

Guilherme Domingos Romano Oliveira

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE HERPESVIRUS BOVINOS POR
ANÁLISE DA REGIÃO CODIFICADORA DA GLICOPROTEÍNA G.**

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

Área: Medicina Veterinária Preventiva

Orientadora: Profa. Dra. Edel Figueiredo Barbosa Stancioli

**Belo Horizonte
Escola de Veterinária da UFMG
2006**

O48c Oliveira, Guilherme Domingos Romano, 1977-
Caracterização molecular de herpesvírus bovinos por análise da região
codificadora da glicoproteína G. / Guilherme Domingos Romano Oliveira. – 2006.
55 p. : il.

Orientadora: Edel Figueiredo Barbosa Stancioli
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de
Veterinária
Inclui bibliografia

1. Bovino – Doenças – Teses. 2. Vírus do herpes em animais – Diagnóstico –
Teses. 3. Glicoproteínas – Teses. 4. reação em cadeia de polimerase – Teses. I. Stancioli,
Edel Figueiredo Barbosa. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária.
III. Título.

CDD – 636.208 969 2

Dissertação defendida e aprovada em 10 de Abril de 2006 perante a Comissão Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Edel Figueiredo Barbosa Stancioli
(Orientadora)

Profa. Dra. Clarice Weis Arns

Prof. Dr. Nelson Rodrigo da Silva Martins

Prof. Dr. Maurílio Andrade Rocha

**À minha mãe, Déa;
Ao meu pai, Arnaldo;
Ao meu irmão, Gustavo.**

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por todo incentivo e apoio que me deram, dão e, sei, darão em tudo que eu faça;

Ao Gustavo por ser, mesmo à distância, modelo de inteligência e sucesso;

Às minhas avós Anita e Maria, pelo que carinho de sempre;

Ao meu avô Perciliano, por ser a pessoa mais carismática e exemplar que um neto poderia sonhar em ter;

À Amanda, por toda paciência, carinho, incentivo, ajuda e puxões de orelha que já me deu. Além, é claro, de me fazer a pessoa mais feliz do mundo;

À professora Edel, por ter aberto a porta para um estranho, aceitado-me em sua casa, dando-me confiança e nunca desistido. Algumas vezes fora o único motivo para que eu seguisse em frente. Obrigado por tudo;

À Haleta, por tudo. Não sei como expressar a gratidão e admiração que sinto. Nada que aqui está tomaria forma sem sua áurea por trás. Você me fez enxergar, refletir e pensar;

À Dani, também por tudo! Obrigado por todos os conselhos, ajuda, dicas, persistência e apoio;

Ao professor Maurílio, pelo exemplo de serenidade e harmonia. Responsável pelo começo de tudo isso...;

Ao professor Rômulo, por ter me dado apoio durante toda a graduação;

Ao Dr. Christian Hirsch por todo apoio, incentivo e por ter sido um exemplo a ser seguido;

Aos colegas de laboratório que, por tantas vezes compartilharam alegrias e frustrações: Antônio Claret, Rafael, Giovana, Marcos Xavier e Ana Elisa;

Aos companheiros de laboratório que sempre me socorreram: Ângela, Leandro Lessa, Eduardo e Doracy;

Aos melhores amigos que se pode ter, por serem o que são e me aceitarem como sou: Ana Helena, Anders, Cecília, Fernandinha, Cris Alves, Gui, Graveto, Douglas, Sola, Mauricinho, Ana McGraw e Tamara.

SUMÁRIO	Pág.
LISTA DE ABREVIATURAS	11
RESUMO	13
ABSTRACT	13
1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1. Família <i>Herpesviridae</i>	17
2.2. Herpesvírus Bovinos	17
2.3. Glicoproteínas Virais	18
2.4. Patogenia	19
2.5. Latência.....	21
2.6. Diagnóstico	21
2.6.1. Diagnóstico Clínico	21
2.6.2. Diagnóstico Laboratorial	21
2.6.2.1. Identificação do agente viral	21
2.6.2.2. Detecção do antígeno viral	22
2.6.2.3. Diagnóstico sorológico.....	22
2.6.2.4. Diagnóstico por técnicas moleculares	23
2.7. Prevenção e Controle	23
2.8. Ensaio da Mobilidade de Heteroduplex (HMA).....	24
3. MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1. Amostras Utilizadas	25
3.1.1. Amostras padrão.....	25
3.1.2. Amostras testadas	27
3.2. Cultivo celular.....	27
3.3. Extração do DNA	27
3.4. PCR.....	28
3.4.1. Condições das reações	28
3.5. Análise dos produtos de PCR.....	29
3.6. Restrição enzimática dos produtos de PCR	29
3.7. Purificação dos produtos de PCR.....	29
3.8. Seqüenciamento e análise das seqüências.....	29
3.9. Análise Filogenética das seqüências.....	29
3.10. Ensaio da Mobilidade de Heteroduplex (HMA).....	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1. Padronização da PCR semi- <i>nested</i>	31
4.2. PCR semi- <i>nested</i> das amostras clínicas	31
4.3. Análise do perfil enzimático	32
4.4. Análise do Ensaio da Mobilidade de Heteroduplex (HMA).....	34
4.5. Análise por seqüenciamento dos produtos de PCR.....	41
4.6. Relato de co-infecção entre <i>Herpesvírus Bovino 5</i> e <i>Vírus Respiratório Sincicial Bovino</i>	49
5. CONCLUSÕES	50
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 01	Amostras virais utilizadas neste trabalho.....	26
Tabela 02	Tamanho do amplicon esperado para cada subtipo viral, seqüência, orientação e localização dos iniciadores.....	28

