadores (Rozen and Skaletsky, 1998). A lista de iniciadores sugeridos pelo programa foi submetida ao programa computacional PrimerBlast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) para análise *in silico* da especificidade. A qualidade dos iniciadores foi analisada pelo NetPrimer (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer>).

Os iniciadores selecionados foram gD-F (GGTCCCCTCGCCCTTCGTC) e gD-R (GCCACCGCCTCGTTTCAGC) (IDT, Estados Unidos) e produziram um fragmento de 123 pares de base.

Os mesmos programas foram utilizados para desenhar e avaliar iniciadores para o gene de GAPDH de suíno. Os iniciadores selecionados foram *S.scrofa*-Green-GAPDH-F (TCCCTGCTTCTACCGCT) e *S.scrofa*-Green-GAPDH-R (ACACGTTGGGGGTGGGGACA) (IDT, Estados Unidos) e produziram um fragmento de 100 pares de base. O objetivo dessa segunda reação foi determinar a presença de inibidores ou falha na extração do DNA. Qualquer reação negativa para GAPDH invalidaria os resultados das reações de diagnóstico de SuHV-1.

Amostras

A amostra padrão Shope, com título viral de $10^{4,5}$ TCID₅₀/50 µL foi utilizada na padronização da reação. Ainda foram utilizadas 25 amostras de cérebro de suínos naturalmente infectados pelo SuHV-1, sendo positivos no isolamento e soroneutralização viral. Estas amostras são provenientes do banco de amostras do laboratório CEDISA.

Sessenta amostras de cérebro suíno foram colhidas durante o abate de animais provenientes de uma granja sem histórico

de DA. Foi realizada uma coleta do sangue dos suínos abatidos. Os mesmos foram submetidos ao teste de soroneutralização segundo OIE (2009).

O DNA de todas as amostras foi extraído pelo Kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega, Estados Unidos) segundo recomendações do fabricante e armazenado a -20°C.

Validação da Reação

Os parâmetros para a validação utilizados na metodologia a seguir foram realizados segundo parâmetros descritos no *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2009* (OIE, 2009) e por Espy et al. (2006).

Padronização da Reação

O termociclador Rotorgene 3000 (Corbett, Austrália) foi utilizado em todos os testes. A reação para detecção do SuHV-1 (qPCR-gD) foi padronizada inicialmente com DNA extraído da amostra Shope.

A determinação da eficiência foi realizada por curva padrão com amplificação de produtos purificados das PCRs. Os amplicons foram purificados com o kit *PCR reaction clean-up* (Invitrogen, EUA) e as concentrações estimadas em espectrofotômetro de luz ultra-violeta (Nanovue®, GE Healthcare, EUA). O número de cópias foi estimado de acordo com fórmula definida Staroscik (2004). Após o cálculo do número de cópias, uma série de curvas-padrão foi feita para determinação da melhor concentração de iniciadores definindo-se como R² mínimo 0,99, eficiência mínima 0,90 e eficiência máxima 1,10. Todos os resultados foram confirmados pela análise dos picos de dissociação dos amplicons (PD).

Especificidade Analítica

A amostra padrão Shope, cinco amostras do genótipo I e 14 amostras do genótipo II do SuHV-1 isoladas no Brasil em Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina, e Rio

Grande do Sul, previamente caracterizadas por Fonseca Jr. et al. (2009), mais amostras de herpesvírus bovino 1 (BoHV-1), herpesvírus bovino 5 (BoHV-5) e *Streptococcus suis* foram utilizadas para análise da especificidade analítica.

Sensibilidade Analítica

A sensibilidade analítica da qPCR-gD foi calculada a partir do número de cópias do DNA viral. Após a determinação da melhor concentração dos iniciadores e demais reagentes da reação, os amplicons purificados foram diluídos em série na base 10. A curva padrão foi feita a partir de triplicatas de cada diluição em três dias consecutivos.

Limite de Detecção (LD) e Repetitividade

A determinação do limite de detecção foi realizada a partir de diluição do controle positivo e contaminação de amostras clínicas. A amostra Padrão Shope foi diluída em base dez e utilizada para contaminar amostras de cérebro de suíno negativas para o SuHV-1. As diluições de 10^{-4} a 10^{-6} , equivalentes às concentrações $10^{0,5}$ TCID₅₀/mL, $10^{-0,5}$ TCID₅₀/mL, $10^{-1,5}$ TCID₅₀/mL foram utilizadas para contaminar sete replicatas biológicas de cada. Cada uma foi extraída independentemente e submetida à PCR.

O LD foi determinado como a diluição em que todas as amostras fossem positivas. A confirmação foi realizada com contaminação nesse mesmo limite e nova extração independente de sete amostras (sete replicatas biológicas). As mesmas foram repetidas em três dias diferentes. A análise permite uma falha, garantindo o resultado com 95% de confiança.

Repetitividade, Reprodutibilidade e Robustez

A repetitividade (REP), reprodutibilidade (RPO) e a robustez (ROB) foram analisadas com número idêntico de amostras. Foram analisadas sete amostras diferentes em triplicata em três dias, admitindo-se até uma

falha em cada grupo de replicatas. Duas dessas amostras estão no LD detectado anteriormente. A reprodutibilidade foi analisada quando um segundo indivíduo realizou os mesmos testes.

A robustez foi analisada com três mixes diferentes no equipamento ABI7500 (Applied Biosystems, Estados Unidos), sendo o primeiro desse grupo de reagentes o descrito anteriormente nesse trabalho (sendo o teste denominado ROB1) e dois outros adquiridos prontos. Os kits previamente prontos foram Sybr Green Master Mix, teste denominado ROB2, (Invitrogen, Estados Unidos) e Eva Green Master Mix, teste denominado ROB3, (Biotium, Estados Unidos).

RESULTADOS

Padronização da qPCR

As melhores concentrações para a qPCR-gD foram definidas como: 0,375 pmoles/ μ L de cada iniciador (IDT, EUA), 1,5 U GoTaq (Promega, EUA), 20% tampão GoTaq incolor 5x, 1,9 mmol/L MgCl₂, 1 μ L de Eva Green 20x, 8% DMSO, 200 μ mol/L DNTP, para um volume final de 20 μ L. As melhores condições para a qPCR-GAPDH foram: 0,25 pmoles/ μ L de cada iniciador (IDT, EUA), 1,5 U GoTaq (Promega, EUA), 20% tampão GoTaq incolor 5x, 1,9 mmol/L MgCl₂, 1 μ L de Eva Green 20x, 200 μ mol/L DNTP, para um volume de 20 μ L.

As etapas no termociclador para as duas reações foram determinadas como 95°C por 5 min para desnaturação, seguido por 40 ciclos a 95°C por 25 seg., 58°C por 25 seg. e 72°C por 20 seg. com leituras no ciclo de extensão. A curva de dissociação foi realizada com os seguintes parâmetros: 30 s a 80°C e 3 s por grau até 99°C. Os pontos de corte da qPCR-gD foram 0,5 dF/dT e temperatura de 92,5°C e da qPCR-GAPDH foram 0,5 dF/dT e temperatura de 93,2°C (Figura 1). Houve a formação de pequenos picos em temperatura inferior à temperatura limite no tubo sem DNA molde devido à formação de dímeros de iniciadores. A alteração nas concentrações dos iniciadores

não alterou significativamente a formação de dímeros.

Especificidade Analítica

Todas as amostras de SuHV-1 foram amplificadas com picos de desnaturação semelhantes ao da amostra padrão Shope. As amostras de BoHV-1, BoHV-5 e *S. suis* não apresentaram ampliações.

Sensibilidade Analítica

A qPCR foi capaz de detectar até 18,8 cópias/ μL , com R^2 0,99 e eficiência 0,97 (Tabela 1). A curva padrão para qPCR-GAPDH apresentou R^2 0,99 e eficiência 0,99. Quanto mais próximo de 1 o valor de eficiência, melhor a performance da qPCR, indicando que os produtos gerados praticamente dobram a cada ciclo.

Tabela 1: Valores médios de Ct e desvios-padrão da qPCR.

Cópias/ μL	Ct Médio	Desvio
$1,88 \times 10^6$	20,03	0,02
$1,88 \times 10^5$	23,11	0,81
$1,88 \times 10^4$	27,09	0,61
$1,88 \times 10^3$	30,5	0,33
$1,88 \times 10^2$	34,09	0,59
$1,88 \times 10^1$	36,45	0,25

Tabela 2: Desvio Padrão dos Cts e Picos de Desnaturação na Confirmação do LD

Dia	Ct		Pico de Desnaturação	
	Média	Σ	Média	σ
1	37,83	1,46	92,6	0,45
2	37,43	1,85	92,7	0,60
3	36,28	0,85	92,93	0,23

Repetitividade, Reprodutibilidade e Robustez

Os testes de REP e RPO demonstraram que o método não está sujeito a grandes variações ao ser realizado no mesmo dia ou em dias diferentes, entretanto o mesmo não se pode dizer quando a metodologia é testada com diferentes reagentes ou equipamentos.

Limite de Detecção

O LD foi confirmado com $10^{-0,5}$ TCID₅₀/mL. Todas as repetições nesse limite foram positivas nas sete amostras testadas nos três dias diferentes. O teste com amostras acrescidas com o vírus titulado demonstrou que a matriz (tecido animal) pode influenciar na eficiência da reação, como pode ser notado pelos valores de desvio padrão encontrados. Na análise da curva de desnaturação, picos com temperatura similar ao do controle positivo, mas com dF/dT inferior a 0,5 foram desconsiderados. Amostras com Ct entre 36 e 38 foram consideradas suspeitas e seu resultado confirmado pela curva de desnaturação e por nested PCR realizada conforme Fonseca Jr. et al. (2010). O desvio padrão (σ) dos picos de dissociação (PD) inclui as amostras utilizadas como controle positivo (Tabela 2).

Os desvios para os Cts foram altos indicando que o limite de quantificação seria maior, no entanto, como a técnica é puramente qualitativa, os resultados são demonstrados aqui apenas para a análise das variações a que a PCR se sujeita quando há pequenas concentrações de DNA viral em relação ao DNA da matriz.

Os resultados de ROB1 demonstraram que a utilização dos mesmos reagentes em um sistema de detecção diferente podem alterar o LD da metodologia. O primeiro fator notado foi a grande diferença entre os PDs esperados. Os maiores ocorreram no equipamento Rotorgene 3000, enquanto cada mix apresentou um PD médio diferente (Tabela 3).

O limiar ou ponto de corte foi calculado automaticamente pelo ABI7500, variando discretamente entre os dias de análise. Todas as amostras amplificaram em triplicata em todas as repetições, com exceção daquelas no LD. Nesse último caso, o menor número de repetições

positivas foi em ROB1, com uma replicata positiva por amostra. Houve falha de pelo menos uma amplificação em ROB2 e ROB3 quando as amostras no LD foram testadas. Além disso, os PDs não foram detectados nessas ocasiões, fator primordial para considerar a reação positiva.

Tabela 3: Desvio Padrão dos Cts e PD nos testes de REP, RPO, ROB

Amostra	Rotorgene 3000				ABI7500					
	REP		RPO		ROB1		ROB2		ROB3	
	\bar{X}	σ	\bar{X}	σ	\bar{X}	σ	\bar{X}	σ	\bar{X}	σ
1	21,66	0,21	22,40	0,14	25,64	0,20	20,58	0,33	19,16	0,58
2	20,44	0,40	21,44	0,34	24,15	0,46	19,79	0,34	17,92	0,53
3	22,67	0,42	22,60	0,09	27,65	0,47	21,50	0,45	20,71	0,62
4	19,55	0,17	20,10	0,15	23,04	0,96	18,48	0,46	16,67	0,54
5	35,22	0,22	36,10	0,35	-	-	33,89	0,32	33,39	0,56
6	35,86	0,19	36,32	1,63	-	-	35,67	0,99	34,16	0,94
7	18,27	0,17	17,10	0,19	21,12	0,09	17,59	1,19	15,50	0,51
PD	93,07	0,13	92,44	0,44	89,6	0,0	88,54	0,25	86,61	0,15

Detecção do SuHV-1 em Amostras Clínicas

As 25 amostras clínicas positivas testadas obtiveram picos semelhantes à amostra padrão Shope utilizada como controle positivo. As 60 amostras clínicas de cérebro de suínos negativas foram negativas também na qPCR. Seis amostras negativas apresentaram picos na curva de

desnaturação com dF/dT superior a 0,5, porém com temperaturas inferiores à temperatura de corte. Essas amostras foram consideradas negativas (Figura 2). A temperatura de desnaturação média das amplificações específicas foi de 93,66°C (desvio padrão 0,345, variância 0,119). Os Cts encontrados foram diferentes para cada amostra (Tabela 3).

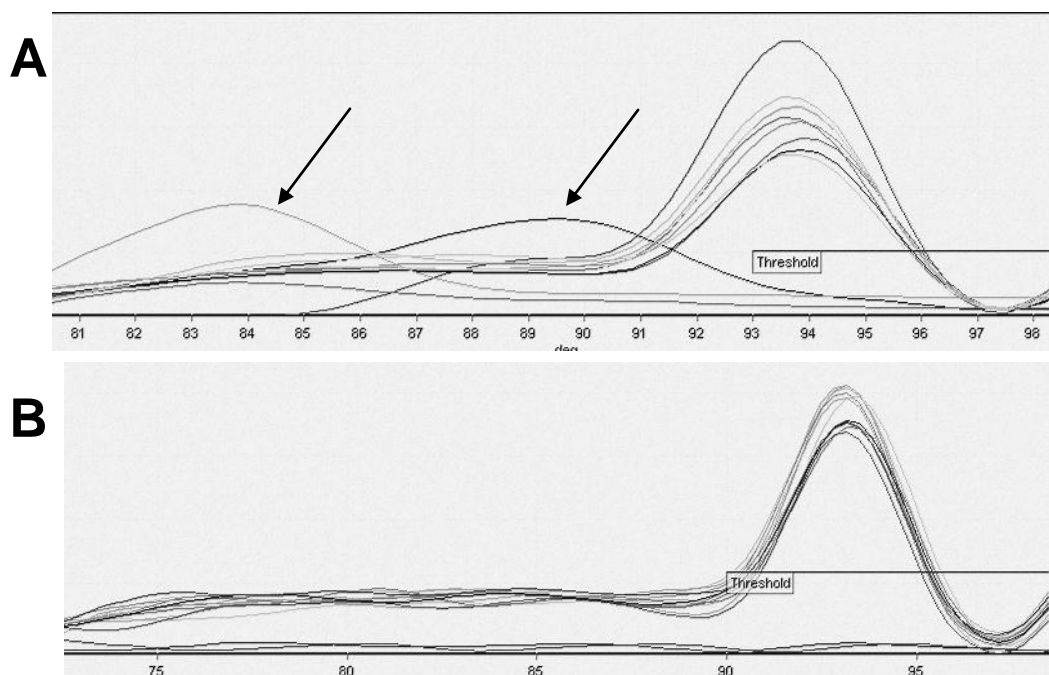


Figura 1: Curva de desnaturação (dF/dT versus Temperatura) das amostras positivas e negativas utilizadas no teste de detecção do SuHV-1 em amostras clínicas. A – Curva para qPCR-gD. As setas indicam amostras negativas com picos inespecíficos devido a dímeros de iniciadores ou reações inespecíficas. B – Curva de desnaturação para qPCR-GAPDH. As linhas negras indicam os limiares (threshold) de dF/dT e de temperatura.

Tabela 4: Valores de Ct para as amostras clínicas positivas

Intervalo de Ct	Número de Amostras
14,4 a 16,13	4
18,33 a 19,89	6
20,53 a 22,87	8
23,85 a 26,96	3
29,15 a 29,97	2
33,31	1
36,41	1

DISCUSSÃO

A OIE dispõe de diversas metodologias de PCR para várias enfermidades de importância veterinária. O uso de técnicas moleculares no diagnóstico de doenças provocadas por vírus animais tem uma grande gama de variação nos tipos de

reações, variando desde PCR convencionais a multiplex e tempo real tanto para detecção de agentes patogênicos como para genotipagem (OIE, 2009). A metodologia desenvolvida nesse trabalho permitiu uma identificação mais rápida e sensível do SuHV-1, sendo a primeira descrita na literatura consultada com todos os procedimentos de validação necessários. Outros trabalhos para detecção molecular descrevem PCRs para diagnóstico sem mencionar testes de limite de detecção, repetibilidade, reprodutibilidade ou robustez.

A qPCR está sendo cada vez mais utilizada na detecção de agentes infecciosos como vírus e bactérias (Gunson et al., 2006, Ratcliff et al., 2007). Os métodos e reagentes utilizados têm variação tanto em termos de tecnologia biomolecular quanto ao custo. Destes, os mais baratos e

versáteis são os da categoria de fluoróforos intercalantes do DNA como SYBR Green e Eva Green. Eles possuem como vantagem, além do preço acessível, o fato de poderem ser utilizados com quaisquer iniciadores, enquanto sondas tipo Taqman, FRET ou iniciadores Scorpion precisam ser desenhados com um conjunto de iniciadores específicos. Como desvantagem tende a ser menos específicos e sensíveis (Yeh et al., 2009).

Os resultados encontrados neste trabalho permitiram identificar uma técnica confiável no diagnóstico molecular da DA. A qPCR-GAPDH amplificou para todas as amostras testadas, demonstrando-se útil como controle da amostra de DNA. A qPCR-gD foi dez vezes mais sensível do que a PCR convencional. Os testes de REP e RPO demonstraram que a qPCR-gD não está sujeita a grandes variações em curtos intervalos de tempo. O mesmo não se pode dizer quando os dados de ROB são analisados. Houve uma grande variação nos Cts quando diferentes kits ou mesmo o mix padronizado nesse trabalho foram utilizados em outro equipamento. O mix EVA Green apresentou os menores Ct, porém isso não foi um diferencial maior quando comparado com o mix SYBR Green. Ambos apresentaram os mesmos PDs e falharam na amplificação de uma das replicatas das amostras no LD a cada dia de repetição. Essas amostras com falhas apresentaram Ct relacionados mais com os dímeros de iniciadores do que com amplificação da amostra propriamente dita. Como o resultado final desse trabalho foi analisado com prioridade na curva de dissociação, a replicatas foram consideradas negativas devido a ausência do PD específico. É bem provável que as falhas estejam relacionadas com o sistema de detecção e com a técnica para se gerar a curva de dissociação. O sistema do ABI7500 utiliza placas o que gera grandes modificações na termociclagem e na uma curva de dissociação mais demorada, o que pode explicar as diferenças na detecção final do PD.

As temperaturas com os picos específicos de dissociação foram diferentes de acordo

com o equipamento e reagentes utilizados. É bastante provável que essas discrepâncias ocorreram principalmente devido às concentrações iônicas peculiares de cada reação, principalmente nos tampões, específicos de cada fabricante. Esse fato já foi relatado quando a influência da concentração de sais e outros íons foi analisada na dissociação de ácidos nucleicos (Arora et al., 2008).

A qPCR-gD foi menos sensível do que a nested PCR descrita por Fonseca Jr. et al. (2010), no entanto ainda apresenta vantagens por ser menos trabalhosa tanto no tempo de execução quanto por diminuir a possibilidade de contaminação (situação bastante preocupante nas nested PCRs). Ambos as metodologias detectaram todas as amostras clínicas testadas e as amostras com alto Ct, consideradas suspeitas, foram confirmadas pela nested PCR. Esses dois fatores indicam que as técnicas podem ser usadas em conjunto.

Um dos principais problemas encontrados na qPCR com agentes intercalantes é a fluorescência gerada por dímeros de iniciadores (Ponchel et al., 2003). A presença de dímeros gera aumento da fluorescência devido à formação de pequenos fragmentos de DNA em fita dupla com alta afinidade aos reagentes como o SYBR Green e EVA Green. Essa ocorrência é difícil de ser inibida mesmo com a utilização de enzimas do tipo *hotstart* (Peters et al., 2004). Os dímeros de iniciadores apresentaram Ct sempre maior do que 35 e valores menores do que 90°C na curva de desnaturação. Esses resultados os tornam facilmente distinguíveis de reações positivas para SuHV-1 que tenderam a apresentar Cts menores do que 35 e temperatura de desnaturação maior do que 93°C.

Em relação à especificidade analítica, a qPCR detectou amostras de SuHV-1 isolados em diferentes estados brasileiros, demonstrando que os *primers* reconhecem diferentes estirpes já isoladas no país. As amostras brasileiras testadas neste trabalho foram previamente caracterizadas em dois grupos principais, um com elevada

semelhança a vírus circulantes ou que já circularam em outros países e outro grupo mais distante (Fonseca Jr. et al., 2009). A qPCR-gD foi capaz de amplificar o DNA de todas essas estirpes virais. Os iniciadores desenhados foram específicos para o agente etiológico da DA já que outros agentes filogeneticamente relacionados (BoHV-1) ou causadores de sinais clínicos semelhantes (*S. suis*) não geraram amplificação. O fato de a qPCR discriminar o SuHV-1 do BoHV-5, ambos causadores de encefalite em bovinos (Rissi et al., 2006), indica a possibilidade do uso da mesma para diagnóstico diferencial da raiva. A especificidade para o vírus da raiva não foi testada neste trabalho, mas não se espera amplificação deste vírus na reação, pois seu genoma RNA precisaria ser submetido a uma reação de transcrição reversa antes de ser submetido à PCR (Nadin et al., 2009).

A qPCR foi testada em diferentes tecidos de suínos. Apenas seis amostras clínicas testadas apresentaram ampliações inespecíficas. Esses resultados ocorreram apenas em tecido cerebral, mas provavelmente não se devem a alguma peculiaridade desta matriz, mas sim ao elevado número de amostras de cérebro de suíno em comparação às outras. Todas as amostras de cérebro positivas para o isolamento viral amplificaram na qPCR.

Outros trabalhos indicam o gânglio trigêmeo e o bulbo olfatório como matriz para detecção do DNA de SuHV-1 (Bascuñana et al., 1997; Huang et al., 2004), porém essas amostras são de coleta mais difícil devido ao tamanho e localização no encéfalo. Os resultados indicam que cortes do encéfalo de suínos podem ser utilizados eficientemente para detecção do SuHV-1.

As variações na detecção da fluorescência e da temperatura de desnaturação detectadas em algumas amostras e repetições podem estar relacionadas tanto com variações intrínsecas da reação como a quantidade de DNA e outros interferentes relacionados com fatores do instrumento.

Este trabalho descreveu uma qPCR para diagnóstico de DA com diversas vantagens sobre métodos clássicos como por exemplo menor tempo de execução, diminuição dos riscos de contaminação das amostras com amplicons e a não utilização de reagentes cancerígenos como brometo de etídeo para observação dos resultados.

Agradecimentos

Esse projeto teve financiamento do INCT-Pecuária, CNPq e LANAGRO/MG - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Capítulo 4: PCR MULTIPLEX PARA DETECÇÃO DO HERPESVÍRUS SUÍNO 1, HERPESVÍRUS BOVINO 1, HERPESVÍRUS BOVINO 5 E HERPESVÍRUS OVINO 2

Fonseca Jr.¹, A. A., Costa, E. A.², Sales, E. B.¹, Sales, M. L.¹, Leite, R. C.², Heneimann, M. B.², Reis, J. K. P.²

¹ Laboratório de Biologia Molecular, LANAGRO/MG, Pedro Leopoldo, Brasil

² Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil

Publicado como:

Fonseca Jr., A. A., Costa, E. A., Sales, E. B., Sales, M. L., Leite, R. C., Heneimann, M. B., Reis, J. K. P. PCR Multiplex para Detecção dos Principais Herpesvírus Neurológicos de Ruminantes. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 63, p. 1405-1413, 2011

RESUMO

As enfermidades do sistema nervoso central de bovinos podem ser causadas por diversos agentes, dentre eles os herpesvírus suíno 1 (SuHV-1), herpesvírus bovino 1 (BoHV-1), herpesvírus bovino 5 (BoHV-5) e herpesvírus ovino 2 (OvHV-2). O objetivo desse trabalho foi padronizar uma PCR multiplex (mPCR) para diagnóstico diferencial de encefalite bovina causada por esses quatro herpesvírus. Os iniciadores foram desenhados após alinhamento de sequências disponíveis no GenBank e a reação foi padronizada levando-se em consideração a concentração dos reagentes e tipos diferentes de DNA polimerase. Após determinação da especificidade e sensibilidade, 65 amostras de cérebro de bovinos com diagnóstico de encefalite foram submetidas à mPCR. A sensibilidade analítica para detecção de BoHV-1, BoHV-5 e SuHV-1 foi, respectivamente, 101,2 TCID₅₀/50 µL, 101,0 TCID₅₀/50 µL, 101,3 TCID₅₀/50 µL na reação multiplex. Dez amostras foram positivas para BoHV-5, uma para BoHV-1, uma para SuHV-1 e cinco para OvHV-2. A mPCR padronizada nesse trabalho é uma técnica útil para o diagnóstico diferencial de enfermidades relacionadas ao sistema nervoso central de bovinos.

Palavras-chave: PCR, encefalite, herpesvírus

INTRODUÇÃO

A crise causada pela encefalopatia espongiforme bovina (BSE) gerou um grande impacto na saúde animal e na saúde humana. O modo como as encefalopatias bovinas era encarado mudou devido ao risco dessas enfermidades (Bradley e Liberski, 2004). Diversos países passaram a trabalhar com medidas de controle ou prevenção da BSE (OIE, 2009). Uma vez que o diagnóstico para encefalopatia seja negativo para BSE, é importante determinar os outros agentes etiológicos responsáveis pela enfermidade. Entre esses estão um grupo de vírus da família Herpesviridae: o herpesvírus bovino 1 (BoHV-1), herpesvírus bovino 5 (BoHV-5), herpesvírus ovino 2 (OvHV-2) e herpesvírus suídeo 1 (SuHV-1) capazes de causar sinais neurológicos que podem confundir o diagnóstico clínico da enfermidade (Claus et al., 2002).

O BoHV-1 e o BoHV-5 são herpesvírus da sub-família *Alphaherpesvirinae*, gênero *Varicellovírus* (Davison et al., 2009). Esses dois vírus são tão próximos geneticamente que pode ser difícil diferenciá-los tanto por métodos moleculares quanto imunológicos (Thiry et al., 2006). O BoHV-1 é causador da rinotraqueíte infecciosa bovina, vulvovaginite pustular infecciosa e balanopostite, além de mortalidade neonatal devido à infecção sistêmica ou abortos, principalmente quando a infecção ocorre em vacas soronegativas (Muyilkens et al., 2007). Apesar de não ocorrer frequentemente, o

BoHV-1 pode causar danos neurológicos (Brower et al., 2008; Rissi et al., 2008).

O BoHV-5 é agente etiológico da meningoencefalite bovina, uma enfermidade de curso rápido e geralmente fatal. Animais mais novos são mais suscetíveis, enquanto nos bovinos mais velhos a severidade da infecção depende muito da estirpe viral e do hospedeiro (Rissi et al., 2007). As ocorrências de infecção por BoHV-5 são mais comuns na América do Sul do que no restante mundo (Del Médico et al., 2010). Há uma alta prevalência de co-infecções por BoHV-1 e BoHV-5 em bovinos no Brasil (Campos et al., 2009).

O SuHV-1, vírus da subfamília Alphaherpesvirinae, gênero Varicellovírus, é o agente etiológico da pseudorraiva ou doença de Aujeszky (Pomeranz et al., 2005). Os suínos são os principais hospedeiros do SuHV-1, nos quais causa danos neurológicos em animais mais jovens e sinais respiratórios em indivíduos adultos (Zuckermann, 2000). Espécies como cães, gatos e bovinos também são suscetíveis à infecção e apresentam uma encefalite de curso agudo fatal que pode ser confundida com os sinais causados pela infecção com o vírus da raiva, BoHV-5 e OvHV-2 (Callan e Van Metre., 2004).

A febre catarral maligna é uma enfermidade de bovinos e outros ungulados como suínos, bisões e cervos, caracterizada por sinais neurológicos, inapetência, febre e corrimento nasal (Powers et al., 2005). Um dos principais microorganismos associados com a enfermidade é o OvHV-2, principalmente quando ocorre criação concomitante de bovinos e ovinos. A enfermidade já foi diagnosticada na Europa, Oriente Médio, África e América (Russell et al., 2009).

A PCR é um método rápido e sensível já utilizado para diagnóstico de várias enfermidades virais. A utilização de uma metodologia multiplex agiliza o processo de identificação desses agentes infecciosos por realizar o diagnóstico completo com apenas uma reação (Yeh et al., 2009).

Face ao exposto acima, o objetivo deste trabalho é padronizar uma PCR multiplex (mPCR) para diagnóstico diferencial de BSE e raiva.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

A padronização da reação foi realizada com a amostra padrão Shope de SuHV-1 (ATCC VR-135), amostra padrão Colorado-1 de BoHV-1 (ATCC VR-864), isolado EVI88/95 de BoHV-5 (Esteves et al., 2008). Devido à dificuldade de isolar o OvHV-2 (Gailbreath et al., 2008), o DNA extraído do cérebro de uma ovelha naturalmente infectada foi utilizado como controle positivo (Costa et al., 2009).

Extração de DNA

O DNA de todas as amostras derivadas de bovinos e ovinos foi extraído conforme Fonseca Jr. Sambrook et al (1989). Amostras de cérebro de suíno foram submetidas à extração de DNA conforme Fonseca Jr. (2010a).

Desenho dos Iniciadores

Os iniciadores para a mPCR foram desenhados no programa Primer3 Plus (Untergasser et al., 2007). Após o desenho, os primers foram submetidos a análises *in silico* de especificidade e formação de dímeros individualmente, em pares e em conjunto nos programas Blast (Altschul et al., 1990), PrimerBlast e OligoCalc (Kibbe, 2007). Os critérios de seleção foram temperaturas de melting semelhantes, alta especificidade e mínimo número de interações. Três pares de iniciadores (Tab.1) foram selecionados, sendo que o iniciador BoHV-191 é capaz de detectar tanto o DNA de BoHV-1 como de BoHV-5.

Análise *in silico* de restrição enzimática

A opção de diferenciar BoHV-1 de BoHV-5 por restrição enzimática se deve ao fato de o BoHV-1 provocar danos neurológicos menos frequentemente (Rissi et al., 2008),

assim a presença de um par extra de iniciadores poderia diminuir a eficiência da PCR. A análise de restrição enzimática foi realizada no programa pDraw 32 (Tippman, 2004).

Padronização da Reação

A reação foi otimizada variando-se a concentração dos reagentes e tipo de DNA polimerase. Foram testadas uma Taq convencional e duas Taq hotstart. A reação foi padronizada para um volume total de 25 μ L, sendo 10% desse volume de DNA aplicado. A concentração de DNA adicionada à reação variou de 20 a 150 ng/ μ L. Os resultados foram visualizados em um gel de agarose 2,5% corado com brometo de etídeo sob luz ultra-violeta, após eletroforese.

Teste de Especificidade Analítica

Cada par de primers foi testado individualmente com os quatro vírus para verificar a presença de ampliações inespecíficas. A especificidade da reação também foi testada em sete isolados brasileiros de SuHV-1 previamente caracterizados (Fonseca Jr. et al., 2010b), cinco isolados de BoHV-1, *Streptococcus suis*, *Listeria monocytogenes*.

Teste de Sensibilidade Analítica

O teste de sensibilidade analítica foi realizado apenas para BoHV-1, BoHV-5 e SuHV-1. Isolados desses vírus foram titulados em célula de linhagem MDBK (rim de bovino). A solução estoque desses vírus foi diluída em base dez e submetida à extração de DNA. O DNA foi estocado a -20^o C até o momento do uso. A sensibilidade foi testada com os iniciadores separados e em multiplex.

Amostras Clínicas

Foram utilizadas sessenta e cinco amostras de cérebro de bovinos com sinais neurológicos e negativas para raiva pela imunofluorescência direta e inoculação em

camundongos, oriundas de todo o estado de Minas Gerais, Brasil.

O material genético de outras espécies animais foi submetido à PCR. O objetivo foi analisar a possibilidade do uso dessa PCR para diagnóstico desses vírus em tecidos diferentes ou a inclusão de amostras específicas em uma bateria de diagnóstico da mPCR. Trinta e cinco amostras de cérebro de suíno foram previamente caracterizadas em outro trabalho, sendo 25 positivas e dez negativas para SuHV-1 (Fonseca Jr. et al., 2010). Além dessas, foram coletadas mais quatro amostras de cérebro (três positivas e uma negativa) e dez amostras de sêmen (sete positivas e três negativas) de ovinos com suspeita de infecção por OvHV-2 previamente testada por PCR em tempo real (dados não publicados).

RESULTADOS

PCR

A reação foi padronizada com as seguintes concentrações dos reagentes, para um volume final de reação de 25 μ L: 0,5 pmol/ μ L dos iniciadores OvHV2-102, 1 pmol/ μ L dos iniciadores BoHV-191 e, 0,25 pmol/ μ L dos iniciadores SuHV1-499 (IDT, EUA), 2 mM de MgCl₂, 3% DMSO, 200 mM de dNTP, 2 U Taq Platinum (Invitrogen, EUA), Tampão 5x GoTaq Green (Promega, EUA). Outras concentrações foram testadas como a adição de 50% a mais do volume de tampão ou aumento da quantidade de iniciadores. O acréscimo desses reagentes implicou num aumento da especificidade e sensibilidade analítica, respectivamente, quando trabalhados separadamente, mas sem resultados significativamente melhores do que os das concentrações apresentadas acima. O tipo e o fabricante da enzima DNA polimerase implicaram em diferenças nos níveis de amplificação. A melhor delas foi a do tipo hotstart, mas a atividade da mesma variou de acordo com a marca, sendo necessário alterar o número de unidades adicionadas. A mPCR apresentou bandas específicas para cada agente pesquisado (Fig. 1).

Os fragmentos amplificados para os herpesvírus bovino puderam ser diferenciados por restrição enzimática (Fig 2). Após análise in silico, a enzima BtgI foi escolhida para diferenciação dos resultados por cortar o amplicom de BoHV-5 em dois

fragmentos (139 pb e 52 pb) e não cortar o amplicom de BoHV-1. A enzima BtgI clivou o amplicom de BoHV-5 em dois fragmentos de 139 pb e 52 bp após reação realizada segundo recomendação do fabricante (New England Biolabs®).

Tabela 1 Iniciadores utilizados neste trabalho

Iniciador	Sequência	Amplicom (pb)	Vírus	Alvo
BoHV-191-F	TCTTTACGGTTCGACGACTCC	191	BoHV-1 BoHV-5	Glicoproteína C
BoHV-191-R	GAAGWACACGCGCAGCTC			
OvHV2-102-F	CAACGTCGGTGACACCATCGA	102	OvHV-2	Glicoproteína B
OvHV2-102-R	TCTCGGAGCACAGACACGGTT			
SuHV1-499-F	CCGCGGGCCGTGTTCTTTGT	499	SuHV-1	Glicoproteína E
SuHV1-499-R	CGTGGCCGTTGTGGGTCAT			

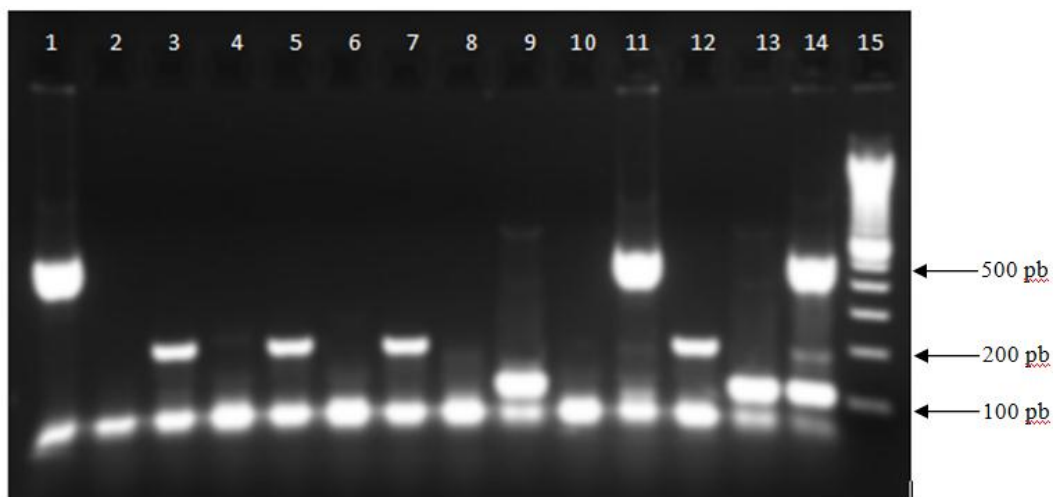


Figura. 1: Eletroforese em gel de agarose 2% da mPCR. Os resultados dos controles positivos e dez amostras clínicas foram agrupados para visualização dos resultados. Foram incluídas no gel sempre duas amostras clínicas cada tipo de tecido, sendo a primeira positiva e a segunda negativa em um teste prévio. 1 – Amostra de cérebro de suíno, 2 – Amostra de cérebro de suíno, 3 a 8 – amostra de cérebro de bovino, 9 – amostra de cérebro de ovino, 10 - amostra de cérebro de ovino, 11 - Controle positivo de SuHV-1, 12 - Controle positivo e BoHV-1, 13 - Controle positivo de OvHV-2, 14 – Controle positivo com todos os vírus,,15 – Padrão de tamanho molecular com intervalo de 100 pares de base.

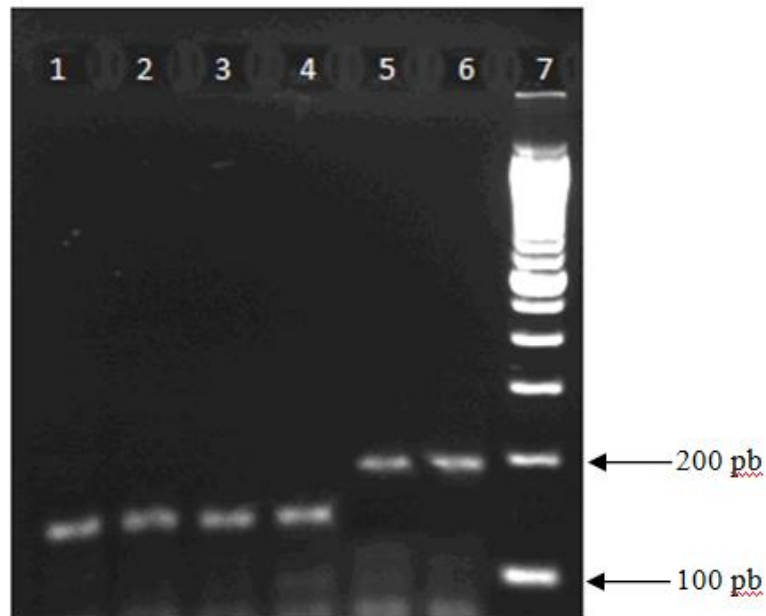


Figura 2: Eletroforese em gel de agarose 2% da mPCR de resultados positivos para BoHV-1 e BoHV-5 digeridos pela enzima de restrição BtgI. 1 – Controle positivo de BoHV-5, 2 a 4 – Amostra clínica de BoHV-5, 5 – amostra clínica de BoHV-1, 6 – controle positivo de BoHV-1, 7 - Padrão de tamanho molecular com intervalo de 100 pares de base.

Teste de Especificidade

Os iniciadores amplificaram especificamente todas as estirpes de isolados de SuHV-1 e BoHV-1 como esperado, sem apresentarem bandas inespecíficas quando o DNA *S. suis* ou *L. monocytogenes* foi adicionado. Não houve amplificação inespecífica no teste com os iniciadores isolados.

Teste de Sensibilidade Analítica

A sensibilidade analítica para detecção de BoHV-1, BoHV-5 e SuHV-1 foi, respectivamente, 101,2 TCID₅₀/mL, 101,0 TCID₅₀/mL, 101,3 TCID₅₀/mL na reação multiplex (Fig. 3). Os resultados foram semelhantes para a reação realizada com os primers separadamente.

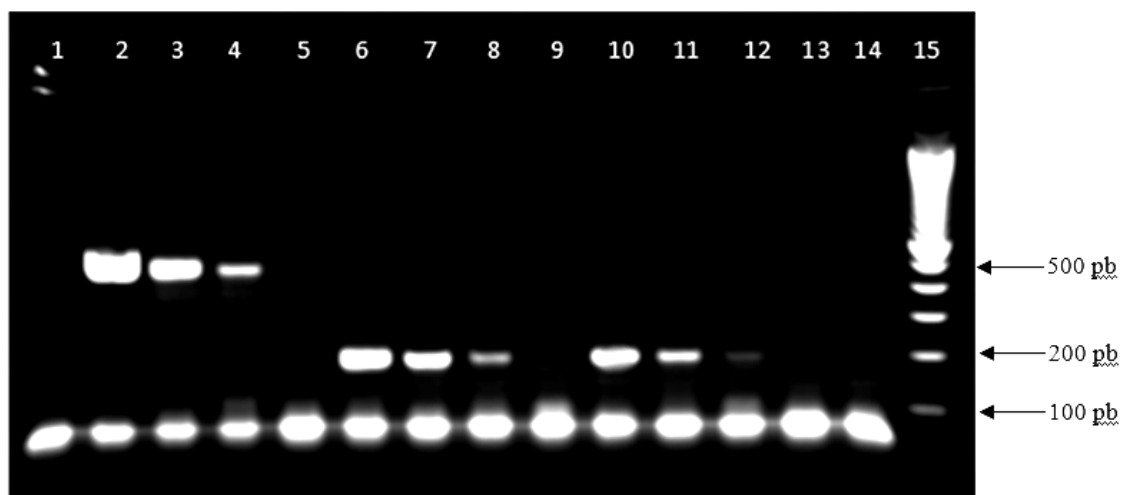


Figura 3: Sensibilidade analítica da PCR multiplex. 1 – Controle negativo (amostra de cérebro de bovino), 2 - SuHV-1 $10^{3.3}$ TCID50/mL, 3 - SuHV-1 $10^{2.3}$ TCID50/mL, 4 - SuHV-1 $10^{1.3}$ TCID50/mL, 5 - SuHV-1 $10^{0.3}$ TCID50/mL, 6 - BoHV-1 $10^{3.2}$ TCID50/mL, 7 - BoHV-1 $10^{2.2}$ TCID50/mL, 8 - BoHV-1 $10^{1.2}$ TCID50/mL, 9 - BoHV-1 $10^{0.2}$ TCID50/mL, 10 - BoHV-5 $10^{3.0}$ TCID50/mL, 11 - BoHV-5 $10^{2.0}$ TCID50/mL, 12 - BoHV-5 $10^{1.0}$ TCID50/mL, 13 - BoHV-5 $10^{0.0}$ TCID50/mL, 14 - Branco, 15 - Marcador de tamanho molecular com intervalo de 100 pb.

Amostras Clínicas

A maior parte das amostras de cérebro de bovino foram negativas na mPCR (Tab. 2). Entre as 17 amostras positivas, 11 apresentaram amplificação específica para os herpesvírus bovino. Apenas duas amostras apresentaram bandas não específicas de tamanho diferente ao esperado, sendo o resultado considerado negativo.

As amostras de cérebro de ovinos e de suínos apresentaram os resultados

esperados, isto é, sem quaisquer bandas inespecíficas, assim como as de sêmen de ovinos, que condisseram com os testes realizados com PCR em tempo real. Apenas uma das amostras positivas na PCR em tempo real não amplificou na mPCR. Apenas duas amostras de cérebro de suíno apresentaram bandas inespecíficas aparentemente devido à concentração excessiva de DNA ou à qualidade do mesmo. A diluição ou uma nova extração levaram ao desaparecimento das bandas.

Tabela 2: Resultados obtidos a partir da mPCR a partir de amostras clínicas

Amostra	Total	Positivas				Negativas
		BoHV-1	BoHV-5	OvHV-2	SuHV-1	
Cérebro Bovino	65	1	10	5	0	49
Cérebro Suíno	35	0	0	0	25	10
Cérebro Ovino	4	0	0	3	0	1
Sêmen Ovino	10	0	0	6	0	4

DISCUSSÃO

A mPCR padronizada nesse trabalho foi capaz de detectar e diferenciar quatro tipos de vírus causadores de encefalite em bovinos e de sinais neurológicos em outras espécies como ovinos e suínos. Todos esses agentes são listados no Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (OIE, 2009), sendo considerados, portanto, de elevada importância na pecuária internacional. Sua importância se estende em diversas áreas, sendo que pelo menos dois deles, OvHV-2 e SuHV-1, podem infectar diversas espécies.

O diagnóstico diferencial pode ser importante para se determinar as providências a serem tomadas. A encefalite causada por SuHV-1, por exemplo, é sinal de que existem suínos infectados na área, pois esses são os principais agentes replicadores desse vírus (Sobestiansky et al., 1999). A pseudorraiva é uma enfermidade de notificação obrigatória e de grande impacto na indústria de suínos, implicando em atitudes relacionadas com o programa de erradicação.

A mPCR descrita nesse trabalho foi padronizada analisando-se diversas variáveis, desde a concentração de reagentes à amplificação de amostras clínicas e variantes dos microrganismos pesquisados. As reações em multiplex são muito mais sensíveis às variações do que aquelas realizadas com apenas um par de iniciadores. É preciso levar em conta muitas variáveis, pois até mesmo iniciadores idênticos podem ter performance diferente em diferentes laboratórios (Bastien et al., 2008). O tipo e até mesmo o fabricante da enzima DNA polimerase utilizada gerou variações na sensibilidade e especificidade da reação. Dentre outros reagentes testados, a utilização de um tampão adequado e de DMSO foi relevante, sendo esse último importante para evitar a inibição da atividade de polimerização devido à estruturas secundárias, algo bastante comum em genomas com alto índice de guanina e citosina como o de herpesvírus (Hengen, 1997).

A técnica de mPCR em tempo real tem ganhado grande destaque nas publicações científicas (Belák, 2007), no entanto a utilização de oligonucleotídeos marcados com fluorescência e de equipamentos especiais aumenta o custo da técnica. Além disso, apesar de possuir outras vantagens, uma reação de PCR em tempo real nem sempre é muito mais sensível ou específica do que uma PCR convencional, se não estiver bem padronizada (Bastien et al., 2008).

A mPCR apresentou reações inespecíficas em dois momentos, sendo esses associados principalmente à qualidade do DNA extraído. Em um dos casos, a amostra estava estocada há mais de dois anos no laboratório antes de ter o DNA extraído especificamente para essa mPCR. O aumento de 50% na quantidade de tampão adicionado melhorou a especificidade da técnica, no entanto acarretou na diminuição da sensibilidade em até 10 vezes no diagnóstico de BoHV-1 e BoHV-5.

A maior parte das amostras de cérebro de bovino testada foi negativa para os três herpesvírus, no entanto, é preciso salientar que diversos outros microrganismos causam encefalite com sintomas semelhantes aos da raiva, leucose enzoótica bovina, listeriose, enterotoxemia e a forma cerebral da babesiose (Riet-Correa et al., 1998; Claus et al., 2002).

Gunson et al. (2008) relatam a importância das reações de PCR multiplex na rotina do laboratório. Uma reação bem padronizada aumenta a velocidade do trabalho e otimiza a utilização dos termocicladores e preparo das reações de PCR. O método pode ser utilizado até mesmo quando apenas dois dos agentes são suspeitos de causar a doença. O SuHV-1 e o OvHV-2 podem causar sintomas neurológicos em suínos (Albini et al., 2003), no entanto, durante a revisão de literatura para esse trabalho não se encontrou relatos de infecções por BoHV-5 nessa mesma espécie. De acordo com os testes realizados nessa pesquisa, amostras de cérebro de porcos com suspeita de doença de Aujeszky ou febre catarral maligna podem ser submetidas à

mPCR. Outros tecidos como cérebro e sêmen de ovino também são outras possibilidades para o diagnóstico.

A mPCR padronizada nesse trabalho é uma técnica útil para o diagnóstico diferencial de enfermidades relacionadas ao sistema nervoso central de bovinos, com a possibilidade de utilização mesmo em material derivado de suínos e ovinos. Sua aplicação no laboratório de diagnóstico

permite um diagnóstico sensível, específico e rápido.

AGRADECIMENTOS

Esse trabalho foi financiado pelo projeto INCT do CNPq e do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e pela FAPEMIG. Agradecemos ao professor Paulo Rohe pela doação do isolado de BoHV-5.

Capítulo 5: PCR MULTIPLEX EM TEMPO REAL PARA DETECÇÃO DE AGENTES ASSOCIADOS COM DOENÇAS RESPIRATÓRIAS DE SUÍNOS

Fonseca Jr., A. A.¹, Nonaka, C. K. V.², Guedes, E. O.¹, Lobato, Z. I. P.², Dias, A. S.², Nascimento, J. A. F. B.², Klein, C. S.³, Leite, R. C.², Reis, J. K. P.², Heinemann, M. B.²

¹ LANAGRO/MG - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Pedro Leopoldo, Minas Gerais

² Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais

³ Embrapa Suínos, Concórdia, Santa Catarina

RESUMO

As doenças respiratórias dos suínos (DRS) são um grupo de enfermidades complexas que causam elevados prejuízos na suinocultura. Diversos agentes infecciosos estão relacionados, entre eles o vírus da doença de Aujeszky (SuHV-1), *Haemophilus parasuis* (HP), *Mycoplasma hypneumoniae* (MH) e *Pasteurella multocida* (PM). O objetivo desse trabalho foi padronizar duas PCRs em tempo real multiplex para a detecção desses seis microorganismos. Foram desenhados iniciadores e sondas específicos para cada agente infeccioso marcadas com fluoróforos que permitissem amplificar parte específica do genoma em dois grupos de reações, um com os vírus e outro com as bactérias. As reações foram testadas em 142 amostras de *pools* de linfonodos e pulmões de suínos com sinais clínicos de DRS. A PCR multiplex foi capaz de detectar 61 para HP, 29 para PM, 30 para MH e uma para SuHV-1. Foram registrados 35 casos de coinfeção. As qPCRs padronizadas nesse trabalho são ferramentas úteis na análise de doenças do complexo respiratório dos suínos. Permitiram o diagnóstico rápido, sensível e específico de seis patógenos associados com grandes perdas na suinocultura.

INTRODUÇÃO

As doenças respiratórias dos suínos (DRS) são um grupo de enfermidades complexas que causam elevados prejuízos na suinocultura. Entre suas principais características está o fato de ocorrerem em suínos de 16 a 22 semanas de idade e causarem perda de peso, anorexia, dispnéia, febre e tosse (Thacker, 2001). Os

agentes etiológicos das DRS são diversos, podendo estar presentes em conjunto ou separadamente. Dentre esses, é possível citar vírus e bactérias como o vírus da doença de Aujeszky, circovírus suíno 2, vírus da síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos, *Mycoplasma hypneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* e *Pasteurella multocida* (Chae, 2005).

O *suid herpesvirus 1* (SuHV-1) é o agente causador da doença de Aujeszky ou pseudorraiva e causa sinais clínicos variados de acordo com a idade dos suínos afetados, variando de neurológicos nos animais mais jovens a respiratórios e reprodutivos nos adultos (Kluge et al., 1999). Três agentes etiológicos bacterianos da família *Pasteurellaceae* são de grande importância na suinocultura. *H. parasuis* (HP), *M. hypneumoniae* (MH) e *P. multocida* (PM) participam isoladamente ou em conjunto das DRS, além de causar diversos sintomas específicos. HP é conhecido como o agente causador da doença de Glasser, artrite e poliserosite suína. O aumento da mortalidade, morbidade e incidência de infecções em decorrência da infecção por essa tem causado preocupação nos últimos anos (Rapp-Gabrielson et al., 2006).

MH é o principal agente da pneumonia enzoótica, uma doença respiratória que afeta suínos em fase de terminação (Sibila et al., 2009). Quando a infecção não é complicada por outros patógenos, a doença segue um curso subclínico com sinais clínicos leves, tosse não produtiva, reduzida taxa de ganho diário de peso e reduzida eficiência de conversão alimentar. Na presença de patógenos secundários,

ocorrem dificuldades respiratórias e pirexia, além da possibilidade de morte (Mães et al., 1996).

PM é outro agente bacteriano comumente associado com as DRS. Além de provocar rinite atrófica nos suínos, ainda pode infectar outras espécies causando cólera em aves e septicemia hemorrágica em bovinos (Glisson et al., 2003). Os tipos capsulares A e D são os mais comumente encontrados em suínos, ainda que existam outros três sotoripos relatados (Ewers et al., 2006).

O diagnóstico e identificação dessas três bactérias são trabalhosos e se baseiam no isolamento e bioquímica ou sorologia. O uso prévio de antibióticos, a baixa sensibilidade (Register e DeJong, 2006) além de possíveis erros nos testes bioquímicos (Da Costa et al., 2004) são problemas comumente relatados que podem ser solucionados com testes moleculares como a PCR. Problemas semelhantes também já foram descritos para o diagnóstico dos agentes virais (Giammarioli et al., 2007, Jiang et al., 2010, Fonseca Jr. et al., 2010). Testes moleculares individuais para a detecção desses agentes provaram que a sensibilidade e especificidade, aliadas à velocidade, são vantagens marcantes no diagnóstico dos agentes da DRS (Schuchert et al., 2004; Corney et al., 2007; Angen et al., 2007). Essas metodologias ainda podem ser incrementadas com a utilização da técnica de PCR em tempo real que permite um diagnóstico ainda mais sensível e

específico com menor risco de contaminação por não necessitar de se abrir tubos para a análise dos resultados. O uso de reações em multiplex rápidas e precisas também é de grande valia no diagnóstico molecular, diminuindo os custos e aumentando a velocidade da execução dos testes.

O objetivo desse trabalho foi padronizar PCRs em tempo real para detecção conjunta dos agentes bacterianos *H. parasuis*, *A. pleuropneumoniae* e *P. multocida* e dos agentes virais parvovírus suíno, vírus da doença de Aujeszky e circovírus suíno 2.

MATERIAL E MÉTODOS

Desenho de Iniciadores e Sondas

Os iniciadores e sondas para a PCR foram desenhados no programa PrimeTime qPCR Assay (IDT, EUA) e estão listados na Tabela 1. Cada sonda recebeu uma marcação diferente para detecção da amplificação. Optou-se pela utilização de uma qPCR em multiplex para as doenças bacterianas (qPCR-Bac) com as seguintes marcações: FAM para HP, JOE para MH, CY5 para PM. A marcação FAM foi escolhida para detecção do SuHV-1. A extração de DNA e presença de inibidores de PCR foi realizada com uma qPCR para amplificação do gene da beta-actina de acordo com protocolo descrito por Bielanski et al. (2009) com adaptações para detecção de DNA.