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação do HMA. A faixa de heteroduplexes abaixo das fitas simples e acima dos homoduplexes é que é lida como a tipagem.....	30
Figura 2	Gel de agarose 1,2% corado por brometo de etídio, com a seguinte seqüência de amostras: Canaleta 1: Padrão de tamanho molecular (100pb ladder - Invitrogen); Canaleta 2: Controle negativo – mix de reagentes; Canaleta 3: Colorado (PCR externa); Canaleta 4: Colorado (PCR interna); Canaleta 5: K22 (PCR externa); Canaleta 6: K22 (PCR interna); Canaleta 7: EVI-88 (PCR externa); Canaleta 8: EVI-88 (PCR interna)	31
Figura 3	Eletroforese em gel de agarose 1,2% apresentando resultado da pesquisa do gene da β -actina nas 17 amostras provenientes de cultivo celular. PM: Padrão de tamanho molecular (100bp ladder – Invitrogen); CN: controle negativo – mix de reagentes. Canaletas 1:EVI-88; 2:728; 3:MVA; 4:MVB; 5:711; 6:KA98; 7:BG; 8:BA; 9:VS; 10:DF; 11:Colorado; 12:DQ; 13:Mutum; 14:1184; 15:93;16:99;17:60.....	32
Figura 4	Resultado da PCR <i>semi-nested</i> observada em gel de agarose 1,2%. PM: Padrão de tamanho molecular (100bp ladder – Invitrogen); CN: controle negativo – mix de reagentes. Canaletas 1:EVI-88; 2:MVB; 3:BG; 4:DF; 5:Colorado; 6:1184; 7:93; 8:99; 9:60	32
Figura 5	Análise de perfil de restrição enzimática. Canaletas pares e ímpares: amostra e amostra restringida com <i>Xho</i> I, respectivamente. Canaletas 1 e 2: EVI-88 (BoHV-5); canaletas 3 e 4: Colorado (BoHV-1.1); canaletas 5 e 6: K22 (BoHV-1.2). Marcador de tamanho molecular - 100pb ladder (Invitrogen)	33
Figura 6	Figura 6 – Análise de perfil de restrição enzimática. Canaletas: 1:MVB; 2:MVB-R; 3:711; 4:711-R; 5:DF; 6:DF-R; 7: Colorado (cultivo celular); 8:Colorado-R; 9:1184; 10:1184-R; 11:93; 12:93-R; 13:99; 14:99-R; 15:60; 16:60-R; Canaleta 17 – Controle negativo de reação. R = amostra restringida com a enzima <i>Xho</i> I. Canaleta 18: marcador molecular 100pb ladder Invitrogen	34
Figura 7	HMA - Canaletas: 1- Colorado (padrão); 2- K22 (padrão); 3- EVI-88 (padrão); 4 – MVB e água; 5 – MVB e Colorado; 6 – MVB e K22; 7 – MVB e EVI-88; 8 – 711 e água; 9 – 711 e Colorado; 10 – 711 e K22; 11 – 711 e EVI-88; 12 – BG e água; 13 – BG e Colorado (padrão); 14 – BG e K22; 15 – BG e EVI-88; 16 – Mutum e água; 17 – Mutum e Colorado; 18 – Mutum e K22; 19 – Mutum e EVI-88	35

Figura 8	HMA - Canaletas: Colorado (padrão); 2- K22 (padrão); 3- EVI-88 (padrão); 4 – KA e água; 5 - KA e Colorado; 6- KA e K22; 7 – KA e EVI-88; 8 – BA e água; 9 – BA e Colorado (padrão); 10 – BA e K22; 11 – BA e EVI-88; 12 – VS e água; 13 – VS e Colorado; 14 – VS e K22; 15 – VS e EVI-88; 16 – DQ e água; 17 – DQ e Colorado; 18 – DQ e K22; 19 – DQ e EVI-88	37
Figura 9	HMA - Canaletas: 1 - Colorado (padrão); 2- K22; 3- EVI-88 (padrão); 4 – 1184 e água; 5 – 1184 e Colorado; 6 – 1184 e K22; 7 – 1184 e EVI-88; 8 – 93 e água; 9 – 93 e Colorado; 10 – 93 e K22; 11 – 93 e EVI-88; 12 – 99 e água; 13 – 99 e Colorado; 14 – 99 e K22; 15 – 99 e EVI-88; 16 – 60 e água; 17 – 60 e Colorado; 18 – 60 e K22; 19 – 60 e EVI-88.....	39
Figura 10	Alinhamento de parte da região codificadora da gG – isolados clínicos usando como seqüência líder a amostra AY261359, protótipo mundial de BoHV-5 previamente depositada no GenBank	43
Figura 11	Alinhamento das amostras seqüenciadas, com os padrões de BoHV-1.1 e BoHV-1.2 depositadas previamente no GenBank, além da seqüência das amostras padrão BoHV-1.1/Colorado e BoHV-5/EVI-88, seqüenciadas em nosso laboratório	45
Figura 12	Árvores filogenéticas das seqüências da glicoproteína G de BoHV. Estas foram construídas a partir de seqüências de 258 nucleotídeos codificadores da glicoproteína G de diferentes amostras de herpesvírus bovino. O alinhamento destas foi utilizado na construção da árvore, ambos utilizando-se o programa MEGA. Foi utilizado o método Neighbor-Joining nas análises, com 1000 réplicas de bootstrap. 12A – somente amostras de BoHV-5. 12B – BoHV-5 e BoHV-1	48