Tabela 1: Iniciadores e sondas utilizados para detecção dos patógenos pesquisados nesse trabalho

Agente infeccioso	Alvo	Iniciadores	Sonda
<i>H. parasuis</i> *	<i>infB</i>	F: CCGCTTGCCATACCCTCTT R: CGACTTACTTGAAGCCATTCTTCTT	ATCGGAAGTATTAGAATTAAGTGC
<i>P. multocida</i>	<i>KMT1</i>	F: TTGTTTGCTCGAAATTGCTG R: GTGCTTTGCTTGCCACACATTTA	CCGCTTGATTCATCACGCCA
<i>M. hypneumoniae</i>	<i>P216</i>	F: CCATCCACTGGTATTTGATCTTTG R: AGAAATGAGTGCGGTTCCC	TGAGCAATATGATCCAAGAACCCCGC
<i>SuHV-1</i>	<i>gB</i>	F: CTC CTG CCG CAC CTG AAG R: GTC TGG AAG CGG TAG AAG CC	CGGAACTCGCTGACGCACCAATCGC

*Iniciadores e sonda para HP foram descritos por Turni et al., 2010.

Otimização

A reação foi otimizada para amplificação dos três agentes em conjunto no equipamento Rotorgene 3000 (Corbett, Austrália). A eficiência foi medida de acordo com curva de diluição com cinco pontos com diferentes concentrações de iniciadores e sondas. Os resultados foram comparados com as reações em multiplex e separadamente para avaliação da interferência de oligonucleotídeos adicionais.

Sensibilidade e Especificidade

O limite de detecção (LD) foi determinado a partir de diluição seriada em triplicata do DNA das bactérias. A menor diluição com três ampliações foi utilizada para confirmação com vinte e uma repetições, o que permite estimar 95% de confiança no resultado.

A qPCR-Bac foi testada em vinte amostras de pools de linfonodo e pulmão de suínos positivos para MH, PM e HP pela técnica de isolamento. A qPCR-SuHV-1 foi testada em uma amostra de pulmão e dez amostras de cérebro de suínos positivos para o SuHV-1 pela técnica de isolamento.

A especificidade diagnóstica foi testada com *Mycoplasma mycoides*, *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma arginini*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, vírus da peste suína clássica, vírus da peste suína africana, parvovírus suíno, circovírus suíno 2.

Amostras Clínicas

A PCR multiplex foi testada em 142 amostras clínicas de suínos com sinais respiratórios coletadas entre 2006 e 2007. O DNA foi extraído a partir de *pools* de pulmão e linfonodos segundo metodologia descrita por Fonseca Jr. et al. (2010).

RESULTADOS

Otimização

A PCR multiplex foi otimizada para um volume de 25 µL, divididos em 12,5 µL do RealQ x2 PCR Master Mix (Ampliqon, Dinamarca), 1,0 µL de MgCl₂ 50 mM, 2 µL de DNA (concentração entre 300 e 600 ng/µL). A reação para qPCR-SuHV-1 apresentou os melhores resultados com os oligonucleotídeos nas quantidades a seguir: 7,5 pmol de cada iniciador e 5 pmol de sonda para SuHV-1. A reação para qPCR-Bac apresentou os melhores resultados com os oligonucleotídeos nas seguintes concentrações: 15 pmol de cada iniciador para HP e PM, 5 pmol de sonda para HP, 7,5 pmol de sonda para PM, 10 pmol de cada iniciador para MH e 5 pmol de sonda.

O termociclador foi programado com as seguintes temperaturas: 95°C por 15 minutos para desnaturação e ativação da enzima, seguido de 45 ciclos a 95°C por 15 segundos, 58°C por 35 segundos (com detecção de fluorescência), 72°C por 20 segundos. A eficiência para qPCR-SuHV-1 foi de aproximadamente 1,0 SuHV-1. Os resultados foram menores para qPCR-Bar com 0,90 para MH, 0,74 para PM e 0,90 para HP.

Sensibilidade e Especificidade

Os resultados para determinação do LD foram diferentes para cada alvo: 80 fg para MH, 240 fg para PM, 200 fg para HP e 10^{-1,3} TCID₅₀/mL para SuHV-1. A partir das variações dos limites de detecção, determinou-se que amostras com Ct acima de 42 seriam consideradas negativas.

A qPCR-Bac a qPCR-SuHV-1 amplificaram todas as amostras positivas para seus respectivos alvos, concordando com o isolamento viral e bacteriano em 100% dos resultados. Nenhuma das reações amplificou o genoma de outros microorganismos correlacionados.

Amostras clínicas

Das 142 amostras testadas, quatro amostras foram retiradas da análise por não apresentarem amplificação para o gene da beta-actina, indicando que os resultados negativos para os quatro agentes infecciosos testados não foram confiáveis. Das 138 restantes, a PCR multiplex detectou 61 positivas para HP, 30 para MH, 29 para PM, uma para SuHV-1. Foram registrados 35 casos de coinfeção ocorrendo a detecção de PM e HP em 14 amostras, HP e MH em 13 amostras e HP, PM e MH em oito amostras.

DISCUSSÃO

As metodologias de diagnóstico molecular são de grande impacto na suinocultura. Elas permitem o diagnóstico rápido e prático de muitas enfermidades sem, no entanto, diminuir a sensibilidade e a especificidade. Essas metodologias são encontradas em diversas modalidades como PCR convencional (Kalorey et al., 2008), nested PCR (Fonseca Jr. 2010b) e PCR em tempo real (Angen et al., 2007). Dentre todas essas, aquelas técnicas que geralmente apresentam resultados com altos índices de sensibilidade e de especificidade são as de qPCR.

A utilização de diagnósticos moleculares em multiplex permite um diagnóstico mais rápido e prático de doenças animais. As qPCRs descritas nesse trabalho permitiram detectar seis agentes de elevada importância na suinocultura. Essas bactérias e vírus são reconhecidos por causarem sinais clínicos graves e debilitantes em suínos e podem ser confundidos com outras enfermidades. A presença de mais de um tipo de agente nas DRS é relativamente comum e pode agravar os sinais clínicos (Kim et al., 2003).

Os resultados encontrados nesse trabalho demonstram que a qPCR multiplex pode auxiliar significativamente no diagnóstico de desses agentes. A padronização foi realizada criteriosamente com o único

objetivo de se fornecer um diagnóstico qualitativo com alta eficiência. Devido à possibilidade de coinfeção na DRS, as reações foram ajustadas para a amplificação de três patógenos simultaneamente. Para tanto, a concentração de cloreto de magnésio foi aumentada significativamente para estimular a atividade da enzima.

A eficiência de cada qPCR foi testada para se verificar o comportamento das reações. Geralmente recomenda-se, nesses testes, a utilização do DNA puro, muitas vezes com o amplicom inserido no plasmídeo, para a determinação. Nesse trabalho, preferiu-se utilizar amostras clínicas diluídas para se verificar o comportamento da amplificação junto a interferentes. A eficiência se manteve intacta mesmo em caso de amplificação de mais de um agente ao mesmo tempo (Shain e Clemens, 2008). A qPCR-Bac não obteve bons resultados nos testes de eficiência, no entanto esse resultado não teve impacto nos testes qualitativos.

Os resultados clínicos mostraram um elevado número de amostras com resultado positivo para MH, HP e PM, no entanto apenas uma para SuHV-1. Existem poucos estudos sobre a prevalência de HP na suinocultura brasileira, porém outros trabalhos citam um elevado número de amostras com infecção por essa bactéria (McInnes et al., 2008). O elevado número de resultados positivos para PM já era esperado devido ao fato de ser comumente encontrada em suínos, mesmo naqueles saudáveis, e estar associada com doenças respiratórias (De Alwis et al., 1990). O único resultado positivo para SuHV-1 ocorreu em uma amostra proveniente de um foco para doença de Aujeszky confirmado pelo Ministério da Agricultura pela técnica de isolamento viral.

As qPCRs padronizadas nesse trabalho são ferramentas úteis na análise de doenças do complexo respiratório dos suínos. Permitiram o diagnóstico rápido, sensível e específico de seis patógenos associados com grandes perdas na suinocultura.

Parte 3: PADRONIZAÇÃO DE FERRAMENTAS MOLECULARES PARA EPIDEMIOLOGIA DO VÍRUS DA DOENÇA DE AUJESZKY

A terceira parte dessa tese se desenvolve a partir de um único tema, a epidemiologia molecular do vírus. Os três trabalhos descritos a seguir discutem as vantagens e problemas da utilização das técnicas moleculares para se entender os padrões de disseminação da enfermidade.

O primeiro trabalho, apresentado no Capítulo 6, descreve um método mais rápido e prático para a genotipagem por restrição enzimática. A técnica padrão utiliza era trabalhosa e dependia muito de elevada quantidade de DNA para resultados confiáveis, além de um processo de eletroforese demorado e sujeito a erros. A PCR multiplex descrita nessa tese permite detectar as principais regiões responsáveis pela genotipagem do SuHV-1. O processo de amplificação elimina as dificuldades de se genotipar o vírus a partir pequena quantidade de DNA presentes no tecido de animais infectados.

Os dois capítulos seguintes estão ligados à análise filogenética a partir do seqüenciamento parcial ou total de genes do SuHV-1. O Capítulo 7 descreve a necessidade da definição de modelos evolutivos para melhor aproveitamento das sequências. Sequências de isolados de diversas partes do mundo disponíveis no GenBank são utilizadas para a construção de uma árvore filogenética. O estudo de diferentes métodos permitiu definir a máxima verossimilhança e análise bayesiana como os melhores. O último foi escolhido para análise mais ampla dos dados.

O Capítulo 8 busca encontrar novos métodos para caracterização molecular do SuHV-1. Trabalhou-se com novas ferramentas de filodinâmica como redes filogenéticas e comparação de múltiplos genes. As árvores filogenéticas reconstruídas foram semelhantes, no entanto com alguns detalhes significantes na interpretação dos resultados. Ainda estuda-se nesse capítulo as diferentes estirpes do SuHV-1 de acordo com o local ou espécie da qual foram isoladas.

Capítulo 6: GENOTIPAGEM DO VÍRUS DA DOENÇA DE AUJESZKY POR PCR MULTIPLEX E RESTRIÇÃO ENZIMÁTICA

Fonseca Jr., A. A.¹, Magalhães, C.¹, Sales, E. B.¹, Heinemann, M. B.², Leite, R. C.², Reis, J. K. P.²

¹ LANAGRO/MG

² Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais

Publicado como:

Fonseca Jr., A. A., Magalhães, C. G., Sales, E. B., D'Ambros, R. M., Ciacci-Zanella, J., Heinemann, M. B., Leite, R. C., Reis, J. K. P. Genotyping of the Pseudorabies Virus by Multiplex PCR Followed by Restriction Enzyme Analysis. *ISRN Microbiology*, 2011.

RESUMO

O *suid herpesvirus 1* (SuHV-1) é o agente etiológico da doença de Aujeszky, também conhecida como pseudorraiva, uma enfermidade de grande impacto na suinocultura internacional. Esse agente infeccioso apresenta apenas um sorotipo, mas por análise de restrição enzimática do genoma completo, foi classificado em quatro genótipos denominados I, II, III e IV. O objetivo desse trabalho foi padronizar um método rápido para genotipagem do SuHV-1 sem a necessidade de isolamento do vírus. O genoma completo do vírus foi submetido a análise *in silico* de restrição enzimática. Foram desenhados iniciadores para flanquear os principais pontos de diferenciação dos genótipos. As PCRs padronizadas foram capazes de identificar isolados e, ainda, de realizar a diferenciação dos genótipos a partir de amostras clínicas de cérebro de suínos infectados. PCR-*BamHI* é um método rápido, prático e sensível para genotipagem do SuHV-1.

INTRODUÇÃO

O *suid herpesvirus* (SuHV-1) é o agente etiológico da doença de Aujeszky, também conhecida como pseudorraiva, uma enfermidade de grande impacto na suinocultura internacional. A importância dos danos causados devido à infecção por esse microrganismo torna obrigatória a notificação de qualquer foco à Organização Mundial para Saúde Animal (OIE, 2009). O SuHV-1 pertence à família *Herpesviridae*,

sub-família *Alphaherpesvirinae*, gênero *Varicelovirus* (Fauquet et al., 2005).

O SuHV-1 não é diferenciado por métodos sorológicos, sendo mais comum a utilização de endonucleases de restrição (Christensen, 1995). As técnicas se baseiam na digestão do DNA genômico ou parte deste para estudos epidemiológicos e genotipagem. Isolados britânicos foram discriminados por amplificação de um fragmento longo do gene da glicoproteína D e posterior digestão por *BamHI* (Banks, 1993). Em outro estudo, um algoritmo quantitativo foi desenvolvido para estimar a similaridade de isolados e amostras vacinais a partir das bandas geradas no gel após restrição enzimática do DNA viral (Weigel & Scherba, 1997). Apesar desses exemplos, o principal método de caracterização do SuHV-1 ainda é a digestão do genoma completo do vírus pela enzima *BamHI*. Essa metodologia foi utilizada por diversos autores para caracterizar isolados (Christensen, 1987; Christensen, 1988; Nishimori et al., 1987, Yamada et al., 1992; Christensen, 1995; Piatti et al., 2001; Salwa, 2004; Silva et al., 2005; Schaeffer et al., 2006; Müller et al., 2010).

A análise de polimorfismos de fragmentos de restrição com a enzima *BamHI* (RFLP-*BamHI*) foi capaz de dividir o SuHV-1 em quatro genótipos. Os genótipos I e II estão distribuídos mundialmente e os genótipos III e IV estiveram restrito à Dinamarca e Tailândia, não foram mais relatados (Christensen, 1995). Os estudos realizados

no Brasil demonstraram que o genótipo II prevalece entre os isolados, no entanto, também existem amostras com características do genótipo I (Piatti et al., 2001; Silva et al., 2005; Schaefer et al., 2006).

O RFLP-*BamHI* tem como principais desvantagens a necessidade de isolamento do vírus e o tempo longo de eletroforese. Algumas variações da metodologia exigem instrumentos como ultracentrífugas para separação adequada do DNA viral do DNA celular (Schaeffer et al., 2006). A pouca quantidade de DNA viral ou a ausência de instalações que permitam isolamento dos vírus também causam problemas na implantação da técnica (Müller et al., 2010).

O objetivo desse trabalho é padronizar uma técnica de PCR que permita caracterização do SuHV-1 sem a necessidade de isolamento viral, equipamentos específicos ou tempos prolongados de eletroforese.

MATERIAL E MÉTODOS

Desenho dos Iniciadores

Os iniciadores foram desenhados com base na restrição do genoma completo do SuHV-1 disponível no GenBank (BK001744, Klupp et al., 2004) no programa WebCutter (<http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/>). Os sítios de restrição encontrados foram comparados com os mapas descritos por Christensen (1995) para os genótipos I, II e III. Devido a ausência de informações para o genótipo IV e o fato de não ser mais relatado, seus pontos de restrição não foram incluídos na análise. Após a detecção das melhores regiões, as sequências foram submetidas ao programa Primer3Plus (Untergasser et al., 2007). O tamanho dos amplicons foi

escolhido de acordo com os fragmentos de restrição e a possibilidade de utilização dos mesmos em uma PCR multiplex.

Amostras

Onze isolados brasileiros de SuHV-1 (previamente caracterizados por Piatti et al., 2001; Silva et al., 2005; Fonseca Jr. et al., 2010a), a amostra vacinal Bartha, amostra padrão Shope e o isolado atenuado NIA-4 foram utilizados para a padronização da PCR (Tabela 1). Todas essas amostras foram multiplicadas em células de rim de suíno (pk15) antes da extração do DNA.

Vinte amostras clínicas positivas e 10 amostras negativas para SuHV-1 previamente diagnosticadas (Fonseca Jr. et al., 2010b, Fonseca Jr. et al., 2010c) provenientes de focos do estado de Santa Catarina no período entre 2002 e 2003 foram utilizadas para padronização da técnica em tecido animal com o objetivo de se determinar a sensibilidade, especificidade e a interferência da matriz na reação.

O DNA total foi extraído através do kit comercial Wizard[®] Genomic DNA Purification (Promega, EUA) e armazenado a -20°C para posterior genotipagem.

Padronização da PCR

As reações foram padronizadas com testes de acordo com temperatura de anelamento, concentração dos reagentes (iniciadores, DNA polimerase, MgCl₂) e tempo de cada estágio nos ciclos. Os primeiros testes foram realizados com os iniciadores separados para posterior aplicação em multiplex.

Tabela 1: Amostras do SuHV-1 utilizadas nesse trabalho

Isolado	Origem	Genótipo
Shope	ATCC	I
Bartha	EMBRAPA	I
NIA-4	Irlanda do Norte	I
031	Paraná - Brasil	I
673	Paraná - Brasil	I
936	Paraná - Brasil	I
PIAU	Minas Gerais - Brasil	I
F3356	Santa Catarina - Brasil	I
F3303	Paraná - Brasil	I
F3293	Santa Catarina - Brasil	II
F3380	Santa Catarina - Brasil	II
F3319	Santa Catarina - Brasil	II
EVI011/03	Rio Grande do Sul - Brasil	II

RESULTADOS

Desenho dos Iniciadores

Os iniciadores escolhidos para a PCR abordam nove sítios de restrição (Tabela 2). As regiões delimitadas pelos iniciadores *BamHI*-1-738 e *BamHI*-4-357 são

importantes para a diferenciação dos genótipos. O genótipo II não possui sítio de restrição em *BamHI*-1-738 e o genótipo III, em *BamHI*-4-357 (Tabela 3). Essas mesmas regiões oferecem a oportunidade de subtipagem com enzimas como *BstEII* que tem um sítio de restrição em *BamHI*-4-357 no subtipo Is.

Tabela 2: Iniciadores utilizados nesse trabalho

Iniciador	Sequência	Posição*	Amplicom	Gene
<i>BamHI</i> -1-738-F	TACCAGATCGGTTGATGTGC	1227-1246		
<i>BamHI</i> -1-738-R	AACAGGAGCGTCTCCGAGTA	1945-1964	738	<i>UL56</i>
<i>BamHI</i> -3-256-F	GTAGGCCGCGTAGAACTGC	37671-37689		
<i>BamHI</i> -3-256-R	GCGCATCGAGAGCAAGTA	37909-37926	256	<i>UL36</i>
<i>BamHI</i> -4-357-F	GAGCAGCATGATCGTCGTC	55372-55390		
<i>BamHI</i> -4-357-R	TTCGTCTCGCAGATGATGTC	55709-55728	357	<i>UL44</i> , <i>UL26</i> , <i>UL26.5</i>
<i>BamHI</i> -6/7-637-F	GAGTCCAAGGACATGGAGGA	62380-62399		
<i>BamHI</i> -6/7-637-R	GTCTCACACACAACCGGGTA	62997-63016	637	<i>UL22</i>
<i>BamHI</i> -16/17-799-F	GAGATGCACCTGATCGACCT	119085-119104		
<i>BamHI</i> -16/17-799-R	AAGACGAGCACGACGATGTA	119883-119864	799	<i>US3</i> , <i>US4</i>
<i>BamHI</i> -19/20-519-F	CGCCGTTCTACATCACCAC	126073-126091		
<i>BamHI</i> -19/20-519-R	ATCCTGCCGTCTAGGAGATG	126572-126591	519	<i>US2</i>

* Sequência de referência, genoma completo do SuHV-1 (Acesso GenBank: BK001744)

Tabela 3: Quantidade de sítios de restrição para cada amplicom nos genótipos I, II e III de SuHV-1

Iniciador	Quantidade de Sítios de Restrição		
	I	II	III
<i>BamHI</i> -1-738-F	1	0	1
<i>BamHI</i> -1-738-R			
<i>BamHI</i> -3-256-F	1	1	1
<i>BamHI</i> -3-256-R			
<i>BamHI</i> -4-357-F	1	1	0
<i>BamHI</i> -4-357-R			
<i>BamHI</i> -6/7-637-F	2	2	2
<i>BamHI</i> -6/7-637-R			
<i>BamHI</i> -16/17-799-F	2	2	2
<i>BamHI</i> -16/17-799-R			
<i>BamHI</i> -19/20-519-F	2	2	2
<i>BamHI</i> -19/20-519-R			

Padronização da PCR

As PCRs foram padronizadas em multiplex com dois conjuntos de iniciadores. O Mix 1 continha *BamHI*-1-738, *BamHI*-3-256 e *BamHI*-19/20 e o Mix 2 *BamHI*-4-357, *BamHI*-6/7-637, *BamHI*-16/17-799. As reações de 20 µL foram padronizadas com as seguintes concentrações dos reagentes: 10 pmol de cada iniciador, 4 µL de Tampão GoTaq Green 5x (PROMEGA, EUA), MgCl₂ 2.0 mmol/L, 6% de DMSO, DNTP 300 µmol/L (Invitrogen, Estados Unidos), 3 U GoTaq Hotstart (PROMEGA, EUA). As condições utilizadas para ambas as PCR foram as seguintes: um estágio de desnaturação a 95°C por 5 min, 35 ciclos a 95°C por 50 seg, 60°C por 50 seg, 72°C por 1 min e um estágio final de extensão a 72°C por 7 min.

A restrição enzimática foi realizada conforme as instruções do fabricante (New England Biolabs, EUA). Os géis foram

analisados em gel de agarose a 2,5% corado com brometo de etídeo após uma hora de corrida.

Amostras

Todas as amostras de isolados previamente caracterizadas em outros trabalhos apresentaram os perfis de restrição esperados (Fig. 1). As amostras clínicas negativas para SuHV-1 não apresentaram bandas.

Entre as vinte amostras clínicas, dezessete amplificaram normalmente e três delas necessitaram de adição de maior quantidade de DNA para melhor visualização dos resultados. Todas apresentam o perfil de restrição do genótipo II do SuHV-1.

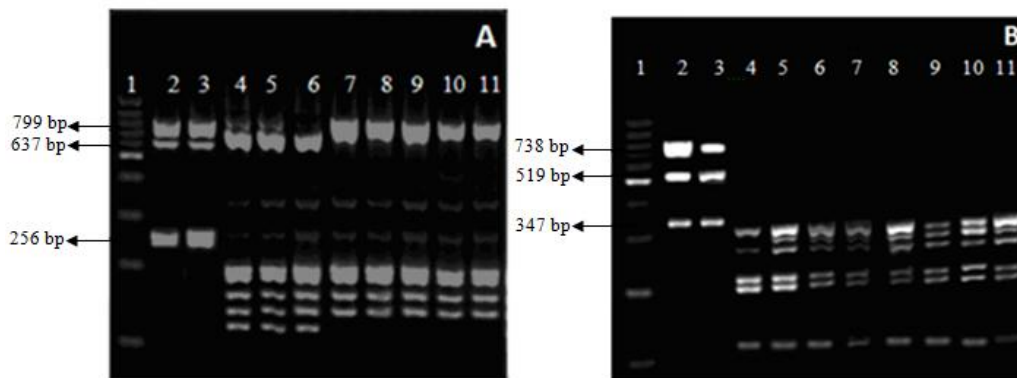


Figura 1: Perfis de restrição enzimática por *Bam*HI para amostras de isolados e amostras clínicas de SuHV-1. A: mix A and B: mix B. As amostras foram selecionadas como exemplos. Genótipo I (canaletas 4 a 6) e genótipo II foram diferenciados utilizando-se o mix A. Canaletas: 1 – marcador de tamanho molecular, 2 – amostra Shope Shope (sem restrição renzimática), 3 – amostra clínica (sem restrição renzimática), 4 – amostra padrão Shope, 5 - isolado 936, 6 – isolado NIA-4, 7 – isolado 3319, 8 - isolado 3370, 9 a 11 – amostras clínicas.

DISCUSSÃO

O RFLP-*Bam*HI é um dos mais tradicionais métodos de genotipagem dos isolados. Mesmo com a utilização de sequenciamento para árvores filogenéticas (Fonseca Jr. et al., 2010a; Müller et al., 2010), a técnica de restrição ainda é importante para genotipagem do SuHV-1. Seus maiores problemas estão na utilização de equipamentos como ultracentrífugas, necessidade de isolamento do vírus ou eletroforese com mais de oito horas de duração e sob temperatura controlada. A PCR-*Bam*HI desenvolvida nesse trabalho permite a análise de sítios de restrição sem a necessidade de qualquer equipamento que não sejam os básicos de um laboratório de biologia molecular.

Os principais pontos de restrição para identificação dos três genótipos estão presentes nos amplicons, sendo claramente diferenciados pelo mix A. Ainda existe a possibilidade de restrição por outras enzimas como *Bst*EII para subtipagem ou a análise de pontos comuns de recombinação pelo mix B. As reações podem partir de vírus isolados ou de material clínico sem que bandas inespecíficas atrapalhem a interpretação dos resultados. Dentre as amostras clínicas testadas, somente três

não foram positivas na PCR-*Bam*HI. Essas apresentaram altos valores de Ct no diagnóstico por PCR em tempo real (dados não publicados), o que indica a baixa quantidade de DNA viral. Esse problema foi facilmente corrigido com adição de mais DNA na reação. Essa solução não seria possível com o RFLP-*Bam*HI, fato já relatado anteriormente (Müller et al., 2010).

A PCR-*Bam*HI foi inicialmente padronizada com o conjunto dos seis pares de iniciadores em uma só reação, no entanto, a visualização ideal dos resultados só podia ser feita depois de duas horas de eletroforese. A utilização de dois mixes permite uma visualização mais simples dos resultados.

A PCR seguida de restrição enzimática já foi utilizada em outros vírus da família *Herpesviridae* como herpesvírus bovino 1, 2 e 5 (De-Giuli et al., 2002), herpesvírus simplex 1 (Herrera-Martínez et al., 2005), varicella-zoster vírus (Loparev et al., 2007) e citomegalovírus humano (Sowmya e Madhavan, 2010). São técnicas simples e de fácil implantação em laboratórios de biologia molecular e importantes em estudos epidemiológicos.

A genotipagem do SuHV-1 permite entender melhor sua epidemiologia, e, portanto, melhor estudar os impactos causados por esse agente infeccioso ou até evitar os mesmos. As técnicas moleculares já foram utilizadas para se verificar a introdução de novos genótipos em um país (Christensen e Soerensen, 1988), a caracterização de isolados como derivados de amostras vacinas (Christensen et al., 1992) e até isolados provenientes animais selvagens como javalis (Müller et al., 2010). PCR-*BamHI* é um método rápido e prático de

genotipagem que permitirá comparar os resultados com dados publicados nos últimos vinte e cinco anos, desde o início da utilização da RFLP-*BamHI*.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à EMBRAPA Suínos e Aves e ao IPVDF pela doação dos isolados. Esse trabalho foi financiado pelo INCT e pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento.

Capítulo 7: GENOTIPAGEM E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO HERPESVÍRUS SUÍDEO 1 POR SEQUENCIAMENTO PARCIAL DE *UL44*

Fonseca Jr., A. A.¹, Heinemann, M. B.², Leite, R. C.², Reis, J. K. P.²

¹LANAGRO/MG

²Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais

Publicações relacionadas:

Fonseca AA Jr, Camargos, M. F., Sales, M. L., Heinemann MB, Leite RC, Reis JK. *In Silico* Analysis of Partial Glycoprotein C Sequences of Pseudorabies Virus. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 43, n. 4, 2012.

Fonseca AA Jr, Heinemann MB, Leite RC, Reis JK. A comparative analysis of envelope and tegument proteins of suid herpesvirus 1, bovine herpesvirus 1 and bovine herpesvirus 5. *Arch Virol*. 2010 Oct;155(10):1687-92.

RESUMO

O herpesvírus suídeo 1 (SuHV-1) é o agente causador da pseudorraiva, também conhecida como doença de Aujeszky, uma enfermidade de alta relevância na suinocultura tanto pelos elevados prejuízos que causa na cadeia produtiva quanto por barreiras sanitárias. O objetivo desse trabalho é determinar um método para genotipagem do SuHV-1 a partir de sequências parciais do gene codificante da glicoproteína C e as prováveis razões da variabilidade da região. As sequências coletadas no GenBank foram divididas em cinco grandes grupos após a reconstrução da filogenia pelo método bayesiano. A porção seqüenciada está sobre forte pressão seletiva em diversos pontos que coincidem com regiões de desordem protéica.

INTRODUÇÃO

O *Suid Herpesvirus 1* (SuHV-1) é o agente causador da doença de Aujeszky (DA), também conhecida como pseudorraiva (PR), uma enfermidade de alta relevância na suinocultura tanto pelos elevados prejuízos que causa na cadeia produtiva quanto por barreiras sanitárias. A PR está listada entre as principais enfermidades de suínos no *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals* da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE, 2009) O SuHV-1 é um membro da família ***Herpesviridae***, subfamília

Alphaherpesvirinae e possui apenas um sorotipo. O hospedeiro natural desse vírus é o porco, no entanto, ele ainda pode infectar outros animais domésticos como cães e bovinos, nos quais causa encefalite e apresenta quase 100% de letalidade (Mettenleiter et al., 2000).

O SuHV-1 não pode ser classificado sorologicamente, porém existem diferentes genótipos do SuHV-1 identificados pela análise por endonucleases de restrição. O principal método de genotipagem é realizado por método análise de polimorfismos de fragmentos de restrição (RFLP) com a enzima *BamHI*, sendo capaz de separar o SuHV-1 em quatro genótipos e cerca de 11 sub-tipos. Os genótipos I e II estão distribuídos mundialmente e os genótipos III e IV estiveram restritos à Dinamarca e Tailândia, respectivamente, e não foram mais relatados (Christensen, 1995).

Ainda que a genotipagem por RFLP seja utilizada, trabalhos mais recentes realizados no Brasil, Estados Unidos e Europa caracterizaram molecularmente o SuHV-1 baseando-se no seqüenciamento parcial da *UL44*, mais precisamente da porção codificante da região N-terminal da glicoproteína C (Goldberg et al., 2001; Fonseca Jr. et al., 2010, Müller et al., 2010; Hahn et al., 2010). Essas pesquisas encontraram um alto grau de conservação entre as sequências e não indicaram uma correlação entre a localização e os grupos

formados nas árvores filogenéticas. Outra característica comum, é que a maioria dos trabalhos está restrita ao estudo de grupos e variação genética em territórios específicos.

A epidemiologia molecular é uma ferramenta fundamental para a compreensão da epidemiologia do vírus. Foi utilizada para análise de focos em áreas de elevada produção de suínos ocorridos entre 1983 e 2003 no Brasil (Fonseca Jr. et al., 2010) e em 1989 nos Estados Unidos (Goldberg et al., 2001). Outra análise relevante é o perfil genético das estirpes circulantes em javalis ou porcos selvagens (Müller et al., 2010, Hahan et al., 2010). Os trabalhos realizados nos Estados Unidos também pesquisaram a possibilidade de difusão de amostras vacinais em suínos selvagens (Hahan et al., 2010).

Essas importantes análises ainda podem trabalhar com outras ferramentas para melhor aproveitamento dos dados. O método de Neighbor-Joining (NJ) foi utilizado para a construção das árvores em todos os trabalhos, no entanto, apesar da rapidez com que processa as informações, tem certas limitações como a perda das informações por comprimir as sequências em distância e dificuldade de se encontrar valores de distância confiáveis quando existem sequências muito divergentes (Saitou e Nei, 1987). Houve também pouco aproveitamento das sequências atuais disponíveis no GenBank assim como pesquisas sobre os poliformismos encontrados.

O objetivo desse trabalho é analisar os dados de sequências de isolados de SuHV-1 de diversas partes do mundo e compreender a origem de suas mutações a partir de ferramentas de bioinformática.

MATERIAL E MÉTODOS

Sequências

Foram coletadas sequências parciais ou completas da *UL44* no GenBank. Todas as sequências foram analisadas em trabalhos

anteriores (Goldberg et al., 2001; Fonseca Jr. et al., 2010, Müller et al., 2010; Hahn et al., 2010), com exceção das sequências provenientes da China, Coréia do Sul e Malásia. Além dessas, foram adicionadas sequências de mais 12 amostras de SuHV-1 de focos ocorridos entre 2002 e 2003 no Estado de Santa Catarina no Brasil. Todas foram sequenciadas conforme os trabalhos anteriormente citados.

As 106 sequências foram nomeadas conforme o nome do isolado no GenBank, seguido de um código de três letras para identificação do país: Alemanha (GER), Brasil (BRA), China (CHI), Coréia do Norte (SKO), Eslováquia (SLK), Espanha (ESP), Estados Unidos (USA), Japão (JAP), Hungria (HUN), Irlanda do Norte (NIR), Malásia (MAL). Além dessas, estão presentes duas sequências da amostra vacinal Bartha, uma proveniente do Brasil e outra da China.

Reconstrução Filogenética

As sequências agrupadas foram submetidas a três programas para reconstrução das árvores filogenéticas. O programa MEGA 4.0 foi utilizado para reconstruir a filogenia por Neighbor Joining (modelo Maximum Composite Likelihood) com 1000 réplicas de bootstrap (Tamura et al., 2007). A escolha do melhor modelo para a reconstrução das árvores foi realizada no programa jModelTest, sendo o modelo escolhido TnR93 com distribuição gamma, seis categorias e otimização das frequências de substituição (Posada, 2010).

Após a escolha do modelo, a reconstrução da filogenia a partir do método de Maximum Likelihood (ML) foi realizada a partir do programa Seaview (Gouy et al., 2010). Parâmetros gerados no ModelTest também foram incluídos no programa MrBayes para se gerar as árvores a partir do método bayesiano (BA) (Huelsenbeck e Ronquist, 2001).

Reconstrução da Epidemiologia Molecular de Amostras Brasileiras

Além da reconstrução das árvores acima, outro tipo de análise foi realizada. As amostras brasileiras foram escolhidas para se traçar o histórico da entrada do SuHV-1 no país. A escolha se deu devido ao maior conhecimento do nosso grupo sobre os isolados e a história da DA no Brasil. Todas as amostras brasileiras, além de sequências de isolados de cada grupo identificado nos testes anteriores foram submetidas ao programa Beast com os modelos definidos pelo jModelTest (Drummond e Rambaut, 2007).

Análise das Mutações da Sequência de Aminoácido

Duas análises foram realizadas para se examinar a evolução das sequências traduzidas. Grupos de sequências foram submetidas ao programa Selecton para análise de pressões seletivas (Stern et al., 2007). A análise dos códons foi realizada no programa Tracer (Drummond e Rambaut, 2007).

A sequência padrão de gC disponível no GenBank foi submetida ao programa PONDR VL3 (Radivojac et al., 2003) e PONDR VL-XT (Li et al., 1999), FoldIndex (Prilusky et al., 2005), GloPlot (Linding et al., 2003) e RONN (Yang et al., 2005) para análise das regiões de desordem protéica. As sequências estudadas nesse trabalho

foram então alinhadas para se verificar a incidência das mutações nas regiões de desordem.

RESULTADOS

Reconstrução Filogenética

Os resultados das análises filogenéticas apresentaram discrepâncias principalmente quanto às amostras mais distantes (Figuras 1, 2 e 3). Algumas amostras orientais apresentaram-se mais distantes, praticamente como a raiz da árvore ao se utilizar em NJ, no entanto posicionaram-se próximas a um grupo de isolados europeus em ML e BA. Outra posição peculiar foi a de IB341BRA, semelhante em NJ e BA, porém diferente em ML. Duas sequências da amostra vacinal Bartha, BarthaBRA e BarthaCHI, agruparam-se em posições muito distantes. A primeira manteve-se junto a um grupo de amostras européias e a segunda juntamente com amostras chinesas.

As análises por ML e BA formaram cinco grandes grupos suportados por altos valores de bootstrap e credibilidade (Fig. 1). Os mesmos não foram tão nitidamente visíveis em NJ. Os grupos foram nomeados como A, B, C, D e E sendo caracterizados principalmente por um hotspot entre os resíduos 184 e 195. As sequências originárias de vírus isolados na Europa foram distribuídas em todos os grupos.

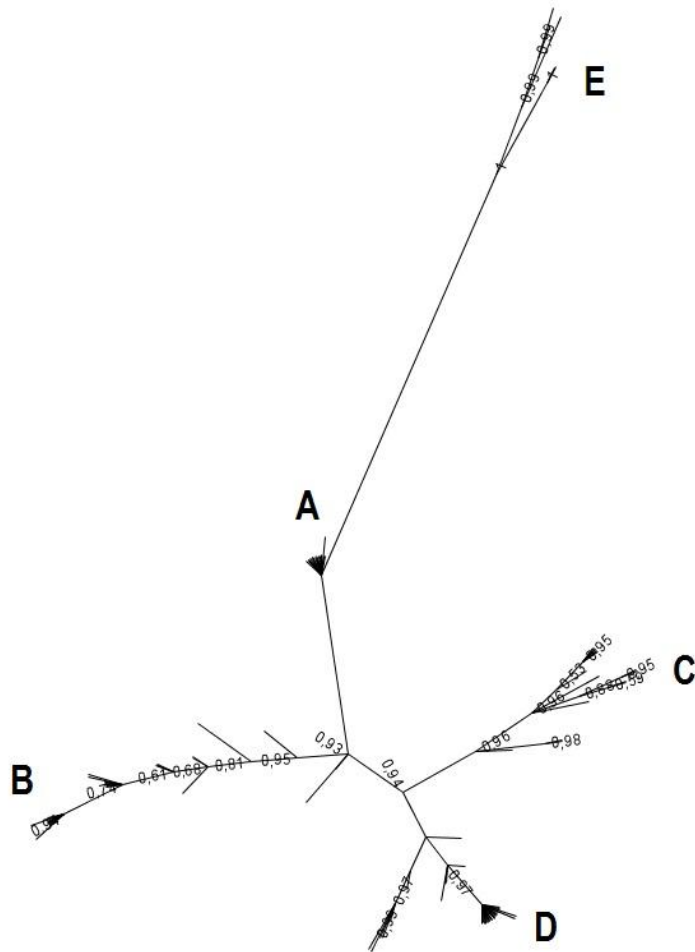


Figura 1: Árvore filogenética reconstruída a partir do método bayesiano. Os resultados indicam a distribuição das amostras em cinco grandes grupos denominados A, B, C, D e E com altos valores estatísticos que suportam essa classificação.

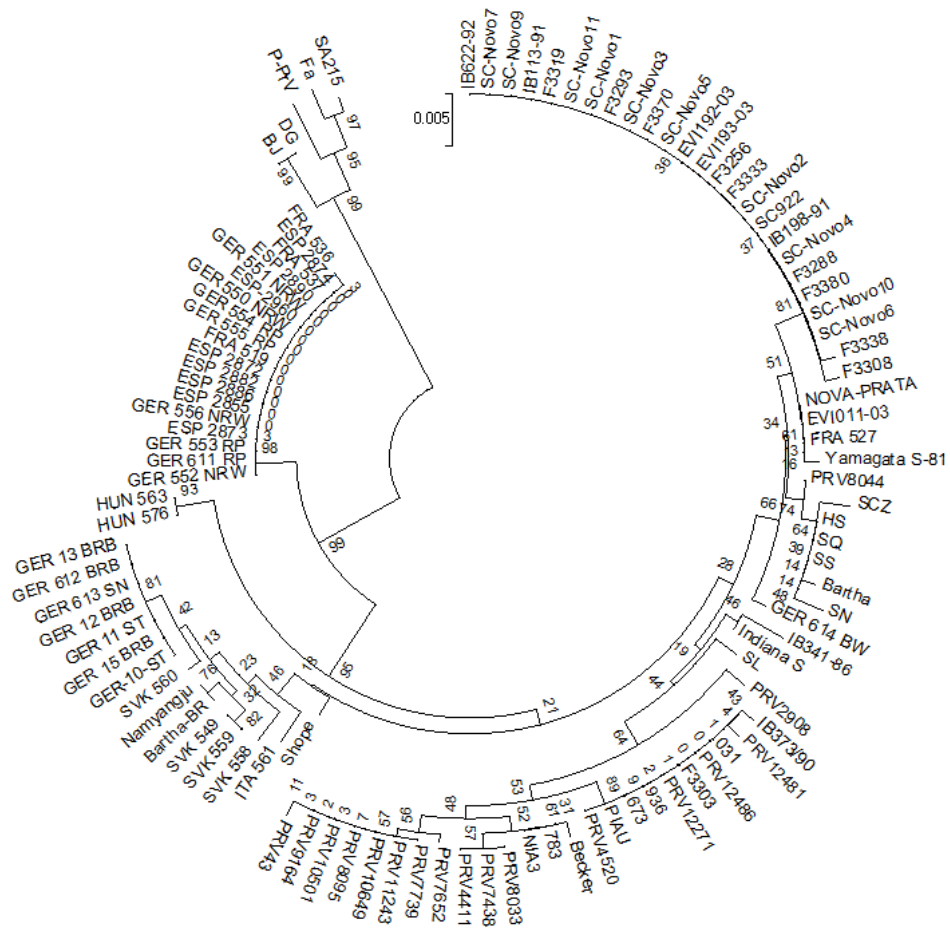


Figura 2: Árvore filogenética do SuHV-1 gerada a partir de seqüências parciais do gene *ul44* com o método de *Neighbor-Joining* no programa MEGA 4.0.

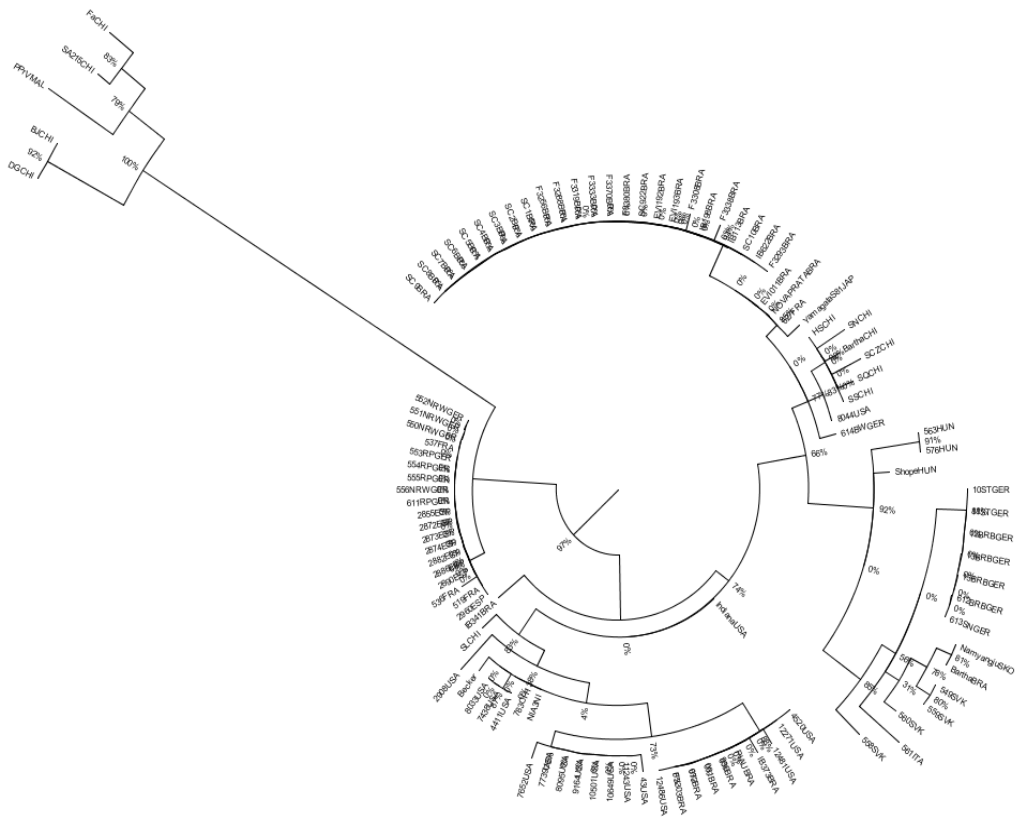


Figura 3: Árvore filogenética do SuHV-1 gerada a partir de seqüências parciais do gene *ul44* com o método de Máxima Verosimilhança no programa Seaview.

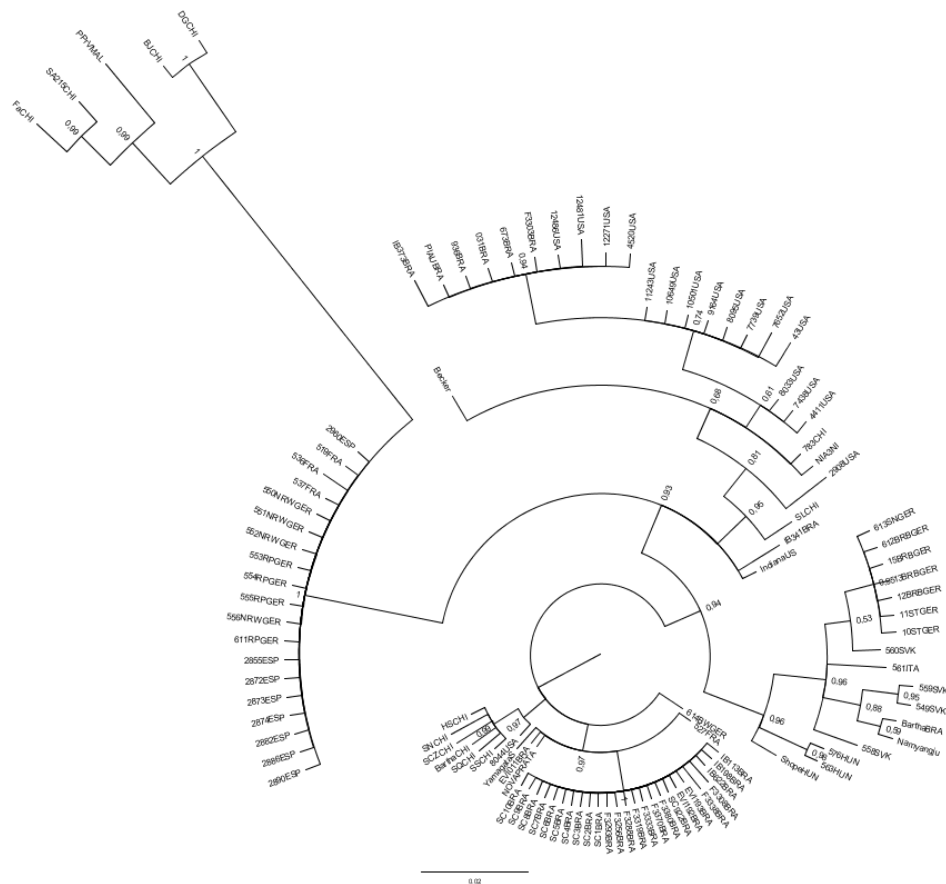


Figura 4: Árvore filogenética do SuHV-1 gerada a partir de sequências parciais do gene *ul44* com o método bayesiano no programa Mr. Bayes.

Reconstrução da Epidemiologia Molecular de Amostras Brasileiras

Os resultados das pesquisas com as amostras brasileiras permitiram estimar o tempo de divergência em anos em relação aos outros países. A distância calculada entre o último ancestral comum entre os isolados do grupo de maior prevalência no

Brasil (D) e um isolado europeu mais recente (614BWGER2008) foi de cerca de cem anos (Fig. 5). Outras amostras brasileiras localizadas no grupo B e isoladas na década de 80 ocorrem a partir de uma segunda introdução no Brasil, o que se nota pelo grau de divergência e a distância de cerca de quatrocentos anos entre o último ancestral comum dos grupos B e D.

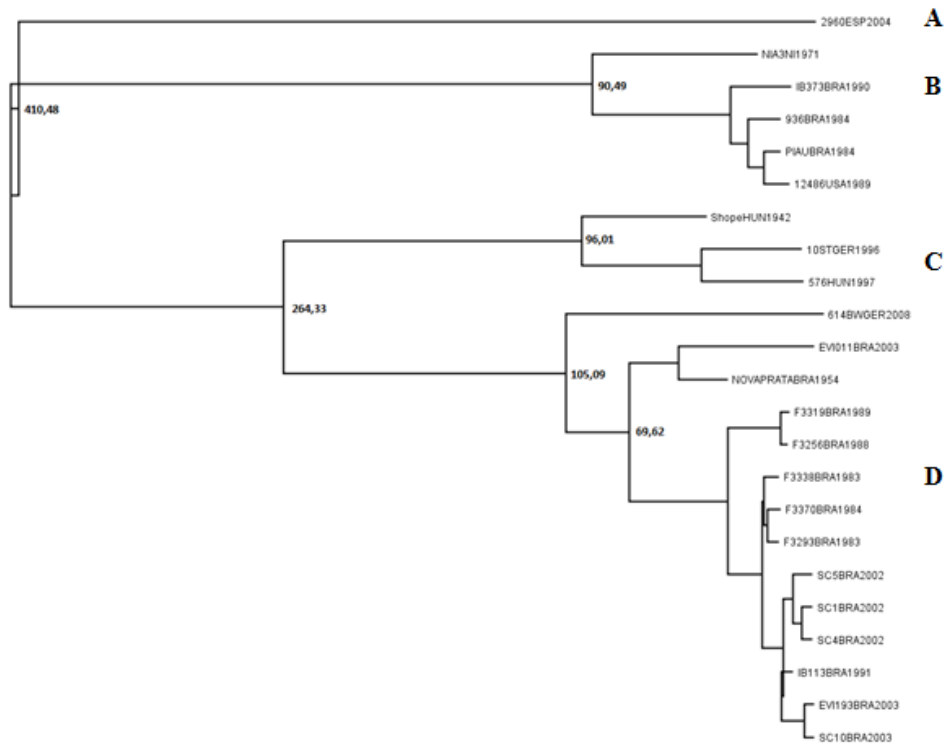


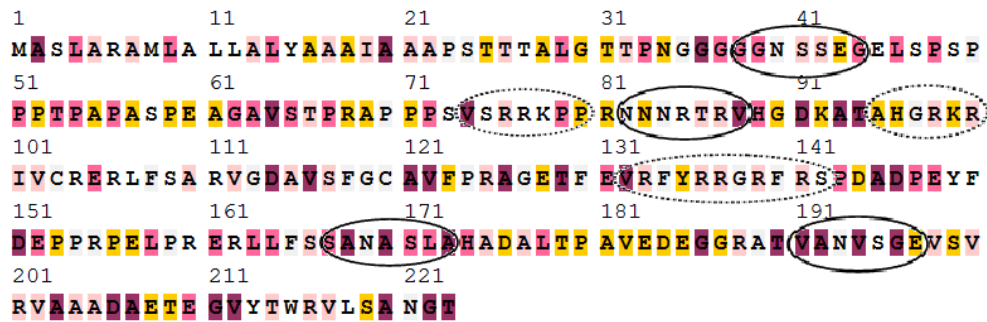
Figura 5: Árvore distância por anos. Os valores nos nós da árvore representam a distância em anos em relação à amostra mais recente, 614BWGER, isolada em 2008.

Análise das Mutações da Sequência de Aminoácido

As análises geradas pelos programas Selecton e Tracer indicam que a região está sobre pressão seletiva positiva. Os resultados primeiro demonstraram os principais pontos de pressão positiva, purificadora ou neutra (Fig. 6). A análise dos códons com Tracer indicam um alto grau de

mutações no segundo nucleotídeo, confirmando os resultados.

Todos os programas usados na análise de predição de desordem indicaram alto grau de desordem protéica na porção N-terminal de gC. A maior parte das mutações encontradas nessa região estava em áreas indicadas como desordenadas por PONDR VL3, PONDR VLTX e RONN (Figura 7).



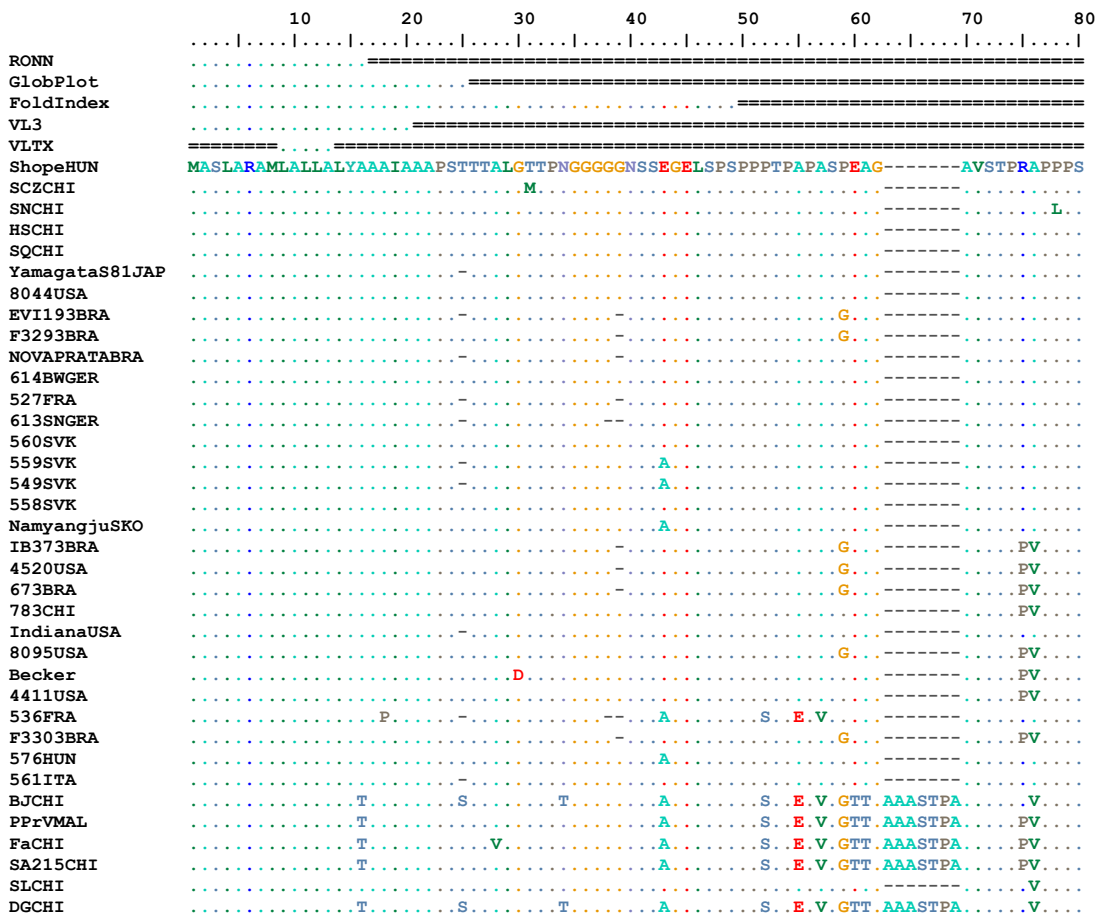
Legend:

The selection scale:



Positive selection Purifying selection

Figura 6: Resultados do programa Selecton para a região N-terminal de gC. As cores na escala indicam os pontos de pressão seletiva positiva, neutra ou purificadora. Os valores para pressão seletiva neutra não estão destacados sendo considerados por volta de 4. Os sítios de N-glicosilação estão marcados com linhas sólidas e os HBDs com linhas tracejadas. Essas regiões foram consideradas altamente conservadas com substituições de aminoácidos encontradas apenas no grupo E. O hot spot localizado entre os resíduos 175 e 185 são aparsentados como uma região sob pressão seletiva positiva.