QUADRO

Quadro 1	Perfil de restrição das amostras padrão de BoHV-1.1, BoHV-1.2 e BoHV-5.....	33
----------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Adenina
BoHV-1.1	Herpesvírus Bovino 1 subtipo 1
BoHV-1.2	Herpesvírus Bovino 1 subtipo 2
BoHV-1.2a	Herpesvírus Bovino 1 subtipo 2 ^a
BoHV-1.2b	Herpesvírus Bovino 1 subtipo 2b
BoHV-4	Herpesvírus Bovino 4
BoHV-5	Herpesvírus Bovino 5
BVD	Diarréia bovina a virus
BRSV	Vírus Respiratório Sincicial Bovino
C	Citosina
CP	Controle positive
CRIB	Células MDBK isentas de BVDV
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
Dntp	Desoxinucleotídeo
ECP	Efeito citopático
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
G	Guanina
gG	Glicoproteína G
HIV	Human Immunodeficiency vírus
HMA	Heteroduplex Mobility Assay
IBR	Rinotraqueíte Infecciosa Bovina
IR	Repetição Interna
L	Litros
LR	Relacionado a latência
M	Molar
Mg	Miligramas
mM	Milimolar
MDBK	Madin-Darby bovine kidney
Ng	Nanograma
ORFs	“Open Reading Frame” – janela aberta de leitura
Pb	Pares de bases
PCR	Polymerase chain reaction
PM	Marcador molecular
Pmol	pico mol
q.s.p.	Quantidade suficiente para
RNA	Ácido ribonucléico
SFB	Soro fetal bovino
SNC	Sistema Nervoso Central
T	Timidina

TBE	Tris-borato-EDTA
TCID	Dose infectante para cultura de tecidos
TR	Repetição terminal
UI	Unidade Internacional
UL	Região Única Longa
US	Região Única Curta
US4	Segmento curto único 4
UV	Ultravioleta
V	Volts
μl	Microlitros

RESUMO

Foi padronizada uma técnica de PCR que amplifica parte da região codificadora da gG dos herpesvírus bovinos. A mesma foi capaz de detectar amostras padrão de BoHV-1.1 (Colorado – ATCC 864), BoHV-1.2 (K22) e BoHV-5 (EVI-88). O teste mostrou-se também eficiente em amplificar seqüências do gene codificador de gG de BoHV em amostras clínicas provenientes de sêmen, SNC e swab nasal, após isolamento em cultivo celular. A especificidade do teste foi testada por restrição dos produtos da PCR com a enzima *Xho*I e também pelo seqüenciamento dos amplicons. A região trabalhada mostrou-se eficiente na separação de amostras de BoHV-1 e BoHV-5. Para a região estudada, e, nas condições trabalhadas, o ensaio da mobilidade de heteroduplex (HMA) não apresentou resultados satisfatórios na diferenciação das amostras. Foi descrito durante este trabalho um caso de co-infecção do *Vírus Respiratório Sincicial Bovino* (BRSV) e BoHV-5 em vacas de uma propriedade leiteira, no interior de Minas Gerais, evidenciando a necessidade de melhoria e disponibilização de testes diagnósticos eficientes em Medicina Veterinária. Este relato evidenciou também o envolvimento do *Herpesvírus Bovino* 5 em quadros respiratórios e em animais adultos em fase de lactação.

Palavras-chave: BoHV 1; BoHV 1.2; BoHV 5; BRSV; PCR; seqüenciamento; co-infecção.

ABSTRACT

A semi-nested PCR was standardized to amplify the gG coding region of Bovine Herpesvirus (BpHV). This PCR was able to identify standard sample of BoHV-1.1 (Colorado – ATCC 864), BoHV-1.2 (K22) and BoHV-5 (EVI-88). This test was also efficient in indentifying infection of cell cultures inoculated with material from semen, nasal swabs and central nervous system (CNS). The efficiency of the test was evaluated by restriction endonuclease assay with *Xho*I and by the amplicons sequencing. The genic region used showed to be efficient in identifying BoHV-1 and BoHV-5 in samples. For the regions and conditions used, the Heteroduplex Mobility Assay (HMA) showed to be unsatisfactory for differentiating subgroups. A co-infection of Bovine Syncytial Virus (BRSV) and BoHV-5 was detected in cows of a dairy farm. This report has also showed BoHV-5 involved in respiratory disorder in adult animals.

Keywords: BoHV 1; BoHV 1.2; BoHV 5; BRSV; PCR; sequencing; co-infection.

1. INTRODUÇÃO

Os Herpesvírus bovinos são agentes presentes em rebanhos bovinos de forma ampla, com ocorrência descrita em gado leiteiro e de corte, criados de forma intensiva ou a pasto. Como importantes agentes na bovinocultura, destacam-se os *Herpesvírus bovino 1* (Vírus da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina - BoHV-1) e *Herpesvírus bovino 5* (Vírus da Encefalite Bovina - BoHV-5), sendo o BoHV-1 classificado em três subtipos: BoHV-1.1, BoHV-1.2a e BoHV-1.2b. A transmissão dos Herpesvírus ocorre via aerossóis ou contato com animais portadores, via secreções, principalmente em estágio de grande viremia. A infecção ocorre ainda pelo compartilhamento de água e alimentos, além de fômites contaminados e infecção via sêmen, o que demonstra a grande importância dos Herpesvírus de ruminantes no manejo reprodutivo dos animais.

Apesar da grande homologia entre os *Herpesvírus bovino 1* e *5* (cerca de 85% de similaridade gênica), a patogênese e curso clínico diferenciados em alguns aspectos necessitam de mais estudos elucidativos. O BoHV-1 é o agente causal da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR), Vulvovaginite Pustular Infecciosa, Balanopostite, além de quadros de infertilidade, conjuntivite, ceratoconjuntivite, queda em índices de concepção e índices reprodutivos, além de baixa produção leiteira. O BoHV-5 é o agente etiológico responsável pela meningoencefalite não supurativa, patologia que acomete o sistema nervoso central (SNC) do animal e apresenta um alto índice de mortalidade, principalmente entre animais jovens, já descrita em rebanhos nacionais (MG, ES, MT, PR, RS e SP) e no exterior, na Europa, Oceania e América do Norte. O diagnóstico clínico não é simples, merecendo especial atenção devido à similaridade dos sintomas com os apresentados em outras doenças infecciosas ou não. Sintomas causados por BoHV-5 são freqüentemente confundidos com os causados por outras moléstias que acometem o sistema nervoso central, como

a poliencefalomalácia, botulismo e principalmente a raiva, evidenciando a sua importância também no tocante à Saúde Pública, em relação ao diagnóstico diferencial.

Os métodos tradicionais de diagnóstico, como isolamento e neutralização viral, imunofluorescência e imunoperoxidase, embora de grande importância, são ineficientes quanto à diferenciação entre os tipos e subtipos de Herpesvírus bovinos, devido à sua grande semelhança antigênica, genética e biológica. Pesquisadores descrevem, inclusive, dificuldade na produção de anticorpos monoclonais que não apresentam reatividade cruzada entre os dois vírus. Nos últimos anos, pesquisadores têm desenvolvido com sucesso testes moleculares baseados em PCR para a melhoria do diagnóstico destes agentes, principalmente na diferenciação entre o BoHV-1 e 5.

A importância do desenvolvimento de testes moleculares rápidos e específicos para o diagnóstico de rotina dos Herpesvírus bovinos é ressaltada por sua ampla disseminação e pelos números da pecuária nacional que, segundo o IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2005), atingiu 205 milhões de cabeças em 2005. Levantamentos sorológicos realizados no Brasil têm demonstrado prevalência de animais soropositivos para o BoHV-1, variável de 27% a 87%, indicando que o vírus está amplamente distribuído no país. Segundo a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), nos anos de 2000 a 2003 foram detectados no Brasil 303 surtos da doença, sendo o número de casos estimados em 1.396 de 124.434 animais vacinados (Brazil/Infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis - MULTIANNUAL ANIMAL DISEASE STATUS - <http://www.oie.int/hs2/>). Estes dados são somente relativos ao BoHV-1, não havendo estimativa ou descrição de sorologia e/ou surtos para BoHV-5 e, certamente estão subestimados, devido ao baixo número de notificações aos órgãos oficiais.

Nosso grupo de pesquisa trabalhou com alguns surtos de BoHV-5 (isolamento e detecção do agente por PCR à partir de SNC) de 2000 a 2005, em regiões geográficas distintas de nosso Estado, mostrando a ampla disseminação do agente em rebanhos bovinos de Minas Gerais.

Destacando-se a disseminação viral via sêmen (tanto para o BoHV-1 quanto para o BoHV-5) e, considerando-se que a OIE preconiza a identificação do agente no sêmen (embora no Brasil este controle não seja obrigatório), especial atenção deve ser dada a este insumo.

A ASBIA (Associação Brasileira de Inseminação Artificial - <http://www.asbia.org.br/>) relatou grande crescimento do setor nos últimos cinco anos, próximo a 30%, ou seja, mais que o dobro do PIB (Produto Interno Bruto) brasileiro. Embora somente 6 a 7% das fêmeas em idade reprodutiva sejam inseminadas no Brasil, é considerada expressiva a comercialização de aproximadamente 35 milhões de doses de sêmen de 2000 a 2004.

Esse trabalho foi desenvolvido com o objetivo de se padronizar um teste de PCR sensível e específico para a detecção dos Herpesvírus bovinos em amostras clínicas, como ferramenta auxiliar no diagnóstico de rotina. Foi ainda testado o ensaio da Mobilidade de Heteroduplex (HMA) para a subtipagem das amostras trabalhadas. Este teste vem sendo realizado com sucesso para a tipificação do vírus HIV e das Micobactérias. Utilizou-se como região gênica de eleição a região única curta 4 (US4) codificadora da glicoproteína G. Essa glicoproteína tem a particularidade de ser útil na diferenciação de BoHV-1 e BoHV-5, por conter regiões com trocas de nucleotídeos e regiões de deleção em sua região codificadora, na comparação entre estes vírus.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Os Herpesvírus estão altamente disseminados nos rebanhos bovinos, sendo apontados como um dos principais agentes

indutores de redução na produção bovina nacional e mundial. O *Herpesvírus bovino 1* e *Herpesvírus bovino 5* induzem quadros clínicos diferenciados, sendo que o primeiro é correlacionado a quadros respiratórios e reprodutivos (abortos, retorno ao cio e quadros de rinotraqueíte) e, o segundo, causador de meningoencefalite de curso geralmente fatal. Os Herpesvírus bovinos são normalmente transmitidos diretamente por aerossol ou contato próximo entre os animais infectados como, por exemplo, na transmissão venérea. A transmissão indireta pode ocorrer em alimentos e água contaminados com secreções, inseminação artificial, entre outros.