	90	100	110	120	130	140	150	160	
RONN	=====								
GlobPlot	=====								
FoldIndex	=====								
VL3	=====								
VLTX	=====								
ShopeHUN	VSRRKPPRRNNNRTRVHGDKATAHGKRKRVCRERLFSARVGDVAVSFGCAVFPRAGETFEVRFYRRGRFRSPDADPEYFDEP								
SCZCHIE.....A.....								
SNCHIE.....A.....								
HSCHIE.....A.....								
SQCHIE.....A.....								
YamagataS81JAPG.....								
8044USAE.....								
EVI193BRA								
F3293BRA								
NOVAPRATABRA								
614BWGER								
527FRA								
613SNGER								
560SVK								
559SVK								
549SVK								
558SVKL								
NamyangjuSKO								
IB373BRA								
4520USA								
673BRA								
783CHI								
IndianaUSA								
8095USAG.....								
Becker								
4411USAG.....								
536FRA								
F3303BRA								
576HUN								
561ITAS.....								
BJCHI	...Q.G...E.S...V...C...								
PPrVMAL	...Q.G...S...V...								
FaCHI	...Q.G...R.SR...V...								
SA215CHI	...QW.G...R.S...V...								
SLCHI								
DGCHI	...Q.G...E.S...V...C...								

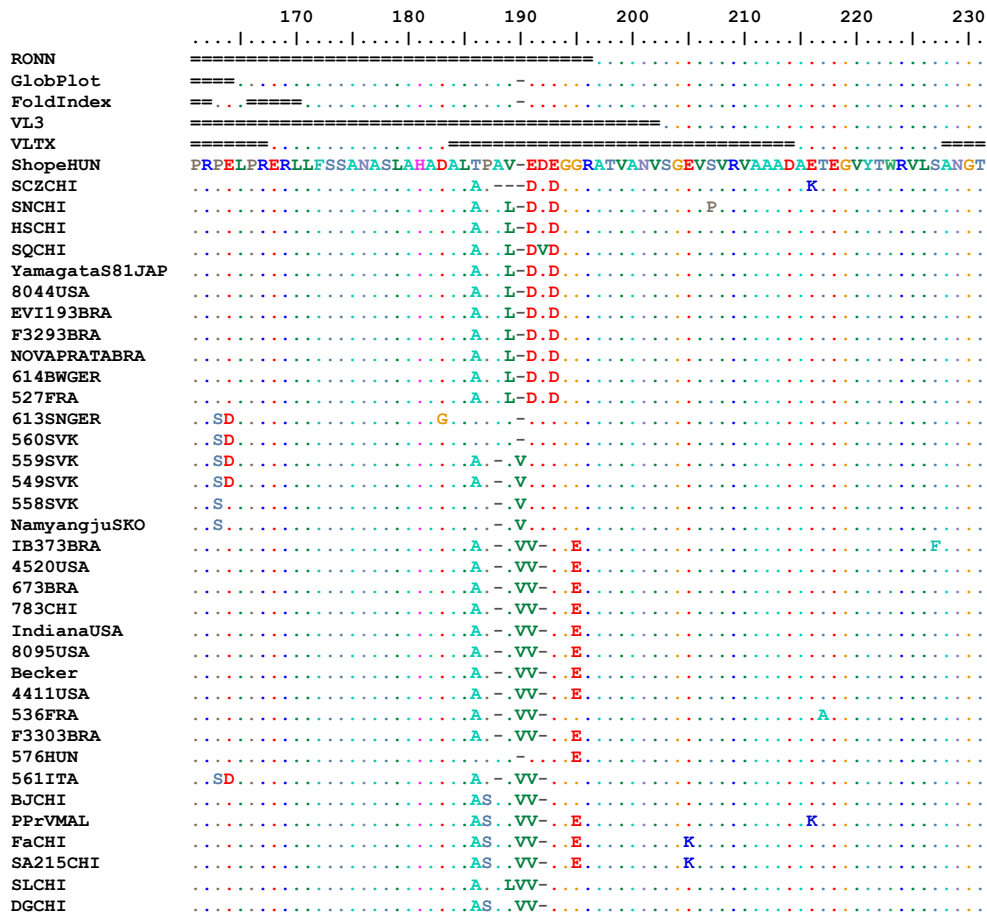


Figura 7: Regiões de desordem protéica detectadas nos programas RONN, GlobProt, FoldIndex, VL3 e VLTX na porção N-terminal da glicoproteína C do SuHV-1. A figura apresenta o alinhamento de sequências dos principais grupos de SuHV-1 de acordo com as árvores filogenéticas geradas no capítulo 7. As regiões tracejadas após os nomes dos programas demonstram os pontos de desordem protéica. A sequência padrão Shope foi utilizada como referência no alinhamento. Todos os pontos abaixo de cada coluna representam aminoácidos idênticos nas outras sequências. Quando há diferenças entre os aminoácidos em determinada coluna ou a ausência ou inserção de outros, representa-se pelos símbolos padronizados na bioinformática.

DISCUSSÃO

A análise comparativa de sequências é uma ferramenta de elevada importância na microbiologia. Suas aplicações podem fornecer desde dados sobre função de genes e proteínas a relações filogenéticas entre microrganismos. Uma das ferramentas utilizadas nessa área é a aplicação da comparação de sequências para se determinar a epidemiologia molecular dos

microrganismos. Esses trabalhos já foram realizadas tanto na medicina humana com vírus como varicella-zoster vírus (Wagenaar et al., 2003), vírus da dengue (Schreiber et al., 2009) quanto na medicina veterinária com vírus da leucemia bovina (Camargos et al., 2007) e herpesvírus bovino 1 e 5 (Esteves et al., 2008). As pesquisas com o SuHV-1 foram úteis para o entendimento da epidemiologia do vírus tanto nos focos em

animais de produção quanto em animais selvagens.

Publicações mais recentes utilizaram NJ para reconstruções da árvore a partir de amostras muito filogeneticamente próximas. Talvez esse não seja, entretanto, o melhor método a ser utilizado nesse tipo de estudo como indicam os resultados encontrados nesse trabalho. A árvore reconstruída em NJ não conseguiu separar os grupos B e D, além de posicioná-los em locais diferentes daqueles observados nos métodos ML e BA. Essas características podem estar relacionadas com o alto grau de divergência, no primeiro caso, e a alta similaridade, no segundo. As mais prováveis explicações são a dificuldade de NJ em estimar distâncias confiáveis para sequências muito divergentes e a perda de informações ao comprimir as sequências em distância (Holder e Lewis, 2003).

ML e BA apresentaram árvores mais semelhantes e com a divisão em cinco grupos distintos com altos valores de confiança. BA foi escolhido aqui como referência para as análises devido aos altos valores de credibilidade e a versatilidade do método ao permitir análises mais aprofundadas. Esse mesmo método também já foi utilizado para a definição de genótipos em outros vírus como vírus da leucemia bovina (Rodriguez et al., 2009) e vírus da febre amarela (de Souza et al., 2010)

Os grupos não apresentaram distribuição por região ou país. Tais agrupamentos são, no entanto, resultados consistentes e as discrepâncias nas localizações das amostras podem ser tomadas como evidências de diferentes introduções do SuHV-1 em um país ou região. As sequências norte-americanas agruparam-se em somente um grupo, desde a de isolamento mais antigo Indiana até as mais recentes (Golberg et al., 2001). As amostras européias apareceram em todos os grupos. A alta divergência talvez se deva a uma presença mais antiga do vírus nesse continente do que nos outros locais. As sequências do leste europeu apresentaram o mesmo resultado com a amostra padrão

Shope, isolada na Hungria em 1942, no grupo B juntamente com isolados húngaros e eslováquios mais recentes. Um terceiro exemplo desse perfil é o das amostras brasileiras com o isolado mais antigo (Nova Prata, 1954) ainda no mesmo grupo predominante e epidemiologicamente relacionado (Fonseca Jr. et al., 2010).

Devido ao alto grau de conservação do vírus, amostras isoladas em anos próximos tendem a ser filogeneticamente muito próximas ou ter sequências idênticas, como ocorreu nos agrupamentos formados na Espanha e no Brasil. Distâncias filogeneticamente maiores sugerem novas introduções do vírus na região ou focos não relacionados. A definição de grupos genéticos e o melhor aproveitamento das informações pelo BA é importante para caracterização do vírus e como ferramenta auxiliar na epidemiologia do SuHV-1.

Dentre os agrupamentos relacionados, percebe-se uma característica incomum no grupo D. Localizam-se ali isolados de vacas e cães dos Estados Unidos, Brasil, França e Alemanha. Apesar de isolados desses animais não se agruparem exclusivamente em D, é interessante notar o comportamento dessas sequências na construção de todas as árvores e o fato de elas serem destacadas na discussão dos artigos em que são caracterizadas (Golberg et al., 2001, Hahn et al., 2010, Müller et al., 2010). Dentre as características peculiares encontradas nesses trabalhos, destacam-se algumas. O isolado norte-americano 8044 pode estar relacionado com uma amostra vacinal (Hahan et al., 2010). O isolado francês 527 tem características genômicas dos genótipos I e II de acordo com o perfil de restrição enzimática do genoma completo por *Bam*HI (Müller et al., 2010), o que é sugestivo de recombinação, fato também ocorrido com a amostra japonesa Yamagata S81 (Christensen, 1995).

Golberg et al. (2001) sugere que as características de amostras posicionadas como do grupo D nesse trabalho seriam adaptações de hospedeiro. Trabalhos com outros herpesvírus não conseguiram encontrar mutações específicas de

transmissão entre espécies (Pagamjav et al., 2007). As próprias características do SuHV-1 ao infectar cães e vacas não sugerem essas adaptações devido ao fato de serem hospedeiros terminais em processo de infecção rápido e quase sempre fatal. Essas características, aliadas à evolução lenta do vírus, indicam que o grupo D é formado por amostras atípicas, porém que não são frutos de adaptação a um hospedeiro.

Quase todas as amostras brasileiras isoladas entre 1954 e 2003, antes da implantação dos planos de erradicação, na principal área produtora de suínos do país foram localizadas no grupo D. Os resultados das análises são indicativo de um efeito fundador, em que uma estirpe atípica do SuHV-1 teria divergido das estirpes européias há cerca de cem anos e se disseminado pelo Brasil. Os primeiros relatos da DA no país datam de 1908-1912 nessa mesma área, concordando com as pesquisas realizadas nesse trabalho. Esses resultados não indicam que esse tenha sido o primeiro foco da enfermidade no Brasil, mas que o ancestral comum mais recente detectado pela análise tenha existido por volta dessa data (Kühnert et al., 2011). Esse período também coincide com o auge das imigrações européias para o sul do país (Agnanini e Souto Maior, 1977, p. 152).

As sequências de duas amostras vacinais Bartha disponíveis no GenBank localizaram-se em diferentes grupos provavelmente devido à origem diferente. A sequência

originária da China agrupou-se com 8044, uma amostra americana muito semelhante à estirpe vacina Norden (Hahn et al., 2010).

A porção inicial de *u144* evolui rapidamente no SuHV-1. A principal razão para esse fenômeno é a pressão seletiva positiva por dois possíveis fatores. O primeiro seria a pressão do sistema imune sobre gC (Ishkawa et al., 1994). Outro seria o alto grau de flexibilidade da proteína como encontrado nas análises de regiões de desordem protéica. Regiões de desordem em proteínas são aquelas que não possuem uma estrutura terciária fixa. RD são consideradas regiões de evolução mais rápida do que as regiões estruturadas (Brown et al., 2002). Os motivos para essa diferença ainda não são bem compreendidos, mas certamente não estão relacionados com a ausência de função. Há evidências que regiões protéicas desestruturadas estão sob seleção para aumento da variabilidade (Yang e Bielawski, 2000). Evidências sobre esse fenômeno já foram encontradas na evolução dos herpesvírus (Fonseca Jr. et al., 2010b).

Os resultados encontrados nesse trabalho sugerem que a utilização do método bayseano para reconstrução filogenética da porção codificante da região N-terminal de gC é uma ferramenta útil para as análises moleculares e estudos epidemiológicos que permitam comparar resultados de diversos trabalhos. Foi possível, também, compreender melhor as razões para a alta variabilidade das sequências.

Capítulo 8: FILODINÂMICA DO VÍRUS DA DOENÇA DE AUJESZKY

Fonseca Jr., A. A.¹, Sales, E. B.¹, Heineman, M. B.², Reis, J. K. P.²

¹ Laboratório de Biologia Molecular, LANAGRO/MG, Pedro Leopoldo, Brasil

² Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil

RESUMO

O vírus da pseudorraiva é o agente causador de uma das enfermidades de grande impacto na suinocultura. Os principais hospedeiros do SuHV-1 são os suínos (*Sus scrofa*), domésticos ou selvagens. O objetivo desse estudo foi utilizar sequenciamentos completos e parciais de genes do SuHV-1 para analisar a evolução e dinâmica do vírus isolados em diferentes períodos e ou hospedeiros. Os genes estudados foram *us6*, *us7*, *us8*, *us9*, *ul14*, *ul44*, *ul49.5* provenientes de sequências de isolados de várias partes do mundo. As árvores filogenéticas reconstruídas utilizando-se os programas Mr. Bayes, MEGA 5.0 e Seaview após análise no programa jModelTest para avaliação dos modelos filogenéticos a serem utilizados. Outras análises foram realizadas com sequências parciais de *ul44*, devido ao fato de haver maior quantidade de sequências e informações sobre esse gene nos bancos de dados. O programa Splitstree 4.0 foi usado para gerar redes filogenéticas e o programa Beast para gerar dados sobre a filogeografia. As árvores geradas apresentaram resoluções variadas, mas comprovaram a distância genética entre isolados ocidentais e orientais. As sequências de *ul44* derivadas de suínos domésticos e selvagens apresentaram separação dos ramos das árvores e pressões seletivas diferentes de acordo com o hospedeiro. Esses dados demonstram que a evolução desse herpesvírus é complexa e dependente de sua interação com o hospedeiro.

INTRODUÇÃO

O vírus da pseudorraiva é o agente causador de uma das enfermidades de grande impacto na suinocultura. O *Suid*

Herpesvirus 1 (SuHV-1) é classificado como um membro da família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*, é um vírus DNA de fita dupla de evolução lenta (Fauquet et al., 2005). Os principais hospedeiros do SuHV-1 são os suínos (*Sus scrofa*). Os suínos domésticos são muito suscetíveis à infecção e tem sinais clínicos variados de acordo com a idade. Há um alto índice de mortalidade em animais jovens devido a sinais neurológicos, no entanto em indivíduos mais velhos a mortalidade é reduzida e os principais sinais clínicos são respiratórios e ou reprodutivos (Pomeranz et al., 2005). Devido a capacidade de gerar infecção latente, o SuHV-1 pode se manter no rebanho gerando novos focos da doença mesmo depois de longos períodos sem manifestações clínicas (Romero et al., 2003).

O combate intensivo à pseudorraiva nos últimos vinte anos levou à erradicação da enfermidade nos rebanhos comerciais de suínos em diversos países como Estados Unidos, Alemanha e Inglaterra (OIE, 2011). Outros países como Brasil já possuem programas avançados e poucos relatos de detecção da enfermidade (Dambros, 2007). Com o avanço dos programas sanitários, um dos problemas atuais é a presença do SuHV-1 em javalis ou suínos selvagens. A enfermidade já foi detectada nesses animais em países como Alemanha, França, Espanha, Japão, Estados Unidos e Brasil, seja por meios moleculares ou sorologia (Cunha et al., 2006, Hahn et al., 2010, Muller et al., 2010, Mahmoud et al., 2011).

Estudos sobre a evolução do SuHV-1 têm comparado sua virulência e características genéticas de acordo com o isolamento em diferentes anos ou hospedeiros. Vírus isolados de suínos domésticos em diferentes períodos demonstraram

características de replicação e de infecção diferentes (Glorieux et al., 2009). Infecção experimental de animais domésticos com SuHV-1 derivado de javalis não foi capaz de reproduzir a enfermidade, demonstrando a baixa virulência dessas amostras (Muller et al., 2001). As características genéticas também variam de acordo com o período de isolamento ou hospedeiro (Muller et al., 1998).

Os estudos iniciais de variação genética do SuHV-1 basearam-se na restrição completa do genoma por *BamHI*, demonstrando a presença de quatro tipos genômicos (Herman et al., 1984, Christensen, 1995, Fonseca Jr. et al., 2011). Estudos mais recentes tem utilizado o sequenciamento, principalmente da região *UL44*, que codifica a glicoproteína C (Goldberg et al., 2001, Fonseca Jr. et al., 2010, Hahn et al., 2010, Muller et al., 2010). A vantagem do sequenciamento é que permite vários tipos de análise, como a filodinâmica, que é o estudo de como as mutações virais são afetadas por fatores como imunidade do hospedeiro, transmissão e dinâmicas de epidemias

O objetivo desse estudo foi utilizar sequenciamentos completos e parciais de genes do SuHV-1 para analisar a evolução e dinâmica do vírus isolados em diferentes períodos e ou hospedeiros.

MATERIAL E MÉTODOS

Sequências

Sequências parciais e completas de genes codificadores proteínas do SuHV-1 foram

coletadas no GenBank (Tabela 1) com o maior número possível de informações disponíveis sobre hospedeiro, ano e país de isolamento (Ishkawa et al., 1996, Golberg et al., 2001, Glorieux et al., 2009., Fonseca Jr. et al., 2010, Müller et al., 2010, Serena et al., 2011, Steinrigl et al., 2012). As sequências foram nomeadas conforme o nome do isolado no GenBank, seguido de um código de três letras para identificação do país: Alemanha (GER), Argentina (ARG), Áustria (AUS), Brasil (BRA), China (CHI), Coreia do Norte (SKO), Eslováquia (SLK), Espanha (ESP), Estados Unidos (USA), Japão (JAP), Hungria (HUN), Irlanda do Norte (NIR), Malásia (MAL), Suécia (SWE).

Sequenciamento

Os genes *us9*, *ul14* e *ul49.5* de isolados brasileiros e da estirpe padrão Shope foram sequenciados para a utilização de outras porções do genoma. Cada reação de 20 µL foi composta pelos seguintes reagentes: DMSO 8%, DNTP 200 mmol/L, 20 pmol de cada primer, MgCl₂ 1.5 mmol/L, 0,2 U de Taq Jumpstart (Sigma, Estados Unidos), 4 µL de Tampão GoTaq Green 5x (Promega, Estados Unidos) e 2 µL de DNA. O termociclador foi programado com as seguintes etapas e tempo de ciclagem: 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 95°C por 50 seg., 57°C por 50 seg., 72°C por 50 seg. e um estágio final de extensão a 72°C por 5 minutos. Os resultados foram visualizados em gel de agarose 2,0% corado com brometo de etídeo após uma hora de corrida a 100 volts. Os produtos de PCR foram sequenciados no equipamento ABI3130 (Lifetech, EUA).

Tabela 1: Genes utilizados para as análises filogenéticas desse trabalho

Gene	Proteína	Função	Tipo	Quantidade	Tamanho (nucleotídeos)*	Posição*
<i>ul44</i>	gC	Adesão celular	Completa	24	1443	53019 - 54461
			Parcial	130	666	53019 - 53684
<i>us6</i>	gD	Ligação a receptores de superfície	Completa	16	1197	118873-120075
<i>us7</i>	gl	Difusão célula-célula	Completa	9	1086	120111-121193
			Parcial	10	676	120111-120786
<i>us8</i>	gE	Difusão célula-célula	Completa	22	1734	121297-123030
			Parcial	48	404	121945-122348
<i>us9</i>	11 kDa	Transporte axonal	Completa	19	321	123088-123384
<i>ul14</i>	ul14	Morfogênese viral	Completa	12	480	75946-76425
<i>ul49.5</i>	gN	Morfogênese viral, fusão de membrana	Completa	22	297	8840-9136

*Dados com referência ao genoma completo da estirpe Kaplan (JF797218).

Tabela 2: Iniciadores utilizados nesse trabalho para amplificação dos genes *us9*, *ul14* e *ul49.5* do SuHV-1

Gene	Iniciador	Amplicom (pb)
<i>us9</i>	F: GAGAAACCGGAAGTGACGAA	550
	R: GGGGCCCATTTATTGTGAC	
<i>ul14</i>	F: GCGATGGCAAAGTTGAAAAA	794
	R: GTCGAGGGTTCGCGTACTG	
<i>ul49.5</i>	F: CCCAGGGGAACCTTATAAAATC	447
	R: TTTCTCGAGCTGGACATGG	

Análise Filogenética

A análise filogenética foi testada conforme a complexidade da amostra. Os modelos evolutivos foram selecionados com o auxílio do programa computacional jModelTest (Posada, 2010). Os modelos e programas utilizados estão indicados na tabela 3.

Devido à quantidade e complexidade das sequências para *ul44* outros programas

foram empregados. O programa SplitsTree 4.0, para avaliação de recombinação e posições conflituosas na filogenia (Huson and Bryant, 2006), foi utilizado na análise deste conjunto de sequências. Todas os grupos de sequências foram submetidas a testes de recombinação no programa SimPlot (Lole et al., 1999). Para a análise de rede filogenéticas das sequências do gene *ul44* foram utilizados os programas foi utilizado DNAsP (Librado e Rozas, 2009) e Network (Bandelt et al., 1999).

Tabela 3: Modelos de substituição, reconstrução de árvore filogenética e programas utilizados para cada grupo de sequências estudadas nesse trabalho.

Gene	Tipo	Modelo de Substituição	Reconstrução da Árvore	Programa
<i>ul44</i>	Completa Parcial	GTR Γ 4+I	Bayesian Inference	Mr. Bayes ^a
<i>us6</i>	Completa	GTR	Maximum Likelihood	Seaview ^b
<i>us7</i>	Completa Parcial	HKY+ Γ	Maximum Likelihood	Seaview
<i>us8</i>	Completa Parcial	GTR+ Γ HKY	Maximum Likelihood Maximum Likelihood	Seaview Seaview
<i>us9</i>	Completa	F81	Neighbor Joining	MEGA 5.0 ^c
<i>ul14</i>	Completa	F81	Neighbor Joining	MEGA 5.0
<i>ul49.5</i>	Completa	TrN	Neighbor Joining	MEGA 5.0

^a Huelsenbeck e Ronquist, 2001 ^b Gouy et al., 2010 ^c Tamura et al., 2011

Filogeografia

Os testes de filogeografia foram realizados com as sequências parciais de *ul44*. Em três grupos separados conforme a origem, a partir de suínos domésticos (SD) do Brasil e dos Estados Unidos e de suínos selvagens (SS) da Europa. Após a seleção dos grupos, foram verificados os dados quanto à informação precisa do isolamento de cada estirpe. As análises de filogeografia foram então realizadas com um grupo de sequências brasileiras derivadas de focos em granjas das regiões Sul e Sudeste ocorridos entre 1983 e 2003 (Fonseca Jr. et al., 2010). A análise das sequências norte-americanas foi realizada de acordo com os dados descritos por Golberg et al. (2001), com amostras de focos em suínos, mas também em hospedeiros terminais do vírus como caninos, bovinos e ovinos. O segundo grupo estudado foi o de amostras de suínos selvagens da Europa (Muller et al., 2010).

As análises foram realizadas no programa Beast (Drummond e Rambaut, 2007) com os seguintes parâmetros: GTR Γ 4+I com cumprimento da MCMC de 5×10^9 com amostragem a cada 1000 estados com adaptações para análise de dados contínuos e discretos segundo Lemey et al. (2009). Os resultados foram então submetidos ao programa Spread para análise por *discrete tree*, *continuous tree* e *time slicer* (Bielejec et al., 2011).

Teste para Seleção Positiva

Os testes para seleção foram realizados no programa Selecton (Stern et al., 2007) com as populações DS e SS. As sequências DS foram submetidas ao programa em duas etapas, primeiramente com todas encontradas no banco de dados e depois sem as amostras chinesas. O teste com a exclusão destas últimas foi realizado devido ao alto grau de divergência com as amostras ocidentais.

O programa Selecton exige a escolha inicial de um modelo para teste da pressão seletiva. Caso seja indicada pressão seletiva positiva existe a opção automática de se escolher um segundo modelo estatístico para se verificar a significância dese resultado. O modelo evolutivo escolhido foi o M8 que considerada a seleção positiva possível. Os resultados foram submetidos a novos cálculos para testar a significância estatística, agora com o modelo M8a, que não permite a seleção positiva.

RESULTADOS

Análise Filogenética

A análise filogenética a partir de múltiplas sequências derivadas de diferentes regiões do genoma do SuHV-1 gerou árvores de perfis semelhantes com exceção do gene *us6*, único grupo de sequências positivas

para recombinação (Figuras 1, 2, 3). O tamanho menor das sequências parciais de *us8* gerou uma árvore com menor grau de diferenciação, talvez devido ao fato de a maior parte da variabilidade de gE estar localizada na porção inicial do gene. A maior parte das sequências parciais de *us8* disponíveis no Genbank compreendia a porção média do gene. Não houve diferença nas informações da árvore gerada em as sequências completas e parciais de *us7* a não ser os maiores valores de bootstrap. Alguns isolados agrupam-se em todas as árvores como as sequências húngaras (Kaplan e Shope) e as brasileiras. As amostras americanas Rice e Becker também apresentaram perfis semelhantes.

As sequências asiáticas apresentaram dois padrões, um geneticamente próximo das amostras ocidentais, distribuindo-se em subgrupos diferentes, mas próximos a um grupo de amostras atípicas encontradas com mais frequência no Brasil, mas também descritas nos Estados Unidos e Europa. O segundo é mais distante, comportando-se como uma raiz para todas as árvores reconstruídas neste trabalho (com exceção de *us6*). Nos dois casos, as sequências de origem asiática apresentaram um grau de variação maior do que o encontrado dentro de seus grupos.

Devido a existência de um grande número de sequências para o gene *ul44*, este gene foi utilizada para análises de redes filogenéticas além da reconstrução da tradicional árvore demonstrada em estudos evolutivos. A princípio, cogitou-se utilizar sequências parciais com 622 pares de base para a inclusão da amostra OK2010 dos Estados Unidos, derivada de SS, no entanto como existem polimorfismos em certos grupos de sequências como as brasileiras que estão localizadas após esse ponto, optou-se por excluir a amostra OK2010 e utilizar as sequências com 666 pb (Tabela 1). A comparação das árvores obtidas a partir das sequências completas do gene *ul44*, observou-se mudanças no posicionamento de algumas amostras e até de clados inteiros. (Figura 3).

A análise parcial de *ul44* a partir de redes filogenéticas revelou uma estrutura complexa de interação com algumas sequências em posicionamento fora dos grupos como IB341/90BRA, SLCHI, 561ITA, IndianaUSA e S66SWE. A localização delas pode mudar conforme o modelo de substituição ou de reconstrução da árvore utilizados. Mesmo que não haja evidência de recombinação segundo o programa SimPlot, a topologia da árvore pode ser questionada em alguns pontos, apesar dos agrupamentos permanecerem os mesmos (Figura 4).

Foi encontrado um total de 41 haplótipos para *ul44* quando a análise foi realizada com todas as sequências parciais, incluindo as vacinais. Quando as populações foram divididas, destacaram-se 10 haplótipos para SS, com distância genética geral de 0,013, e 19 para DS, com distância genética geral de 0,018. As amostras asiáticas, divididas em dois grupos, possuem quatro haplótipos (similares às amostras ocidentais) e cinco haplótipos (distantes das amostras ocidentais) (Figura 5). Boa parte das mutações encontradas envolve deleções/inserções de códons.

Houve diferenças entre os haplótipos SS e DS. As 34 sequências SS apresentaram 25 sítios polimórficos (com 25 mutações), sendo 10 desses monomórficos em DS. Dentre as 67 sequências DS, houve 33 sítios polimórficos (com 35 mutações), sendo 20 desses monomórficos em SS. Os dois grupos compartilharam 15 mutações. Esses são valores muito inferiores aos encontrados no grupo E (7 sequências), no qual ocorrem 22 sítios polimórficos.