Em 1978 ocorreu o primeiro isolamento de BoHV-1 no Brasil (Alice, 1978), no estado da Bahia, à partir de pústulas vaginais de vacas. No mesmo período, Mueller e colaboradores (1978) isolaram o vírus da IBR do rim de um feto, no estado de São Paulo. Esses foram os primeiros isolamentos, seguidos por inúmeros relatos de doenças respiratória, reprodutiva e neurológica em outros rebanhos brasileiros. Sua importância na bovinocultura é relevante por, entre outros motivos, ser o agente viral mais frequentemente encontrado no sêmen, importante fonte de disseminação viral (Afshar e Eaglesome, 1990).

O primeiro relato de meningoencefalite não supurativa no Brasil foi feito no estado do Rio Grande do Sul, por Correa e colaboradores (1989). Desde então, alguns surtos esporádicos foram relatados no Rio Grande do Sul, Mato Grosso do Sul (Salvador et al., 1998), Paraná, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Espírito Santo e São Paulo (Gomes et al., 2002). Um problema encontrado no diagnóstico clínico da infecção por BoHV-5 é a facilidade com que se podem confundir os sintomas neurológicos com outras patologias, como raiva, poliencfalomalácia e intoxicação por chumbo.

Segundo Roehe et al. (1998) ainda não é possível saber a prevalência do BoHV-5 no rebanho nacional devido aos diagnósticos errôneos, falta de um diagnóstico prático

que possa diferenciar BoHV-5 e BoHV-1, além do reduzido número de laboratórios no Brasil capazes de realizar diagnóstico virológico. As formas de transmissão do BoHV-5 são semelhantes às do BoHV-1, tendo sido demonstrada inclusive a transmissão via sêmen (Esteves et al., 2003; Gomes et al., 2003), o que ressalta a importância de testes diagnósticos tanto em touros quanto em partidas de sêmen utilizadas por Centrais de Inseminação Artificial.

Os Herpesvírus bovinos são responsáveis por grandes perdas econômicas em rebanhos tanto no Brasil, como no exterior. No Brasil, com um efetivo bovino de cerca de 205 milhões de cabeças (IBGE, 2005), é apontada uma distribuição nacional do *Herpesvírus bovinos 1* e, já foram descritos casos de encefalite atribuídos ao *Herpesvírus bovino 5* nos estados de Mato Grosso do Sul, Rio Grande do Sul e Paraná, São Paulo e Rio de Janeiro (Flores, 1996), além de toda a região sudeste (Gomes et al., 2002) referendando a sua importância como agente causador de doença e baixos índices produtivos em nosso meio.

2.1 - Família *Herpesviridae*

Os Herpesvírus bovinos são agentes pertencentes à família *Herpesviridae*, cujas principais características são a presença de um cerne contendo DNA linear de fita dupla e um capsídeo icosadeltahédrico de, aproximadamente, 171nm (BoHV-1) e 123-136nm (BoHV-5) de diâmetro e 162 capsômeros (Afonso, 2005, comunicação pessoal). Já tendo sido encontrados na maior parte das espécies animais, os Herpesvírus são diferenciados, principalmente, devido ao tropismo por diferentes hospedeiros e/ou diferentes propriedades antigênicas e/ou estrutura do DNA viral (Roizman, 1992). Até o momento já foram identificados cerca de 100 Herpesvírus, o que evidencia sua ampla disseminação na natureza.

A família *Herpesviridae* possui três subfamílias que compartilham, entre outras características, a capacidade de permanecerem latentes em células

específicas dos hospedeiros (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/index.htm>). As subfamílias são denominadas *Alpha*, *Beta* e *Gammaherpesvirinae*, sendo os vírus das subfamílias *Alpha* e *Gammaherpesvirinae* os responsáveis por infecções em ruminantes.

Entre as subfamílias, a que apresenta taxa mais lenta de replicação e, conseqüentemente, induz ao fenômeno de citomegalia é a *Betaherpesvirinae*. São membros dessa subfamília os gêneros *Cytomegalovirus*, *Muromegalovirus*, e *Roseolovirus* que possuem como representantes o *Herpesvirus humano 5*, *Herpesvirus murino 1* e *Herpesvirus humano 6*, respectivamente. Ao contrário dos membros da subfamília *Betaherpesvirinae*, os *Alphaherpesvirinae* possuem um ciclo reprodutivo rápido, causando grande taxa de destruição celular nos tecidos infectados.

Os membros da subfamília *Alphaherpesvirinae* apresentam uma ordem constante na forma de sua organização gênica, ocorrendo pouca alteração na forma de aparecimento da maioria dos genes quando comparados diferentes herpesvírus (Engels e Ackermann, 1996). Dentre os membros dessa subfamília estão os gêneros *Simplexvirus*, *Varicellovirus*, *Mardivirus* e *Iltovirus*, onde estão alocados dentre outros, o *Herpesvirus bovino 2*, os *Herpesvirus bovinos 1* e *5*, os Herpesvírus da Doença de Marek e o vírus da Laringotraqueíte Infecciosa das Galinhas, respectivamente. A terceira subfamília dos *Herpesviridae* são os *Gammaherpesvirinae*, que possuem como característica uma alta especificidade para determinados hospedeiros, além de infectarem preferencialmente linfócitos T e B e apresentarem indução à oncogênese (Engels e Ackermann, 1996). À essa subfamília pertencem os *Herpesvirus bovino 4* e *Epstein-Barr vírus*.

2.2 - Herpesvírus Bovinos

Segundo Trapp e colaboradores (2003) são descritos quatro grupos de Herpesvírus que infectam bovinos, denominados:

- BoHV-1 (subtipos BoHV-1.1, BoHV-1.2a e BoHV-1.2b), responsáveis pela rinotraqueíte infecciosa bovina, aborto, vulvovaginite pustular infecciosa e balanopostite infecciosa (*Alphaherpesvirinae*, *Varicellovirus*);
- BoHV-2, responsável pela mamilite herpética bovina (*Alphaherpesvirinae*, *Simplexvirus*);
- BoHV-4, membro da subfamília, ao qual ainda não foi atribuído ser causa de nenhuma patologia específica (*Gammaherpesvirinae*, *Rhadinovirus*);
- BoHV-5 (subtipos BoHV-5a, BoHV-5b e BoHV-5c), responsável por alterações neurológicas (*Alphaherpesvirinae*, *Varicellovirus*).

Os Herpesvírus são classificados em seis grupos designados de A a F, devido à presença de seqüências repetidas, assim como quanto ao conteúdo de G+C. O BoHV-1 e o BoHV-5 pertencem ao grupo D, o qual caracteriza-se por possuir duas seqüências únicas, uma longa (UL) e outra curta (US), sendo esta última região flanqueada por duas seqüências invertidas e repetidas, IR (*internal repeat*) e TR (*terminal repeat*) (Fields et al., 2001).

Até o momento, os únicos Herpesvírus de ruminantes que tiveram o seu genoma completamente seqüenciado foram os BoHV-1 e BoHV-5 (este último seqüenciado pelo grupo do Dr. Rudi Weiblein em 2003, tendo sido depositado no GenBank em 2004). O BoHV-5 possui 138390pb, cerca de 2518pb maior que o genoma do BoHV-1, tendo 75% de conteúdo de G+C (para o BoHV-1 o conteúdo é de 72%), e duas seqüências únicas, a U_L composta por 104054pb e a U_S composta por 9548pb. Esta última seqüência é flanqueada por duas regiões invertidas e repetidas de 1210pb cada (IR e TR) (Delhon et al., 2003).

2.3 - Glicoproteínas virais

As proteínas do BoHV-5 são similares àquelas do BoHV-1, totalizando 82% de identidade de aminoácidos (Delhon et al., 2003).

Estes possuem dez genes que codificam para glicoproteínas (gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gK, gL, gM e gN) que, em decorrência de sua localização no envelope viral e na superfície de células infectadas, constituem importante alvo para o sistema imune do hospedeiro (Kaashoek et al., 1998). A localização dos genes codificadores para as glicoproteínas é a mesma, tanto no BoHV-1 quanto no BoHV-5.

As glicoproteínas são responsáveis pela interação vírus/célula, ligação e penetração, transmissão de víriões entre as células e indução de resposta do sistema imune do hospedeiro, como ligações às imunoglobulinas e componentes do sistema complemento. As regiões do genoma viral que codificam para as glicoproteínas despertam um interesse especial entre os pesquisadores, tanto pelas importantes funções das mesmas, quanto como alvo do desenvolvimento de testes diagnósticos. Existem diferenças antigênicas entre as glicoproteínas do BoHV-1 e BoHV-5 e, são relatadas inserções, deleções e trocas nas regiões gênicas que as codifica, facilitando o acesso no diagnóstico molecular diferencial.

A penetração do vírus na célula hospedeira dá-se por uma fusão única do envelope viral com a membrana plasmática seguida do movimento para dentro do citoplasma, através da formação de poros e invaginação da membrana plasmática. O processo compõe-se dos seguintes passos: ligação, fusão, formação de poros e penetração. As glicoproteínas responsáveis por esse processo são as gB, gD, gH e gL. A gB e a gD são as principais proteínas responsáveis pela replicação viral, enquanto as principais responsáveis pela interação com as células são a gB, gC, gD (Schwyzer e Ackermann, 1996).

A glicoproteína G, alvo utilizado neste trabalho, apesar de ser considerada uma glicoproteína não essencial, é importante para a manutenção das junções celulares entre as células infectadas, o que demonstra sua importância na propagação viral, sendo então responsável pela disseminação célula-célula, possuindo ainda

potencial de neurovirulência e prevenção da apoptose (Muylkens et al., 2003).

Nakamichi e colaboradores (2000 e 2001) mostraram que a deleção desta glicoproteína diminui consideravelmente a disseminação viral célula a célula, alterando inclusive o efeito citopático causado pelo vírus nas células hospedeiras, fazendo com que estas fiquem bem mais arredondadas que aquelas infectadas pelos vírus que possuíam a gG.

Essa glicoproteína tem a particularidade de ser útil na diferenciação de BoHV-1 e BoHV-5, uma vez que a região codificadora da mesma apresenta na sua porção final uma deleção no genoma do BoHV-1, em comparação ao BoHV-5, além de pequenas trocas e inserções ao longo do gene.