A reconstrução da rede filogenética utilizando o programa Network demonstrou que, quando todas as sequências são utilizadas, aquelas derivadas da Europa concentram-se no centro, a partir do qual os ramos se estendem para a formação dos haplótipos DS (Figura 5). Mais uma vez, as amostras asiáticas apresentam o mesmo comportamento que nas árvores filogenéticas.

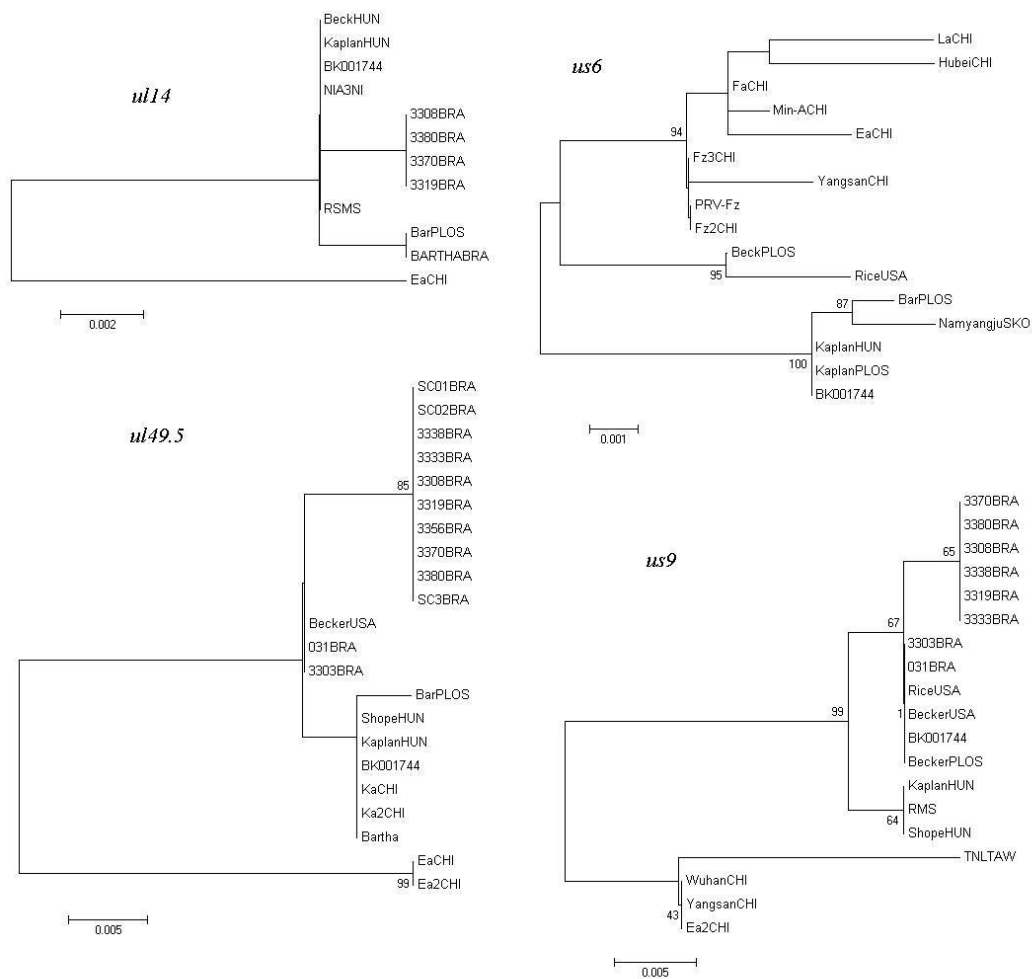


Figura 1: Árvores filogenéticas para os genes *ul14*, *ul49.5*, *us6* e *us9*. Os modelos utilizados na reconstrução de cada árvore estão listados na tabela 3. Apenas os valores de bootstrap acima de 70 são demonstrados. As topologias semelhantes com exceção daquela construída a partir de *us6*, um indicativo de sinais conflituosos na análise.

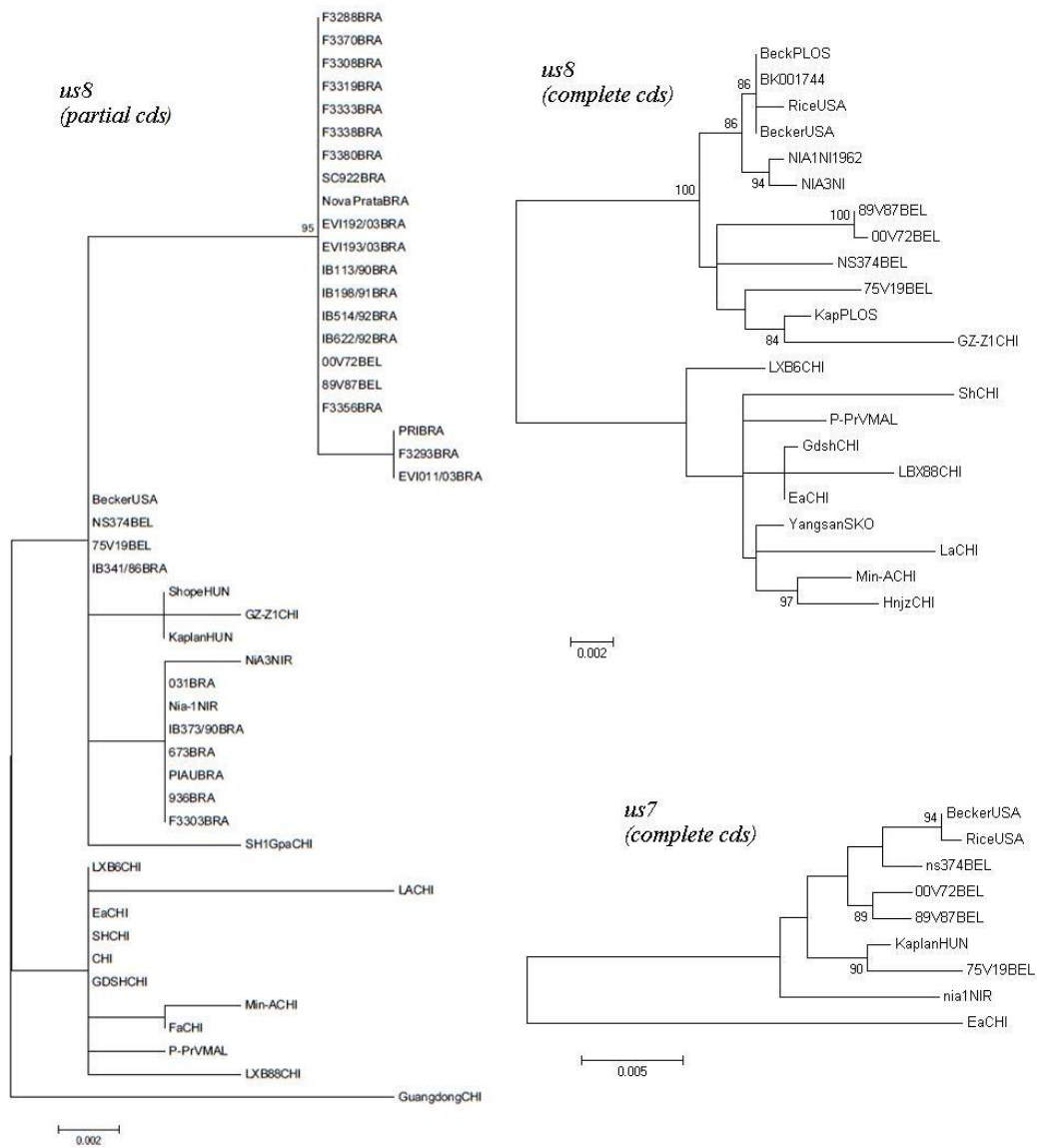


Figura 2: Árvore filogenéticas para os genes *us7* e *us8*. Os modelos utilizados na reconstrução de cada árvore estão listados na tabela 3. Apenas os valores de bootstrap acima de 70 são demonstrados.

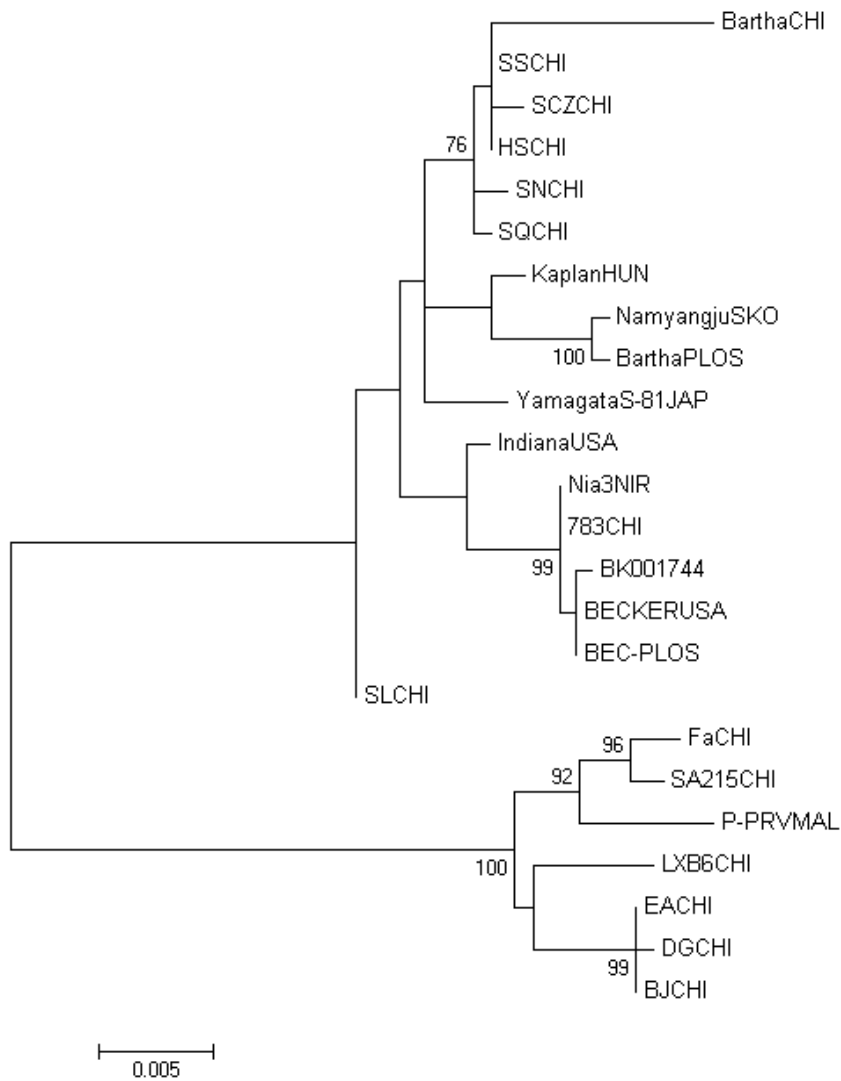


Figura 3: Árvores filogenéticas para seqüências completas do gene *ul44*. As seqüências completas de *ul44* apresentaram agrupamentos semelhantes às seqüências parciais.

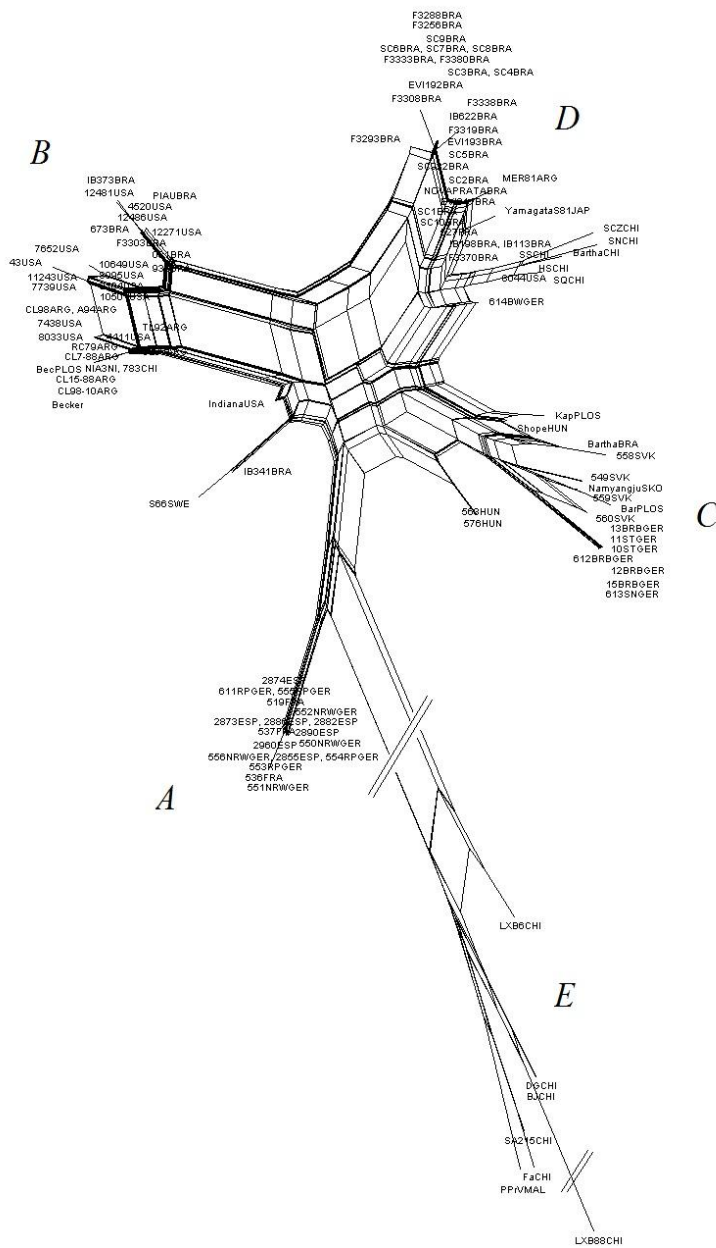


Figura 4: Rede filogenética reconstruída a partir de seqüências parciais de *uI44*. Os cinco principais grupos de SuHV-1 são demonstrados assim como o posicionamento discrepante de IndianaUSA, S66SWE, IB341BRA. Cada grupo apresentou características distintas como. O grupo A foi composto por amostras provenientes de javalis do oeste europeu e baixa diversidade genética a despeito de haver amostra com intervalo de isolamento de mais de 15 anos. O grupo B apresentou amostras dos Brasil, Estados Unidos, Argentina e Irlanda do Norte, algumas delas classificadas como pertencentes ao genótipo I pelo método de restrição por *BamHI*. O grupo C foi formado por amostras com alta diversidade genética isoladas de javalis da Europa Central. O grupo D reuniu amostras de comportamento muitas vezes descrito como peculiar em outros trabalhos como fenômenos de recombinação, isolados de bovinos, sendo que muitas delas foram caracterizadas como pertencentes ao genótipo II pelo método de restrição por *BamHI*. O grupo E teve alta diversidade genética e teve como característica principal conter exclusivamente seqüências provenientes da China.

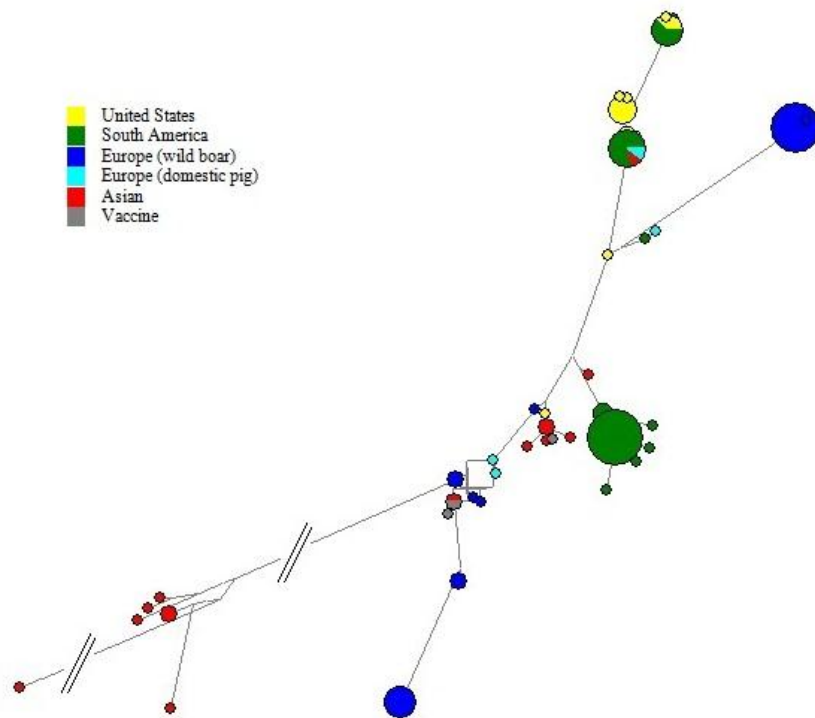


Figura 5: Rede filogenética reconstruída a partir do programa Network. O centro da rede é formado pelas sequências europeias provenientes da Hungria e Eslováquia e algumas amostras vacinais. A amostra vacinal Bartha, existente em muitas passagens e diferentes sequenciamentos no GenBank, é proveniente de um isolado húngaro.

Filogeografia

As sequências DS do Brasil não apresentaram diferenciação genética. Já as sequências norte-americanas apresentaram padrão mais variável. Os resultados com os dados discretos demonstram uma mudança rápida da variação genética do SuHV-1 em uma localidades muito próximas (Figura 6). Os dados contínuos mostram a variação genética aumentando primeiro a norte e em seguida para o oeste. Esses últimos resultados apresentaram as localizações com focos em suínos em pontos determinantes da distribuição geográfica (Figura 7).

Os dados filogeográficos gerados com as sequências SS demonstram um padrão constante de distribuição com os principais pontos de variabilidade na Hungria e Eslováquia, com posterior distribuição na região Oriental da Alemanha e depois para as porções Ocidental, norte da França e Espanha (Figura 8). O SuHV-1 varia pouco entre estas localizações, mantendo grupos homogêneos por longos períodos. A análise por *time slicer* propõe a localização da raiz da árvore filogenética na Suíça, porém com valores baixos de probabilidade posterior. O mesmo ocorre para o posicionamento de um nodo no centro da França (Figura 9).

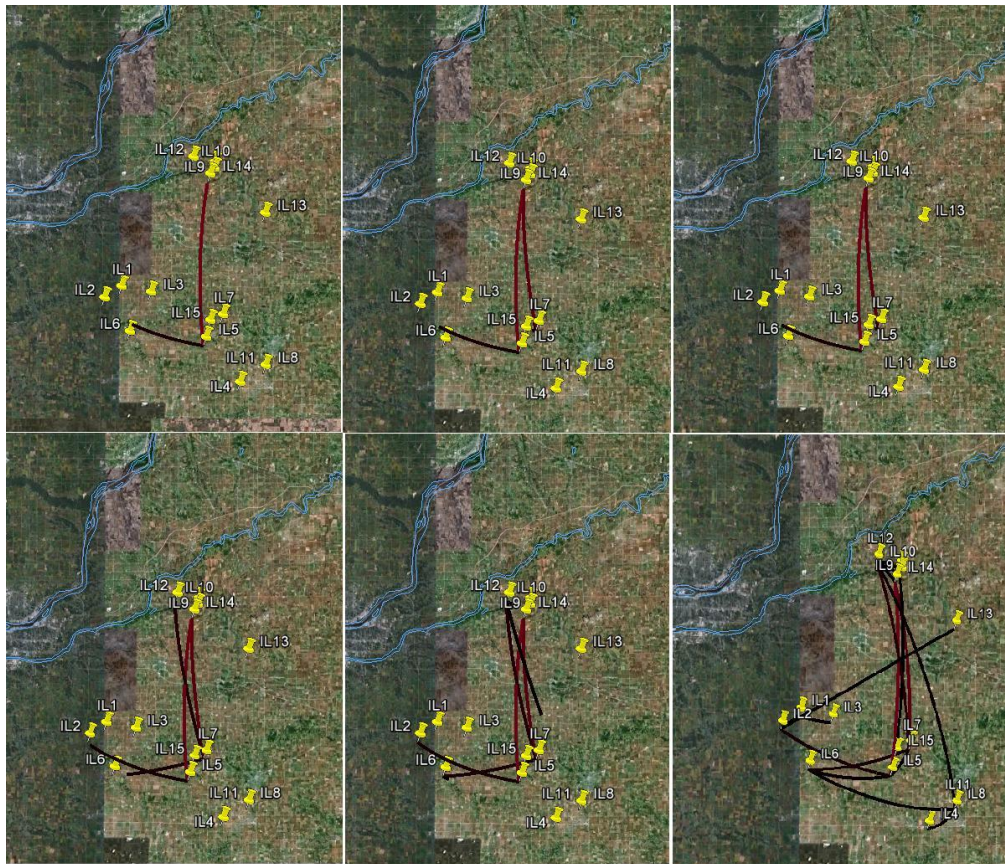


Figura 6: Análise por dados discretos incorporada à árvore filogenética para amostras de focos de pseudorraiva ocorridos no estado de Illinois, Estados Unidos. A altura das linhas que conectam os pontos de isolamento indica a passagem de tempo de acordo com os ramos da árvore filogenética e o gradiente de cor a idade relativa de migração. Os círculos foram retirados para facilitar a visualização dos resultados. IL1 a 4, IL7, IL8, IL12 indicam locais onde ocorreu isolamento do SuHV-1 em suínos.

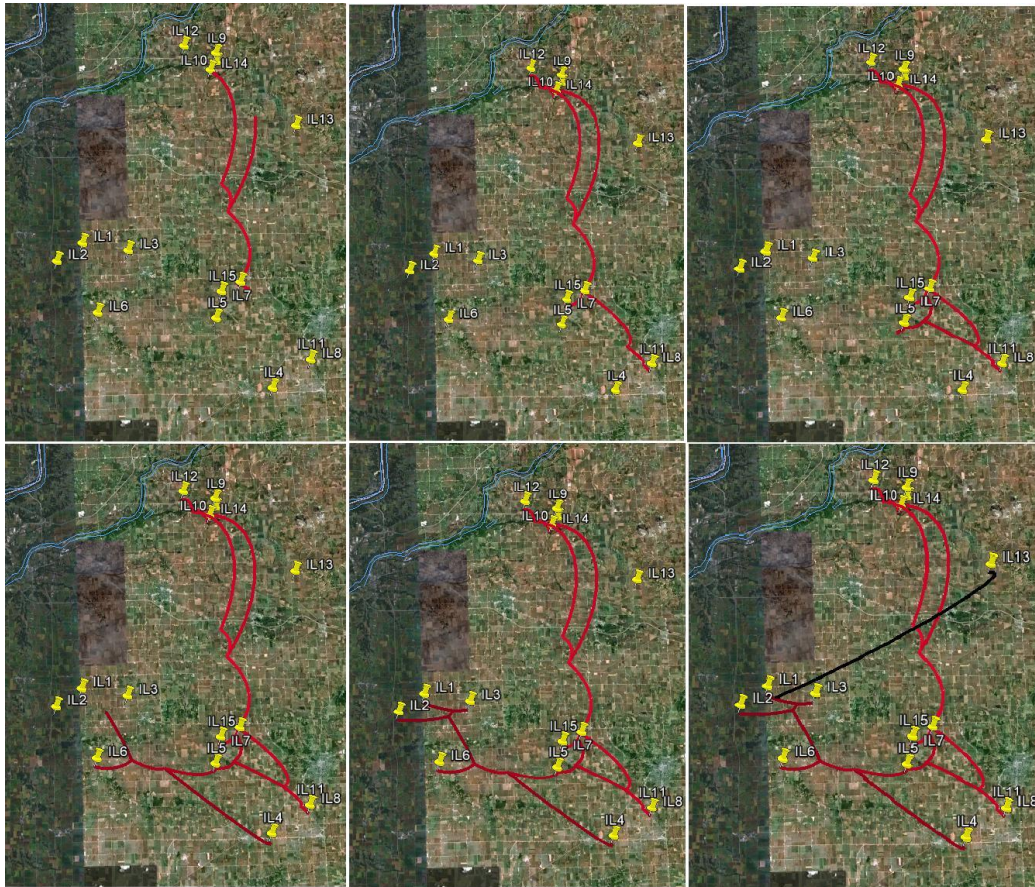


Figura 7: Análise por dados contínuos incorporada à árvore filogenética para amostras de focos de pseudorraiva ocorridos no estado de Illinois, Estados Unidos. A altura das linhas que conectam os pontos de isolamento indica a distância entre os mesmos e o gradiente de cor a idade relativa de migração. Os círculos foram retirados para facilitar a visualização dos resultados. IL1 a 4, IL7, IL8, IL12 indicam locais onde ocorreu isolamento do SuHV-1 em suínos.

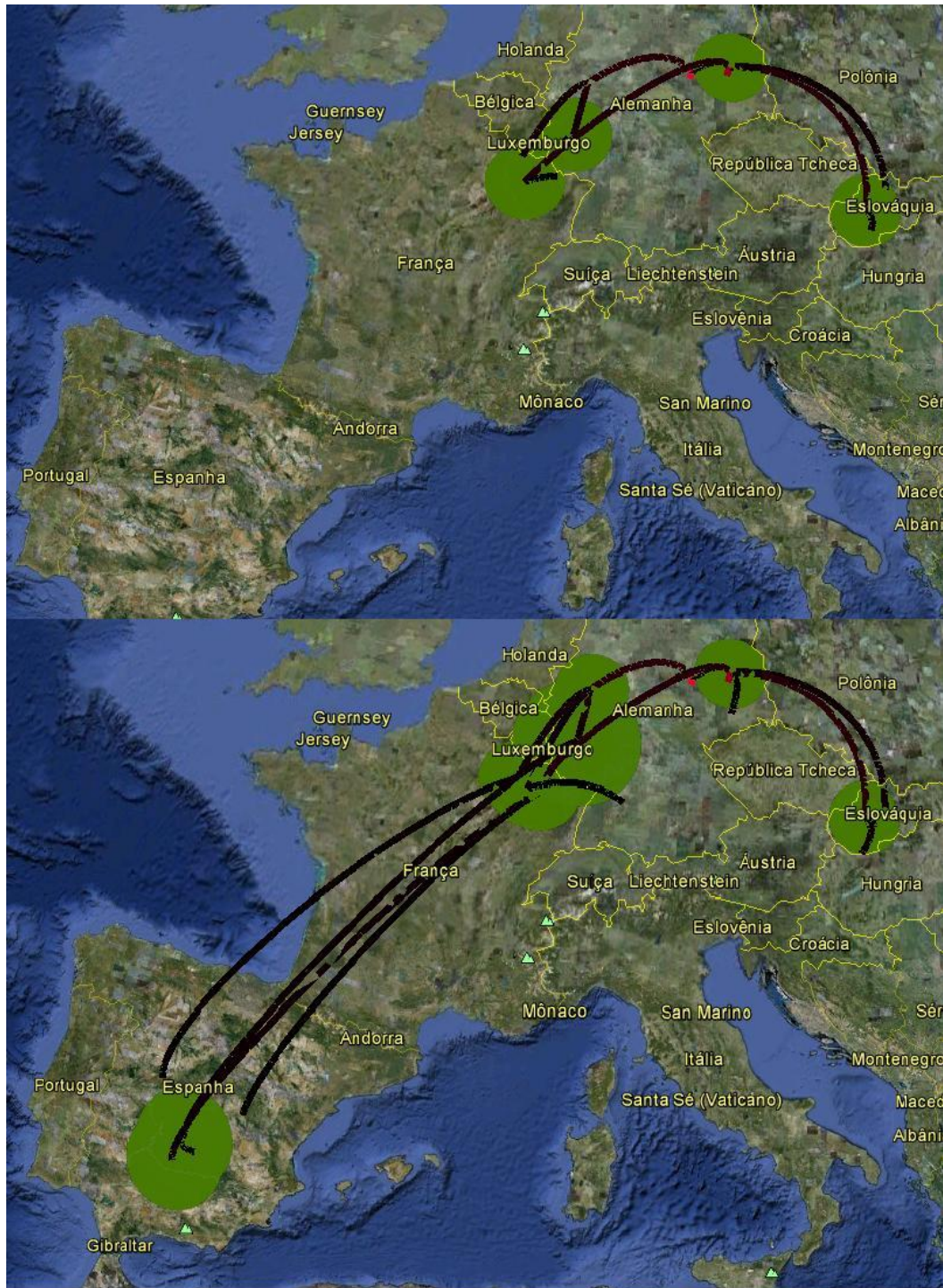


Figura 8: Resultados da análise filogeográfica da partir de dados discretos das sequências de *UL44* do SuHV-1 isolados a partir de javali na Europa entre 1995 e 2008. A altura das linhas que conectam os pontos de isolamento indicam a distância entre os mesmos e o gradiente de cor a idade relativa de migração. Os círculos indicam o número de linhagens que mantêm esse estado discreto.

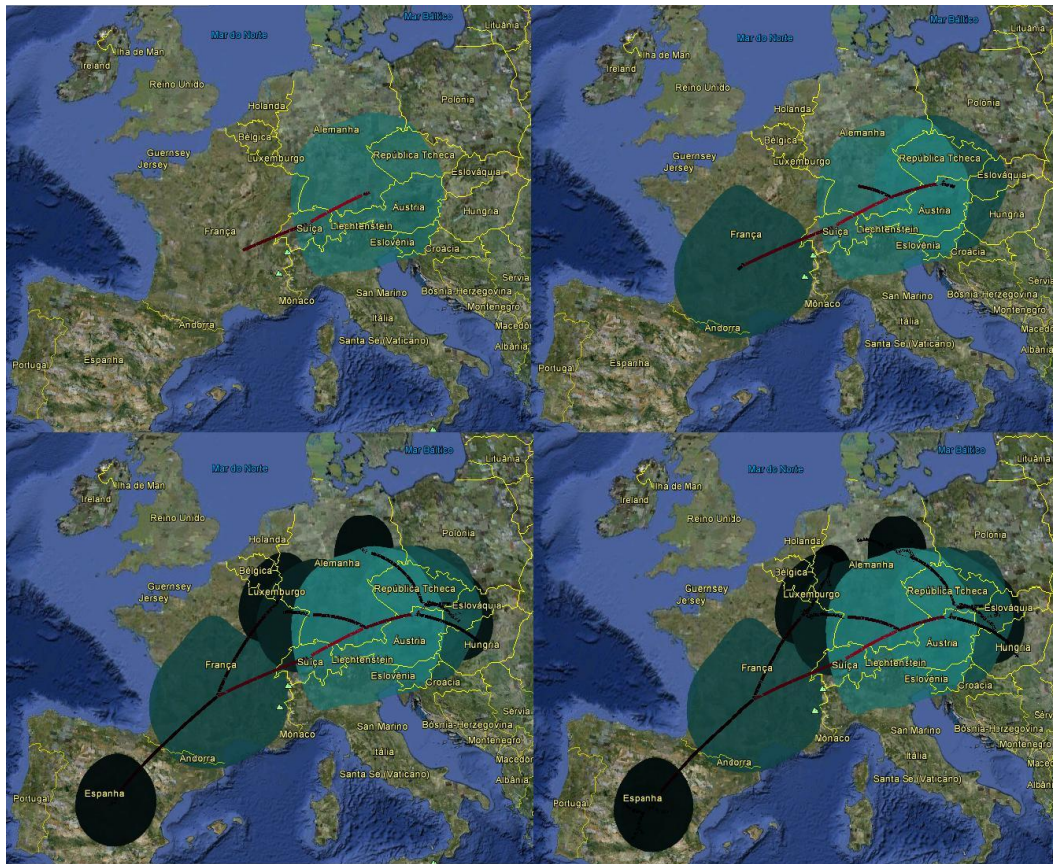


Figura 9: Imagens geradas a partir da análise por *time slicer* da distribuição genética do SuHV-1 em javalis na Europa. Os círculos indicam o tempo relativo de dispersão do vírus naquele estado.

Teste para Seleção Positiva

As sequências testadas para seleção positiva não geraram resultados diferentes com a presença ou ausência das amostras de origem chinesa. Os genes *ul49.5*, *us6*, *us7*, *us9* não estão sob pressão seletiva positiva, apresentando apenas pontos de seleção negativa ou neutra. *UI14* apresentou pontos de seleção positiva, mas os testes estatísticos indicam que o resultado não é significativo (*Likelihood ratio* (LTR) para M8: -601.699, LTR M8a: -601.817). *Us8* apresentou resultado significativo para seleção positiva (LTR M8: -2339.21, LTR M8a: -2341.33).

Os resultados para *ul44* foram diferentes para os dois grupos. Sequências SS não

foram consideradas sob pressão positiva, ao contrário das derivadas de DS (LTR M8: -1003.22, L0TR M8a: -1008.14).

DISCUSSÃO

O combate à pseudorraiva restringiu o número de focos da enfermidade a ponto de erradicá-la em rebanhos comerciais de suínos domésticos em muitos países. Ainda sim, a enfermidade continua sendo uma preocupação mundial com focos presentes em diversos locais como na Europa oriental (Müller et al., 2003). A prevalência do SuHV-1 nessas regiões não é o único problema, pois o vírus ainda persiste em rebanhos de javalis e suínos ferais em diversas partes no mundo, com

prevalências altas em determinadas regiões (Pannwitz et al., 2011).

Os isolados de SuHV-1 são reunidos geneticamente em cinco grupos distribuídos mundialmente. Dentre estes, chama atenção o fato de existirem grupos onde persistem sequências quase que exclusivamente provenientes de SuHV-1 derivados de javalis, de suínos domésticos ou de origem asiática com um alto grau de polimorfismo. Este resultado indica que diferentes linhagens do vírus infectam estas populações, fato já sugerido por resultados de caracterização de isolados provenientes de javalis (Müller et al., 2011).

A evolução da enfermidade em DS indica um vírus ainda menos adaptado ao hospedeiro quando comparado aos isolados SS. Pelo menos dois genes codificantes de glicoproteínas do envelope, *ul44* e *us8*, estão sob forte pressão seletiva. Possivelmente devido à ausência de sequências de outros genes e por existir nos bancos de dados apenas sequências parciais do gene *ul44* para os isolados SS não foi encontrada evidência de seleção positiva. A variabilidade genética foi até mesmo discrepante quando as duas populações virais foram comparadas. Esses fatos corroboram trabalhos anteriores que afirmam isolados provenientes de SS são menos virulentos (Müller et al., 2001). Mesmo que não esteja sobre pressão positiva, a taxa de variação da *ul44* dos SuHV-1 SS pode estar sob influência de outras forças evolutivas como pontos de desordem protéica na glicoproteína C (Fonseca Jr. et al., 2010).

O gene *ul44* não deve, no entanto, ser utilizado como único marcador para caracterizar geneticamente isolados DS ou SS. Os grupos podem não se tornar tão nítidos caso mais sequências DS provenientes da Europa sejam acrescentadas à análise como se pode verificar pelo fato de as sequências Shope e Kaplan se agruparem com HUN563 e HUN573. Até a comparação a partir de outros genes, os isolados brasileiros estarem distantes das amostras do restante do mundo, evento que pode ser

questionado pelo fato de as mesmas amostras se agruparem com dois isolados belgas.

As redes filogenéticas formadas pelas sequências de *ul44* ratificam a divisão do SuHV-1 em pelo menos cinco grandes grupos. A maior parte dos haplótipos DS ocidentais e orientais encontra-se polarizada nos extremos da rede com os haplótipos SS derivados da Europa posicionados no centro. Essa estrutura indica a origem européia de todos os isolados ocidentais no século XX e XXI. Essa hipótese é sustentada por outros fatos como a presença de sequências européias em todos os grupos da árvore e à maior diversidade genética nesse continente. Entre isolados SS, as sequências do leste da Alemanha, húngaras e eslovacas, mesmo que isoladas em pontos próximos e curto intervalo de tempo, são mais geneticamente diversas do que a de outros pontos da Europa. Nota-se que a maior parte da diversidade genética do SuHV-1 na Europa corresponde à essa mesma região. Onde está localizada a maior diversidade de haplótipos do vírus também é o único lugar onde se encontram os dois principais haplótipos de suínos (Larson et al., 2005, Ramirez et al., 2009).

Os dados filogeográficos gerados para as amostras brasileiras foram insuficientes para se gerar uma análise mais apurada da distribuição do SuHV-1 devido à baixa diversidade genética do vírus no Brasil. As amostras norte-americanas apresentam um elevado grau de variabilidade em relação ao curto espaço de tempo de isolamento e a distância geográfica, resultado que difere dos encontrados em outros trabalhos (Fonseca jr. et al., 2010, Müller et al., 2010, Serena et al., 2011). A análise com dados discretos localizou as sequências originárias de suínos em pontos importantes da árvore filogenética, indicando uma distribuição posterior para hospedeiros terminais. Esse resultado está de acordo com as características do SuHV-1 que tem como principais replicadores os suínos (Pomeranz et al., 2005).

A filogeografia foi mais apurada para a distribuição do vírus em javalis europeus. O objetivo da análise não foi gerar dados epidemiológicos, mas verificar a dispersão e variabilidade genética do vírus conforme localização e tempo. Ainda sim, os resultados apontam uma difusão rumo ao oeste, fenômeno já destacado com análises epidemiológicas aprofundadas do SuHV-1 em javalis (Thulke et al., 2005). Os dados filogeográficos sustentam a origem dos recentes focos de SuHV-1 na região mais a leste da Europa. A análise por *time slicer* propõe a localização da raiz da árvore filogenética na Suíça, porém com valores baixos de probabilidade posterior. O mesmo ocorre para o posicionamento de um nodo no centro da França. É provável que esses pontos tenham sido formados devido à ausência de sequências geneticamente mais próximas da raiz e por discrepância na formação dos nodos da árvore. As localizações distantes e o perfil genético idêntico para *uI44* das amostras do norte da França e do centro da Espanha formaram valores discrepantes que podem ter gerado um nodo a mais na árvore.

A diversidade genética do vírus diminui à medida que é difundido rumo a oeste. Amostras muito distantes como as presentes na Espanha, norte da França e oeste da Alemanha ainda permanecem com o mesmo perfil genético para *uI44* conforme descrito por Muller et al. (2010). Este não é um fenômeno único na genética do SuHV-1. Isolados brasileiros de focos ocorridos entre 1983 e 2003 permaneceram com o mesmo perfil genético (Fonseca Jr. et al., 2010a). Essa baixa diversidade pode ser explicada pelo fato que os herpesvírus são de evolução lenta (Sakaoka et al., 1994). O SuHV-1 pode ter sido introduzido nestas áreas recentemente quando comparado às regiões mais a leste da Europa. Não se pode esquecer a ação do homem nesse ponto, que pode ter levado o vírus a sofrer um gargalo evolutivo juntamente com seu hospedeiro devido à caça excessiva (Scandura et al., 2008) ou efeito fundador devido a translocações de animais (Vicente et al., 2005).

As amostras asiáticas foram divididas geneticamente em dois grupos, um que forma exclusivamente o grupo E e um segundo que se distribui em outros clados. A distância genética de E em relação às sequências ocidentais foi comprovada pela comparação de diversos genes sob diferentes pressões seletivas. Essa diferença exacerbada, associada à alta diversidade genética do grupo, pode estar relacionada com a presença mais remota do vírus na região, possivelmente influenciada pelo fato de os suínos asiáticos possuírem um perfil genético mais diverso do que os ocidentais (Ramírez et al., 2009).

A presença de amostras asiáticas nos grupos A a D da árvore filogenética de *uI44* (Figura 4) pode estar associada com a ampla distribuição das raças suínas no globo. Não foi possível traçar a origem do grupo E a partir das informações geradas nesse trabalho. A relação entre as sequências ocidentais e orientais não é necessariamente recente. A influência da genética de suínos chineses nos rebanhos anglo-saxônicos ainda é muito importante, mesmo que os relatos de introgressão datem dos séculos XVIII e XIX (Fang e Andersson, 2006).

Os resultados encontrados neste trabalho demonstram a coevolução do SuHV-1 e dos suínos. O vírus apresenta evolução diferente nos clados das árvores. Essa diferença pode ser visualizada entre as sequências derivadas de suínos selvagens e suínos domésticos e é mais nítida ao se comparar amostras ocidentais com orientais. O SuHV-1, um vírus cuja infecção já é profundamente influenciada pela idade do hospedeiro, tem sua evolução fortemente afetada pela genética dentro do gênero *Sus scrofa*. O sistema imunológico dos suínos tem uma variação genética substancial (Flori et al., 2011), é influenciado pela raça e pela idade (Sutherland et al., 2005) e também pode ter envolvido padrões de seleções diferenciados como ocorre em outros genes (Fang et al., 2009), o que por si só inclui fatores importantes para a evolução de um vírus.

Os resultados desse trabalho demonstram que o SuHV-1, mesmo sendo um vírus de evolução lenta, pode apresentar grande variabilidade dependendo do local ou de

qual animal é isolado. O vírus evolui diferentemente de acordo com o hospedeiro que infecta devido às diferentes pressões seletivas a que está submetido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBINI, S.; ZIMMERMANN, W.; NEFF, F. et al. Porcine malignant catarrhal fever: diagnostic findings and first detection of the pathogenic agent in diseased swine in Switzerland. *Schweiz Arch Tierheilkd*, v.145, p. 61-68, 2003.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W. et al. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, v.215, p. 403-410, 1990.
- ANGEN, O., OLIVEIRA, S., AHRENS, P. et al. Development of an improved species specific PCR test for detection of *Haemophilus parasuis*. *Vet Microbiol*, v. 119, n. 2-4, p. 266-76, 2007.
- ARORA, A.; KAUR, H.; WENGEL, J.; MAITI, S. Effect of locked nucleic acid (LNA) modification on hybridization kinetics of DNA duplex. *Nucleic Acids Symposium Series (Oxford)*. V. 52, p. 417-418, 2008.
- BANDELT H-J, FORSTER P, RÖHL A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* v. 16, p. 37-4, 1999.
- BANKS, M. DNA restriction fragment length polymorphism among british isolates of Aujeszky's disease virus: use of the polymerase chain reaction to discriminate among strains. *Brit. Vet. J.* v.149, p.155-163, 1993.
- BASCUÑANA, C.R.; BJÖRNEROT, L.; BALLAGI-PORDÁNY, A. et al. Detection of pseudorabies virus genomic sequences in apparently uninfected "single reactor" pigs. *Vet. Microbiol.*, v.55, p.37-47, 1997.
- BASTIEN, P.; PROCOP, G.W.; REISCHL, U. Quantitative real-time PCR is not more sensitive than "conventional" PCR. *J Clin Microbiol.*, v.46, p. 1897-1900, 2008.
- BELÁK, S. Experiences of an OIE Collaborating Centre in molecular diagnosis of transboundary animal diseases: a review. *Dev Biol (Basel)*, v.128, p.103-112, 2007.
- BIELEJEC, F.; RAMBAUT, A., SUCHARD, M. A. et al. SPREAD: spatial phylogenetic reconstruction of evolutionary dynamics. *Bioinformatics.* , v. 27, n. 20, p. 2910-2.
- BRADLEY, R.; LIBERSKI, P.P. Bovine spongiform encephalopathy (BSE): the end of the beginning or the beginning of the end? *Folia Neuropathol.*, v.42, p.55-68, 2004.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 8 de 3 de abril de 2007. Aprova as Normas para o Controle e a Erradicação da Doença de Aujeszky (DA) em suídeos domésticos, a serem observadas em todo o território nacional. Brasília, DF: *Diário Oficial da União*. Seção 1, Página 1, 10 de abril de 2007.
- BROWER, A.; HOMB, K.M.; BOCHSLER, P. et al. Encephalitis in aborted bovine fetuses associated with Bovine herpesvirus 1 infection. *J Vet Diagn Invest.*, v.20, p.297-303, 2008.
- BROWN, C. J.; TAKAYAMA, S.; CAMPEN, A. M, et al. Evolutionary rate heterogeneity in proteins with long disordered regions. *J Mol Evol.* v. 55, n. 1, p. 104-110, 2002.
- CALLAN, R. J., VAN METRE, D. C. Viral diseases of the ruminant nervous system. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* V. 20, n. 2, p. 327-362, 2004.
- CAMARGOS, M.F., PEREDA, A., STANCEK, D. et al. Molecular characterization of the env gene from Brazilian field isolates of Bovine leukemia virus. *Virus Genes.* v. 34, n. 3, p. 343-50, 2007.
- CAMPOS, F.S.; FRANCO, A.C.; HÜBNER, S.O. et al. High prevalence of co-infections with bovine herpesvirus 1 and 5 found in cattle in southern Brazil. *Vet Microbiol.*, v.139, p.67-73, 2009.

- CAULCUTT, R.; BODDY, R. *Statistic for analytical chemists*. Londres: Chapman and Hall, 1983. 256p.
- CHAE, C. A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases. *Vet J.*, v. 169, n. 3, p. 326-36, 2005.
- CHEUNG, A. K. Detection of pseudorabies virus transcripts in trigeminal ganglia of latently infected swine. *J Virol.* v. 63, n. 7, p. 2908-2913, 1989.
- CHEUNG, A. K. Investigation of pseudorabies virus DNA and RNA in trigeminal ganglia and tonsil tissues of latently infected swine. *Am J Vet Res.* v. 56, n. 1, p. 45-50, 1995.
- CHRISTENSEN, L.S. et al. Restriction fragment pattern (FP) analysis of genomes from Danish isolates of suid herpesvirus 1 (Aujeszky's disease virus). *Arch. Virol.*, v.97, p.215-224, 1987.
- CHRISTENSEN, L.S. Comparison by restriction fragment pattern analysis and molecular characterization of some European isolates of suid herpesvirus 1: a contribution to strain differentiation of European isolates. *Arch. Virol.*, v.102, p.39-47, 1988.
- CHRISTENSEN, L.S. et al. Characterization of field isolates of suid herpesvirus 1 (Aujeszky's disease virus) as derivatives of attenuated vaccine strains. *Arch. Virol.*, v.124, p.225-234, 1992.
- CHRISTENSEN, L.S. Population biology of suid herpesvirus 1. *APMIS*, supl.48, p. 1-48 1995.
- CLAUS, M. P.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Herpesvírus Bovino Tipo 5 e Meningoencefalite Herpética Bovina 1 Meningoencephalitis by Herpesvirus Type 5. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 23, p.131-141, 2002.
- CORNEY, B.G., DIALLO, I.S., WRIGHT, L.L. et al. Pasteurella multocida detection by 5' Taq nuclease assay: a new tool for use in diagnosing fowl cholera. *J Microbiol Methods.* v. 69, n. 2. p. 376-80, 2007.
- CORN JL, CUMBEE JC, BARFOOT R, ERICKSON GA. Pathogen exposure in feral swine populations geographically associated with high densities of transitional swine premises and commercial swine production. *J Wildl Dis.* V. 45, n. 3, p. 713-21, 2009.
- COSTA, E.A.; BOMFIM, M.R.; DA FONSECA, F.G. et al. Ovine herpesvirus 2 infection in Foal, Brazil. *Emerg Infect Dis.*,v.15, p.844-845, 2009.
- CUNHA, E. M. S., PEIXOTO, Z. M. P., KOTAIT I.. Efficacy of an inactivated Aujeszky's disease virus vaccine: experimental infection of pigs. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* v. 35, n. 4, p. 00-00, 1998.
- CUNHA, E.M.S. et al . Antibodies against pseudorabies virus in feral swine in southeast Brazil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, Belo Horizonte, v. 58, n. 4, 2006 .
- DAMBROS, R.M.F.; RIBEIRO, B.M.; AGUIAR, R.W.S. et al. Cloning and expression of Aujeszky's disease virus glycoprotein E (gE) in a baculovirus system. *Braz. J. Microbiol.*, v.38, p.494-499, 2007.
- DAVISON, A.J., EBERLE, R., EHLERS, B. et al. The order Herpesvirales. *Arch. Virol.* v. 154, n. 1, p. 171-177, 2009.
- DeALWIS, M. C., WIJewardana, T.G., GOMIS, A.I., et al. Persistence of the carrier status in haemorrhagic septicaemia (Pasteurella multocida serotype 6:Binfection) in buffaloes. *Trop Anim Health Prod* v. 22, p. 185-94, 1990.
- De-GIULI, L. et al. 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. *J Vet D Inv*, v. 14, n. 4, p. 353-6, 2002.

- DEL MÉDICO ZAJAC, M.P.; LADELFA, M.F.; KOTSIAS, F. et al. Biology of bovine herpesvirus 5. *The Veterinary Journal*, v.184, p.138-145, 2010.
- DRUMMOND, A.J., RAMBAUT, A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol Biol.* v. 7, p. 214, 2007.
- ELLIS, J., CLARK, E., HAINES, D. et al. Porcine circovirus-2 and concurrent infections in the field. *Vet Microbiol.* v. 98, n. 2, p. 159-63, 2004.
- EWERS, C., LÜBKE-BECKER, A., BETHE, A., et al. Virulence genotype of *Pasteurella multocida* strains isolated from different hosts with various disease status. *Vet Microbiol.* 2006 v. 114, n. 3-4, p. 304-17.
- ESPY, M.J. et al. Real-Time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin. Microbiol. Rev.*, v.19, n.1, p.165-256, 2006.
- ESTEVES, P.A., DELLAGOSTIN, A.O., PINTO, L.S. et al. Phylogenetic comparison of the carboxy-terminal region of glycoprotein C (gC) of bovine herpesviruses (BoHV) 1.1, 1.2 and 5 from South America (SA). *Virus Res.* v. 131, n. 1, p. 16-22, 2008.
- FANG M, ANDERSSON L. Mitochondrial diversity in European and Chinese pigs is consistent with population expansions that occurred prior to domestication. *Proc Biol Sci.* v. 273, n. 1595, p. 1803-10, 2006.
- FANG M, LARSON G, RIBEIRO HS, LI N, ANDERSSON L. Contrasting mode of evolution at a coat color locus in wild and domestic pigs. *PLoS Genet.* V. 5, n. 1, e1000341, 2009.
- FAUQUET, C.M. et al. Virus taxonomy: VIIIth report of the international committee on taxonomy of viruses. Elsevier, Academic Press, San Diego, 2005.
- FLORI, L.; GAO, Y.; LALOË, D. et al. Immunity traits in pigs: substantial genetic variation and limited covariation. *PLoS One* v. 6, n. 7, :e22717, 2006.
- FOLEY, P.L., HILL, R.E. Jr. Regulatory considerations for marker vaccines and diagnostic tests in the U.S. *Biologicals.* v. 33, n. 4, p. 253-256, 2005.
- FONSECA Jr., A.A.; CAMARGOS, M.F.; CIACCI-ZANELLA, J.R. et al. Diagnóstico e genotipagem do vírus da pseudorraiva por nested-PCR e análise de restrição enzimática. *Cienc. Rural*, v.40, p.921-927, 2010a.
- FONSECA Jr., A.A.; CAMARGOS, M.F.; DE OLIVEIRA, A.M. et al. Molecular epidemiology of Brazilian pseudorabies viral isolates. *Vet. Microbiol.*, v.141, p.238-245, 2010b.
- FONSECA JR, A.A., HEINEMANN, M.B., LEITE, R.C., REIS, J.K. A comparative analysis of envelope and tegument proteins of suid herpesvirus 1, bovine herpesvirus 1 and bovine herpesvirus 5. *Arch Virol.* v. 155, n. 10, p. 1687-92, 2010c.
- GART, J.J.; BUCK, A.A. Comparison of a screening test and a reference test in a epidemiologic studies. *Am. J. Epidemiol.*, v.83, n.1, p.593-602, 1966.
- GAILBREATH, K.L.; TAUS, N.S.; CUNHA, C.W. et al. Experimental infection of rabbits with ovine herpesvirus 2 from sheep nasal secretions. *Vet Microbiol.*, v.132, p.65-73, 2008.
- GEENEN, K.; FAVOREEL, H. W.; NAUWYNCK, H. J. Higher resistance of porcine trigeminal ganglion neurons towards pseudorabies virus-induced cell death compared with other porcine cell types in vitro. *J. Gen. Virol.* v. 86, p. 1251-1260, 2005.
- GERDTS, V., JÖNS, A., METTENLEITER, T.C. Potency of an experimental DNA vaccine against Aujeszky's disease in pigs. *Vet. Microbiol.*, v. 66, n 1, 1-13, 1999.

- GIAMMARIOLI, M., PELLEGRINI, C., CASCIARI, C. et al. Development of a novel hot-start multiplex PCR for simultaneous detection of classical swine fever virus, African swine fever virus, porcine circovirus type 2, porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine parvovirus. *Vet Res Commun.* v. 32, n. 3, p. 255-62, 2008.
- GLISSON, J.R., HOFACRE, C.L., CHRISTENSEN, J.P. Fowl cholera. In: Saif, Y.M., Barnes, H.J., Glisson, J.R., Fadly, A.M., McDougald, L.R., Swayne, D.E. (Eds.), *Diseases of Poultry*. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, pp. 658-676, 2003.
- GLORIEUX, S., FAVOREEL, H. W.; MEESEN, G. et al. Different replication characteristics of historical pseudorabies virus strains in porcine respiratory nasal mucosa explants. *Vet Microbiol.* v. 136, n. 3-4, p. 341-6, 2009.
- GOLDBERG, T.L. Application of phylogeny reconstruction and character-evolution analysis to inferring patterns of directional microbial transmission. *Prev. Vet. Med.* v.61, n.59-70, 2003.
- GOLDBERG, T. L; WEIGEL, R. M; HAHN, E. C et al. Comparative utility of restriction fragment length polymorphism analysis and gene sequencing to molecular epidemiological investigation of a viral outbreak. *Epidemiology and Infection*, v. 126, pp. 415-424, 2001.
- GOTTSCHALK, M., D. J. TAYLOR. *Actinobacillus pleuropneumoniae*. In *Diseases of swine*. 9th Edition, B. E. Straw, J. J. Zimmerman, S. DA' llaire and D. J. Taylor (eds.). Blackwell Publishing, Ames, Iowa. pp. 563-576, 2006.
- GOUY, M., GUINDON, S., GASCUEL, O. SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol Biol Evol.* v. 27, n. 2, p. 221-4, 2010.
- GRANZOW, H.; KLUPP, B. G., FUCHS, W. et al. Egress of alphaherpesviruses: comparative ultrastructural study. *J Virol.*, v. 75, n. 8, pp. 3675-3684, 2001.
- GROFF, F. H. S.; MERLO, M. A., STOLL, P. A. et al. Epidemiologia e controle dos focos da doença de Aujeszky no Rio Grande do Sul, em 2003. *Pesq. Vet. Bras.* v. 25, n. 1, p. 25-30, 2005.
- GUNSON, R. N., COLLINS, T. C., CARMAN, W. F. Practical experience of high throughput real time PCR in the routine diagnostic virology setting. *J Clin Virol.* v. 35, n. 4, p. 355-367, 2006.
- GUNSON, R.N.; BENNETT, S., MACLEAN, A. et al. Using multiplex real time PCR in order to streamline a routine diagnostic service. *J Clin Virol.* v.43, p.372-375, 2008.
- HA, Y.; LEE, Y. H.; AHN, K. K. et al. Reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs by prenatal porcine circovirus 2 infection and postnatal porcine parvovirus infection or immunostimulation. *Vet Pathol.* v. 45, n. 6, p. 842-848, 2008.
- HAHN, E.C., FADL-ALLA, B., LICHTENSTEIGER, C.A. Variation of Aujeszky's disease viruses in wild swine in USA. *Vet Microbiol.* v. 143, n. 1, p. 45-51, 2010.
- HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* v. 41, p. 95-98, 1999. HENGEN, P.N. Optimizing multiplex and LA-PCR with betaine. *Trends Biochem Sci.*, v.22, p.225-226, 1997.
- HERRERA-MARTÍNEZ, E. et al. Comparison of two methods of PCR followed by enzymatic restriction digestion for detection and typing of herpes simplex viruses isolated from patients with mucocutaneous or cutaneous lesions. *R. Lat. Mic.*, v. 47, n. 3-4, p. 76-81, 2005.