2.4 - Patogenia

São três as características básicas da infecção pelos herpesvírus: epiteliotropismo, lise celular e capacidade de latência. Segundo Muylkens e colaboradores (2003), na infecção pelos Herpesvírus bovinos 1 e 5, assim como para outros membros da subfamília *Alphaherpesvirinae*, os vírus penetram nos organismos geralmente por uma superfície mucosa, multiplicando-se ativamente nas células epiteliais durante alguns dias, levando à lise das células infectadas e à patologia típica de uma infecção primária. Durante este período de infecção inicial, as partículas virais migram para o sistema nervoso via terminações axonais dos neurônios sensitivos da região afetada. Nessa fase ocorre uma grande viremia no animal, sendo o momento onde a disseminação dá-se de forma mais rápida. Em decorrência dessa grande viremia, o vírus é transportado via axônio aos gânglios sensoriais e, em sua fase aguda, o vírus leva à lise de neurônios e células acessórias (Babiuk et al., 1996; Osório, 1998). Em seguida, o vírus pode tornar-se latente e, após alguns estímulos como tratamentos com corticóides, período de parto, entre outros, pode romper a latência e retornar ao seu ciclo de replicação e seus sítios primários de infecção desencadeando uma nova expressão dos genes líticos, levando

ao aparecimento de novos sinais clínicos da doença (Muylkens et al., 2003).

Na infecção pelo BoHV-1, após curto período de incubação de 2 a 4 dias, uma descarga nasal serosa, salivação, febre e inapetência se evidenciam. Disseminação viral na descarga nasal é detectada por 10 a 14 dias. Em poucos dias as descargas nasais e oculares podem se tornar mucopurulentas. A infecção pode induzir aborto e diminuir a produção do leite (Hage et al., 1998). Os touros são infectados por via aérea e/ou genital e o sêmen é contaminado quando passa pelas mucosas infectadas (prepuccial e/ou uretra) durante a ejaculação, sendo, então, uma via importante de contaminação das fêmeas. Infecção genital pode levar a vulvovaginite pustular ou balanopostite na monta natural. Quando da inseminação artificial, casos de endometrite podem ser vistos (Kendrick e Mc Entree, 1987).

A infecção em bezerros pode levar à quadros sistêmicos com lesões necróticas focais em algumas vísceras e, às vezes, quadros com gastroenterite. Embora o BoHV-1 possa infectar animais de todas as idades, as doenças correlatas ao vírus são mais comumente relatadas em animais acima de seis meses de idade. Muitas infecções podem ainda ocorrer com um curso subclínico e isto tem sido evidenciado em touros de centrais de inseminação, que embora não apresentassem nenhum sinal ou sintoma, estavam disseminando o BoHV-1 (Van Oirschot et al., 1993) ou BoHV-5 (Gomes et al., 2003) no sêmen.

Para o BoHV-5, embora haja a necessidade de mais estudos conduzidos em infecções naturais, infecções experimentais já foram conduzidas em bezerros, coelhos e ovinos. Após a penetração pela via nasal, o BoHV-5 replica na mucosa do trato respiratório superior produzindo sinais respiratórios leves a moderados (Meyer et al., 2001; Vogel et al., 2004). Segundo Vogel e colaboradores (2004) a replicação primária na mucosa nasal pode persistir por mais de 15 dias. Em seguida ocorre a invasão e replicação viral no sistema nervoso central (SNC), resultando em meningoencefalite

não supurativa (Meyer et al., 2001; Perez et al., 2002). Utilizando coelhos na infecção experimental, Diel e colaboradores (2005) demonstraram que tanto a via olfatória como a trigeminal podem servir de acesso para o BoHV-5 invadir o cérebro. Os autores relatam que a inoculação intranasal dos coelhos resultou em um transporte rápido e eficiente pela via olfatória, enquanto que a via trigeminal se mostrou um acesso mais lento e menos eficiente.

Os sinais neurológicos geralmente aparecem à partir do dia nove ou 10 pós-infecção e incluem tremores, bruxismo, salivação, protusão da língua, opistótono, cegueira, andar em círculos, pressionamento da cabeça contra anteparos, hiperexcitabilidade, decúbito e morte. Os sinais neurológicos são progressivos e geralmente resultam em morte. Têm sido relatados alguns casos de recuperação após curso clínico de intensidade leve a moderada (Belknap et al., 1994; Beltrão, 2000).

Tanto o BoHV-1 quanto o BoHV-5 são vírus que exibem um neurotropismo, entretanto apenas este último é capaz de se replicar no sistema nervoso central (SNC) induzindo doença neurológica (Delhon et al., 2003; Winkler et al., 2002). A encefalite causada pelo BoHV-5 é geralmente descrita como de animais jovens em sua maioria, porém, relatos da infecção no sudeste brasileiro apontam para a ocorrência em animais adultos (Gomes et al., 2003; Afonso, 2005, comunicação pessoal).

Diferenças moleculares entre alguns genes do BoHV-1 e BoHV-5 podem estar implicadas na diferença de patogênese causada por cada um. Todas as ORFs do BoHV-5 estão presentes no BoHV-1, apenas um gene do BoHV-1 (UL-59) não está presente no BoHV-5. Alguns genes do BoHV-5 são menos conservados ($\leq 75\%$) em relação ao BoHV-1, entre eles, o gene UL-61 que codifica a proteína "Zinc finger" transativadora de genes precoces ($\alpha 0$ ou ICP0). O ICP0 está implicado na neurovirulência associada ao BoHV-5 e tem sido estudado como uma potencial

diferença entre os dois vírus (Delhon et al., 2003).