- HERRMANN, S.C. et al. Pseudorabies viruses from clinical outbreaks and latent infections grouped into four major genome types. *C T Vet Med An Sc*, v. 27, p. 378-401, 1984.
- HOLDER, M., LEWIS, P.O. Phylogeny estimation: traditional and Bayesian approaches. *Nat Rev Genet*. v. 4, n. 4, p. 275-84, 2003.
- HUELSENBECK, J.P., RONQUIST, F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*. v. 17, n. 8, p. 754-5, 2001.
- HUANG, C.; HUNG, J.J.; WU, C.Y. et al. Multiplex PCR for rapid detection of pseudorabies virus, porcine parvovirus and porcine circoviruses. *Vet. Microbiol.*, v.101, p.209-14, 2004
- HUSON, D. H., BRYANT, D.. Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies, *Mol. Biol. Evol.* v. 23, n. 2, p. 254-267, 2006.
- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Disponível para consulta em www.ibge.gov.br.
- ISHIKAWA, K., TSUTSUI, M., TAGUCHI, K. et al. Sequence variation of the gC gene among pseudorabies virus strains. *Vet Microbiol.* v. 49, n. 3-4, p. 267-72, 1996.
- JACOBS, L., KIMMAN, T. G., BIANCHI, A. Lack of serum antibodies against glycoprotein E in pseudorabies virus-immune pigs infected with wild-type virus. *Am J Vet Res* v. 57, p. 1525–1528, 1996.
- JIANG, Y., SHANG, H., XU, H. et al. Simultaneous detection of porcine circovirus type 2, classical swine fever virus, porcine parvovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in pigs by multiplex polymerase chain reaction. *Vet J.* v. 183, n. 2, p. 172-5, 2010.
- JIN, L., SCHNITZLEIN, W.M., SCHERBA, G. Identification of the pseudorabies virus promoter required for latency-associated transcript gene expression in the natural host. *J. Virol.* v. 74, n. 14. p. 6333-6338, 2000.
- KALOREY, D.R., YUVARAJ, S., VANJARI, S.S., et al. PCR analysis of *Pasteurella multocida* isolates from an outbreak of pasteurellosis in Indian pigs. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* v. 31, n. 6, p. 459-65 2008.
- KÖHLER, M., KÖHLER, W. Zentralblatt für bakteriologi – 100 years ago Alçádar Aujeszky detects a “new” disease – or: it was the cow and not the sow. *J Med Microbiol*, v. 292, 423-427, 2003.
- KIBBE, W.A. OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Res.*, v.35 (Web Server issue), W43-46, 2007.
- KIM, J., CHUNG, H.K., CHAE, C. Association of porcine circovirus 2 with porcine respiratory disease complex. *Vet J.* v. 166, n. 3, p. 251-6, 2003.
- KINKER, D.R.; SWENSON, S.L.; WU, L.L. et al. Evaluation of serological tests for the detection of pseudorabies gE antibodies during early infection. *Vet. Microbiol.*, v.55, p.99-106, 1997.
- KJELD, O. 2006. Pdraw32. Disponível em: <http://www.acaclone.com/>. On line. Acesso em 10 jan. 2009.
- KLUGE, J.P. et al. Pseudorabies (Aujeszky's disease). In: STRAW, B.E. et al. (eds). *Diseases of swine*. 8.ed. Ames, Iowa: Iowa State University, 1999. p.147-160.
- KLUPP, B.G., FUCHS, W., WEILAND, E. et al. Pseudorabies virus glycoprotein L is necessary for virus infectivity but dispensable for virion localization of glycoprotein H. *J Virol.* v. 71, n. 10, p. 7687-7695, 1997.

- KLUPP, B.G., BAUMEISTER, J., DIETZ, P. et al. Pseudorabies virus glycoprotein gK is a virion structural component involved in virus release but is not required for entry. *J Vir*
- KLUPP, B.G. et al. Complete, annotated sequence of the pseudorabies virus genome. *J Virol*, v. 78, n. 1, p. 424-40, 2004.
- KÜHNERT, D., WU, C. H., DRUMMOND, A. J. Phylogenetic and epidemic modeling of rapidly evolving infectious diseases. *Infect Genet Evol.* v. 11, n. 8, p. 1825-1841, 2011.
- LARSON, G.; DOBNEY, K.; ALBARELLA, U. et al. Worldwide phylogeography of wild boar reveals multiple centers of pig domestication. *Science*. v. 307, n. 5715., p. 1618-21, 2007.
- LEE, C. S. et al. Multiplex PCR for the simultaneous detection of pseudorabies virus, porcine cytomegalovirus, and porcine circovirus in pigs. *J. Virol. Met.*, v.139, n.1, p.39-43, 2007.
- LEMEY, P., RAMBAUT, A., DRUMMOND, A. J. et al. Bayesian phylogeography finds its roots. *PLoS Comput Biol.* V. 5, n. 9, e1000520, 2009.
- LI, X., P. ROMERO, M., RANI. Predicting protein disorder for N-, C-, and internal regions. *Genome Informatics*, v. 10, p. 30-40, 1999
- LIBRADO P, ROZAS J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*. v. 25, n. 11, p. 1451-2, 2009.
- LINDING, R., RUSSELL, R.B., NEDUVA, V. et al. GlobPlot: Exploring protein sequences for globularity and disorder. *Nucleic Acids Res.* v. 31, n. 13, p. 3701-8, 2003.
- LOLE, K. S., BOLLINGER, R. C.; PARANJAPE, R.S. et al. Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. *J Virol.* v. 73, n. 1. P. 152-60, 1999.
- LOPAREV, V. N. et al. Identification of five major and two minor genotypes of varicella-zoster virus strains: a practical two-amplicon approach used to genotype clinical isolates in Australia and New Zealand. *J Virol*, v. 81, n. 23, p. 12758-65, 2007.
- MA, W., LAGER, K.M., RICHT, J.A. et al. Development of real-time polymerase chain reaction assays for rapid detection and differentiation of wild-type pseudorabies and gene-deleted vaccine viruses. *J Vet Diagn Invest.* v. 20, n. 4, p. 440-7, 2008.
- MAES R. K., SUSSMAN M. D., VILNIS, A. et al. Recent developments in latency and recombination of Aujeszky's disease (pseudorabies) virus. *Vet Microbiol.* v. 55, n. 1-4, p. 13-27, 1997.
- MACINNES, J.I., GOTTSCHALK, M., LONE, A.G. et al. Prevalence of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus suis*, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, and *Streptococcus suis* in representative Ontario swine herds. *Can J Vet Res.*, v. 72, n. 3, p. 242-8, 2008.
- MAGNANINI, R. C.; SOUTO MAIOR, A. S. Geografia do Brasil. Rio de Janeiro: IBGE, 1977. p. 151. vol. 5.
- MAHMOUD HY, SUZUKI K, TSUJI T, YOKOYAMA M, SHIMOJIMA M, MAEDA K. Pseudorabies Virus Infection in Wild Boars in Japan. *J Vet Med Sci.* 2011.
- MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), Instrução Normativa nº 8 de três de abril de 2007. Disponível para consulta em <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=17719>.

- MARCACCINI, A., ALEMAÑ, N., QUIROGA, M. I. et al. Temporary inhibition of neuronal apoptosis in Aujeszky's disease virus-infected swine. *Vet Microbiol.* v. 113, n. 3-4, p. 237-42, 2006.
- McCAW, M.B.; OSORIO, F.A.; WHEELER, J. et al. Effect of maternally acquired Aujeszky's disease (pseudorabies) virus-specific antibody in pigs on establishment of latency and seroconversion to differential glycoproteins after low dose challenge. *Vet. Microbiol.*, v.55, p.91-98, 1997.
- McGEOCH, D. J.; DOLAN, A.; RALPH, A. C. Toward a comprehensive phylogeny for mammalian and avian herpesviruses. *J Virol*, v. 74, n. 22, pp. 10401-10406, 2000.
- MENGELING, W. L.; BROCKMEIER, S. L., LAGER, K. M., VORWALD, A. C. The role of biotechnologically engineered vaccines and diagnostics in pseudorabies (Aujeszky's disease) eradication strategies. *Vet Mic*, v. 55, pp. 49-60, 1997.
- METTENLEITER, T. C. Immunology of pseudorabies (Aujeszky's disease). *Vet. Immun. Immunp*, v. 54, pp. 221-229, 1996.
- METTENLEITER, T. C. Aujeszky's disease (pseudorabies) virus: the virus and molecular pathogenesis – state of the art, june 1999. *Vet. Res.*, v. 31, pp. 99-115, 2000.
- METTENLEITER, T. C. Herpesvirus assembly and egress. *J Virol*, v. 76, pp. 1537-1547, 2002.
- MILLER, G. Y.; TSAI, J. S.; FORESTER, L. Benefit-cost analysis of the national pseudorabies virus eradication program. *J A Vet Med A*. v. 208; n. 2, pp. 208-213, 1996.
- MOORKAMP, L., NATHUES, H., SPERGSER, J. et al. Detection of respiratory pathogens in porcine lung tissue and lavage fluid. *Vet J.*, v. 175, n. 2, p. 273-5, 2008.
- MULDER, W. A.; JACOBS, L.; PRIEM, J. et al. Glycoprotein gE-negative pseudorabies virus has reduced capability to infect second- and third-order neurons of the olfactory and trigeminal in porcine central nervous system. *J. Gen. Virol.*, v. 75, n. 11, pp. 3095-106, 1994.
- MÜLLER, T., KLUPP, B., ZELLMER, R. et al. Characterisation of pseudorabies virus isolated from wild boar (*Sus scrofa*). *Vet. Rec.* v. 143, n. 12, p. 337-40, 1998.
- MÜLLER, T., BÄTZA, H. J., SCHLÜTER, H. et al. Eradication of Aujeszky's disease in Germany. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet Public Health.* V. 50, n. 5, p. 207-13, 2003.
- MÜLLER, T., KLUPP, B.G., FREULING, C. et al. Characterization of pseudorabies virus of wild boar origin from Europe. *Epidemiol Infect.* v. 12, p. 1-11, 2010.
- MURPHY, F.A. et al. Virus Taxonomy. Classification and nomenclature of viruses. Sixth report of the international Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch. Virol.* v.10, p.120-121,1995.
- MUYLKENS, B., THIRY, J., KIRTEN, P. et al. Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. *Vet Res. V.* 38, n. 2, p. 181-209, 2007.
- NADIN-DAVIS, S. A., SHEEN, M., WANDELER, A. I. Development of real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction methods for human rabies diagnosis. *J Med Virol.* v. 81, n. 8, p. 1484-1897, 2009.
- NISHIMORI, T. et al. Restriction endonuclease analysis of Aujeszky's disease viruses isolated in Japan. *Jap. J. Vet. Sc.* v.49, n.2, p.365-367, 1987.
- OIE. World Organisation for Animal Health. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. 5th ed. Paris: OIE, 2009. <Disponível em: http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_summry.htm>. Acessado em: 10 dez 2009.

- PAGAMJAV, O., YAMADA, S., IBRAHIM, el-S.M. et al. Molecular characterization of equine herpesvirus 1 (EHV-1) isolated from cattle indicating no specific mutations associated with the interspecies transmission. *Microbiol Immunol.* v. 51, n. 3, p. 313-9, 2007.
- PALZER, A., RITZMANN, M., WOLF, G. et al. Associations between pathogens in healthy pigs and pigs with pneumonia. *Vet Rec.* v. 162, n. 9, p. 267-71, 2008.
- PANNWITZ, G.; FREULING, C.; DENZIN, N. et al. A long-term serological survey on Aujeszky's disease virus infections in wild boar in East Germany. *Epidemiol Infect.* v. 15, p. 1-11, 2011.
- PEREZ, L.J.; HEIDY, H.D. Development of a polymerase chain reaction assay for the detection of pseudorabies virus in clinical samples. *Br. J. Mic.* v.40, n.3, p.433-438, 2009.
- Peters, I. R., Helps, C. R., Hall, E. J. et al. Real-time RT-PCR: considerations for efficient and sensitive assay design. *J Immunol Methods* v. 286, v. 1-2, p. 203-217, 2004.
- PETROVSKIS, E. A.; TIMMINS, J. G.; ARMENTROUT, M. A. et al. DNA sequence of the gene for pseudorabies virus gp50, a glycoprotein without N-linked glycosylation. *J Virol*, v. 59, n. 2, pp. 216-223, 1986
- PIATTI, R.M. et al. Characterization of Aujeszky's disease virus isolates from south and southeast Brazil by RFLP analysis. *Bra. J. Mic.*, v.32, p.144-146, 2001.
- POMERANZ, L.E.; REYNOLDS, A.E.; HENGARTNER, C.J. Molecular biology of pseudorabies virus: impact on neurovirology and veterinary medicine. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, v.69, p.462-500, 2005.
- POWERS, J.G.; VANMETRE, D.C.; COLLINS, J.K. et al. Evaluation of ovine herpesvirus type 2 infections, as detected by competitive inhibition ELISA and polymerase chain reaction assay, in dairy cattle without clinical signs of malignant catarrhal fever. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* v.227, p.606-611, 2005.
- PONCHEL, F., TOOMES, C., BRANSFIELD, K. et al. Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: an alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnol.* v. 13, p. 3-18, 2003.
- PRILOUSKY J, FELDER CE, ZEEV-BEN-MORDEHAI T, et al. FoldIndex: a simple tool to predict whether a given protein sequence is intrinsically unfolded. *Bioinformatics.* v. 21, n. 16, p. 3435-8, 2005.
- PRIOLA, S. A., STEVENS, J. G. The 5' and 3' limits of transcription in the pseudorabies virus latency associated transcription unit. *Virology*, v. 182, n. 2, p. 852-858, 1991.
- RADIVOJAC, P., OBRADOVIC, Z., BROWN, C.J. et al. Prediction of boundaries between intrinsically ordered and disordered protein regions. *Pac. Symp. Biocomput.*, v. 8, p. 216-227, 2003.
- RAMÍREZ, O., OJEDA, A., TOMÀS, A. et al. Integrating Y-chromosome, mitochondrial, and autosomal data to analyze the origin of pig breeds. *Mol Biol Evol.* V. 26, N. 9, p. 2061-72, 2009.
- RAPP-GABRIELSON, S.R. OLIVEIRA, C., PIJOAN. *Haemophilus parasuis*. In: B. Straw, J.J. Zimmerman, S. D'Allaire and D.J. Taylor, Editors, Diseases of Swine, Blackwell Publishing, Williston, FL, USA, pp. 681-690, 2006.
- Ratcliff, R. M., Chang, G., Kok, T. et al.. Molecular diagnosis of medical viruses. *Curr Issues Mol Biol.* v. 9, n. 2, p. 87-102, 2007.

- REGISTER K.B., DEJONG, K.D. Analytical verification of a multiplex PCR for identification of *Bordetella bronchiseptica* and *Pasteurella multocida* from swine. *Vet Microbiol.* 2006 Oct 31;117(2-4):201-10.
- RICHTZENHAIN, L.J.; BARBARINI, O.; UMEHARA, O. et al. Rinotraqueíte infecciosa bovina: levantamento sorológico nos estados de Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná e Rio Grande do Sul. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.66, p.83-88, 1999.
- RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; FERNANDES, C.G. Enfermidades do sistema nervoso dos ruminantes no sul do Rio Grande do Sul. *Cienc. Rural*, v. 28, p.341-348, 1998.
- RISSI, D.R.; RECH, R..R.; FLORES, E.F. et al. Meningoencefalite por herpesvírus bovino-5. *Pesq. Vet. Bras.*, v.27, p.251-260, 2007.
- RISSI, D.R.; PIEREZAN, F, E SILVA, M.S. et al. Neurological disease in cattle in southern Brazil associated with Bovine herpesvirus infection. *J Vet Diagn Invest.*, v.20, p.346-349, 2008.
- RISSI, D. R., OLIVEIRA, F. N., RECH, R. R. et al. Epidemiologia, sinais clínicos e lesões encefálicas em bovinos afetados por meningoencefalite por herpesvírus bovino-5. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 26, n. 2, p. 123-132, 2006.
- RODRIGUEZ, S.M., GOLEMBA, M.D., CAMPOS, R.H. et al. Bovine leukemia virus can be classified into seven genotypes: evidence for the existence of two novel clades. *J Gen Virol.* v. 90, n. 11, p. 2788-97, 2009.
- RODRÍGUEZ-ARRIOJA, G.M., SEGALÉS, J., ROSELL C. et al. Aujeszky's disease virus infection concurrent with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *Vet Rec.* v. 144, n. 6, p. 152-3, 1999.
- ROMERO CH, MEADE PN, HOMER BL, SHULTZ JE, LOLLIS G. Potential sites of virus latency associated with indigenous pseudorabies viruses in feral swine. *J Wildl Dis.* v. 39, n. 3, p. 567-75, 2003.
- ROZEN, S.; SKALETSKY, H.J. Primer3. Code available at <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>. Acesso em: 12 dez. 2008.
- ROSENDAHL, S., AND W. R. MITCHELL. Epidemiology of *Haemophilus pleuropneumoniae* infection in pigs. *Can. J. Comp. Med.* v. 47, p. 1-5, 1983.
- RUIZ-FONS, F., VIDAL, D., HÖFLE, U. et al. Aujeszky's disease virus infection patterns in European wild boar. *Vet Microbiol.* v. 120, n. 3-4, p. 241-50, 2007.
- RUSSELL, G.C.; STEWART, J.P.; HAIG, D.M. Malignant catarrhal fever: a review. *Vet J.*, v.179, p.324-335, 2009.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd ed. N.Y.: Cold Spring Harbor, 1989.
- SÁMI, L. et al. Simultaneous detection of three porcine viruses by multiplex PCR. *Acta Vet. Hun.*, v. 55, n 2, 267-276, 2007.
- SAITOU N, NEI M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* v. 4, n. 4, p. 406-25, 1987.
- SAKAOKA, H., KURITA, K., IIDA, Y. et al. Quantitative analysis of genomic polymorphism of herpes simplex virus type 1 strains from six countries: studies of molecular evolution and molecular epidemiology of the virus. *J Gen Virol.* v. 75, p. 513-27, 1994.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: A laboratory manual. 2.ed. New York: Cold Spring Harbor, 1989.

- SALWA A. et al. A natural outbreak of Aujeszky's disease in farm animals. *Pol J Vet Sc*, v. 7, n. 4, p. 261-6, 2004.
- SCANDURA, M., IACOLINA, L., CRESTANELLO, B. et al. Ancient vs. recent processes as factors shaping the genetic variation of the European wild boar: are the effects of the last glaciation still detectable? *Mol Ecol*. V. 17, n. 7, p. 1745-62, 2008.
- SCHAEFER, R. et al. Characterization of Aujeszky's disease virus isolated from South Brazil in the last twenty years by restriction enzyme analysis. *Br. J. Mic*. v.37, n.3, p.390-394, 2006.
- SCHREIBER, M. J., HOLMES, E. C., ONG, S. H. et al. Genomic epidemiology of a dengue virus epidemic in urban Singapore. *J Virol*. v. 83, n.,9, p. 4163-4173, 2009.
- SERENA MS, METZ GE, MÓRTOLA EC, ECHEVERRÍA MG. Phylogenetic analysis of Suid Herpesvirus 1 isolates from Argentina. *Vet. Microbiol*. V. 154, n. 1-2, p.78-85, 2011.
- SHAIN, E.B., CLEMENS, J.M. A new method for robust quantitative and qualitative analysis of real-time PCR. *Nucleic Acids Res*. v. 36, n. 14, :e91, 2008.
- SIBILA, M., PIETERS, M., MOLITOR, T., MAES, D., HAESEBROUCK, F., SEGALÉS, J. Current perspectives on the diagnosis and epidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. *Vet J*. v. 181, n. 3, p. 221-31, 2009.
- SILVA, A.D. et al. Caracterização antigênica e molecular de oito amostras do vírus da doença de Aujeszky isoladas no estado do Rio Grande do Sul em 2003. *Pesq. Vet. Bras*. v.25, n.1, p. 21-24, 2005.
- SOBESTIANSKY J., BARCELLOS D.E.S.N., MORES N. et al.. *Clínica e Patologia Suína*. 2ª ed. Goiânia, Goiás. 1999, 463p.
- de SOUZA, R.P., FOSTER, P.G., SALLUM, M.A. et al. Detection of a new yellow fever virus lineage within the South American genotype I in Brazil. *J Med Virol*. v. 82, n. 1, p. 175-85, 2010.
- SOWMYA, P., MADHAVAN, H. N, Analysis of mixed infections by multiple genotypes of human cytomegalovirus in immunocompromised patients. *J Med Virol*, v. 81, n. 5, p. 861-869, 2009.
- Staroscik, A. Calculator for determining the number of copies of a template. Disponível em: <http://www.uri.edu/research/gsc/resources/cndna.html>. 2004. Acesso em: 20 abril 2009.
- STERN, A., DORON-FAIGENBOIM, A., EREZ, E. et al. Selecton 2007: advanced models for detecting positive and purifying selection using a Bayesian inference approach. *Nucleic Acids Res*. v. 35(Web Server issue):W506-11, 2007.
- SUTHERLAND MA, RODRIGUEZ-ZAS SL, ELLIS M, et al. Breed and age affect baseline immune traits, cortisol, and performance in growing pigs. *J Anim Sci*. v. 83, n. 9, p. 2087-95, 2005.
- Taharaguchi, S., Kobayashi, T., Yoshino, S. et al. Analysis of regulatory functions for the region located upstream from the latency-associated transcript (LAT) promoter of pseudorabies virus in cultured cells. *Vet Microbiol*. v. 85, n. 3, p. 197-208, 2002.
- TAMURA, K., DUDLEY, J., NEI, M. et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol*. v. 24, n. 8, p. 1596-9, 2007.
- Tanaka S, Mannen K. Pregnancy and parturition of mice latently infected with Pseudorabies virus. *Exp Anim*. 2008 Apr;57(2):149-52.

- THACKER, E.L. Immunology of the porcine respiratory disease complex. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* v. 17, n. 3, p. 551-65, 2001.
- THULKE HH, SELHORST T, MÜLLER T. Pseudorabies virus infections in wild boar: data visualisation as an aid to understanding disease dynamics. *Prev Vet Med.* V. 68, n. 1, p. 35-48, 2005.
- THIRY, J.; KEUSER, V.; MUYLKENS, B. et al. Ruminant alphaherpesviruses related to bovine herpesvirus 1. *Vet Res.* v.37, p.169-190, 2006.
- TIPPMANN, H.F. Analysis for free: comparing programs for sequence analysis. *Brief Bioinform.* v.5, p.82-87, 2004.
- TURNI, C., PYKE, M., BLACKALL, P.J. Validation of a real-time PCR for *Haemophilus parasuis*. *J Appl Microbiol.* v. 108, n. 4, p. 1323-31, 2010.
- UNTERGASSER, A.; NIJVEEN, H.; RAO, X. et al. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res.*, v.35, (Web Server issue), W71-W74, 2007.
- USDA, United States Department of Agriculture, 2008. Pseudorabies (Aujeszky's Disease) and Its Eradication: a review of U.S. experience. Disponible http://www.aphis.usda.gov/publications/animal_health/content/printable_version/pseudorabies_report.pdf.
- VIEJO-BORBOLLA, A., MUÑOZ, A., TABARES, E. et al. Glycoprotein G from pseudorabies virus binds to chemokines with high affinity and inhibits their function. *J Gen Virol.* 2009.
- VICENTE J, RUIZ-FONS F, VIDAL D. et al. Serosurvey of Aujeszky's disease virus infection in European wild boar in Spain. *Vet Rec.* V. 56, n. 13, p. 408-12, 2005.
- YAMADA, S. et al. Characterization of Japanese Isolates of Aujeszky's Disease Virus by Restriction Endonuclease Cleavage Patterns, Virulence in Mice and Thymidine Kinase Activity. *J. Vet. Med. Sc.*, v.54, n.3, p.541-549, 1992.
- YANG, Z.R., THOMSON, R., MCNEIL, P. et al. RONN: the bio-basis function neural network technique applied to the detection of natively disordered regions in proteins. *Bioinformatics.* Aug v. 21, n. 16, p. 3369-76, 2005.
- YANG, Z., BIELAWSKI, J.P. Statistical methods for detecting molecular adaptation. *Trends Ecol Evol.* v. 15, n. 12, p. 496-503, 2000.
- YEH H. Y., YATES M. V., CHEN W. ET al.. Real-time molecular methods to detect infectious viruses. *Semin Cell Dev Biol.* v. 20 n. 1, p. 49-54, 2009.
- YOON, H.A. et al. Molecular survey of latent pseudorabies virus infection in nervous tissues of slaughtered pigs by nested and real-time PCR. *J. Microbiol.*, v.43, n.5, p.430-436, 2005.
- YOON, H.A.; EO, S.K.; ALEYNAS, A.G. et al. Investigation of pseudorabies virus latency in nervous tissues of seropositive pigs exposed to field strain. *J. Vet. Med. Sci.*, v.68, p.143-148, 2006.
- YUE, F., CUI, S., ZHANG, C. et al. A multiplex PCR for rapid and simultaneous detection of porcine circovirus type 2, porcine parvovirus, porcine pseudorabies virus, and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in clinical specimens. *Virus Genes.* v. 38, n. 3, p. 392-7, 2009.
- WAGENAAR, T.R., CHOW, V.T., BURANATHAI, C. et al. The out of Africa model of varicella-zoster virus evolution: single nucleotide polymorphisms and private alleles distinguish Asian clades from European/North American clades. *Vaccine.* v. 21, n. 11-12. p. 1072-81, 2003.

WANG, N., BALDI, P.F., GAUT, B.S. Phylogenetic analysis, genome evolution and the rate of gene gain in the Herpesviridae. *Mol Phylogenet Evol.* v. 43, n. 3, p. 1066-75, 2007.

WEIGEL, R.M.; SCHERBA, G. Quantitative assessment of genomic similarity from restriction fragment patterns. *Prev. Vet. Med.*, v.32, p.95-110, 1997.

WHITE, A. K., CIACCI-ZANELLA, J., GALEOTA, J. et al. Comparison of the abilities of serologic tests to detect pseudorabies-infected pigs during the latent phase of infection. *Am J Vet Res.* 1996 May;57(5):608-11.

WYCKOFF, A.C., HENKE, S.E., CAMPBELL, T.A. et al. Feral swine contact with domestic swine: a serologic survey and assessment of potential for disease transmission. *J Wildl Dis.* v. 45, n. 2, p. 422-9, 2009.

ZANELLA J. R. C., MORÉS N. 2001. Estimativa de impacto econômico anual da doença de Aujeszky para a suinocultura do estado de Santa Catarina. Embrapa Suínos e Aves. Comunicado Técnico, 294.

ZHOU, Z.H., CHEN, D.H., JAKANA, J. et al. Visualization of tegument-capsid interactions and DNA in intact herpes simplex virus type 1 virions. *J Virol.* v. 73, n. 4, p. 3210-8, 1999.

ZUCKERMANN, F. A. Aujeszky's disease virus: opportunities and challenges. *Vet Res.* v. 31, n. 1, p. 121-31, 2000.