2.5 - Latência

A latência é uma característica da família *Herpesviridae*, onde o vírus em sua forma infecciosa e antígenos virais não estão presentes nos hospedeiros. Após estabelecer infecção lítica nas células do sítio da primeira infecção, esses vírus penetram pelas terminações nervosas e são transportados pelos axônios para o gânglio sensorial, onde a latência se estabelece (Engels e Ackermann, 1996).

Linfonodos, gânglios sensoriais e mucosa nasal são os sítios onde se estabelece a infecção latente, próximos aos sítios onde ocorre a replicação primária (Pastoret et al., 1982).

Apesar de ainda não ser conhecido todo o mecanismo de funcionamento do estado de latência, acredita-se que células altamente diferenciadas e que não se replicam, como os neurônios, seriam as células de escolha para um vírus estabelecer latência. Durante a latência não ocorre síntese de proteína viral e, caso ocorra, ela deve ser tolerada pelo sistema imune do hospedeiro, assim como a célula infectada não deve ser destruída, como acontece com as células dos sítios onde ocorre replicação viral. Segundo estudo conduzido por Ciacci-Zanella et al. (1999), uma pequena fração do RNA, relacionada à latência (LR RNA) é poliadenilado e sofre processamento no gânglio trigeminal, levando à tradução de uma proteína LR (*Latency-Related*), que é inibidora de fatores que são requeridos para a replicação do DNA. Conseqüentemente, a replicação viral produtiva deve ser interrompida nos estágios primordiais e os únicos RNA's presentes nesta fase são os LR RNA's, ou RNA's relacionados à latência (Inman et al., 2004).

Os transcritos LR's possuem um tamanho aproximado de 0,77 a 1,16kb e se situam em uma região do genoma viral que se sobrepõe à fita complementar de um gene imediatamente precoce (Rock et al., 1992). Experimentos *in vivo* indicaram que

mutações deletérias nos LR RNA's, em contraste ao tipo selvagem, exibem uma menor eficiência na reativação da latência. Sendo assim, acredita-se que eles podem aumentar quantitativamente a eficiência do ciclo de latência e de reativação (Perez et al., 2005).

2.6 - Diagnóstico

2.6.1 - Diagnóstico Clínico

Os sinais clínicos encontrados em infecção por BoHV-1 e BoHV-5 são relatados como bastante distintos.

Os sintomas característicos causados por BoHV-1 incluem doença respiratória, vulvovaginite, redução nos índices de fecundação, balanopostite e baixa produção leiteira, podendo ser encontradas de forma isolada ou associadas (Rocha, 1994). Ao contrário da infecção pelo BoHV-1, os animais infectados por BoHV-5 apresentam baixa descarga nasal e não apresentam picos de hipertermia (Meyer et al., 2001). Além disso, entre os sinais característicos da infecção por BoHV-5 estão a depressão profunda, dificuldade na ingestão de água e apreensão de alimentos, bruxismo, sialorréia, movimentos de propulsão, cegueira, convulsões (muitas vezes confundida com outras doenças, como a poliencéfalomalácia), e agravamento progressivo do quadro, chegando à cerca 100% de mortalidade (Salvador et al., 1998). Como o BoHV-5 geralmente induz encefalite de curso fatal, este achado é sempre relatado e evidenciado, podendo ocorrer outras formas clínicas à semelhança das causadas pelo BoHV-1 e que passam despercebidas pelos criadores e Médicos Veterinários.

2.6.2 - Diagnóstico Laboratorial

A OIE preconiza para o diagnóstico da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina o isolamento viral, a detecção de antígenos virais com o uso de anticorpos, pesquisas de anticorpos e do DNA viral. Não há indicação clara para o BoHV-5. Segundo Roehe et al. (1998) ainda não é possível

saber a prevalência do BoHV-5 no rebanho nacional devido aos diagnósticos errôneos, falta de um diagnóstico prático que possa diferenciar BoHV-5 e BoHV-1, além do reduzido número de laboratórios no Brasil capazes de realizar diagnóstico virológico.

Em caso de suspeita de rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), a OIE sugere que se proceda à coleta de descarga nasal de alguns animais infectados, ainda no começo do quadro clínico, quando a presença de descarga serosa ainda é superior à descarga mucopurulenta. Caso a suspeita seja de balanopostite ou vulvovaginite, podem-se também coletar secreções com *swab* na região genital do macho ou fêmea.

No caso de machos, pode-se ainda proceder à lavagem do prepúcio com solução salina e, a partir da mesma, proceder ao exame diagnóstico. Após a coleta, as amostras devem ser resfriadas a 4°C e encaminhadas ao laboratório de análise.

Quando for realizada necrópsia, a mucosa do trato respiratório, tonsilas, pulmões e linfonodos da cadeia respiratória podem ser coletados e utilizados para o isolamento viral. Em caso de aborto, podem-se utilizar o fígado, rins, cotilédones da placenta, baço e pulmões para se proceder ao diagnóstico. O isolamento viral também pode ser realizado à partir de sêmen fresco ou industrializado (já diluído e contendo conservantes).

2.6.2.1 - Identificação do agente viral

O isolamento viral é uma ferramenta amplamente utilizada para se detectar a presença dos Herpesvirus bovinos. Para tanto podem ser utilizadas células de rim, pulmão ou testículo bovino, células de pulmão fetal bovino, traquéia ou células de linhagens estabelecidas, como a *Madin-Darby bovine kidney* (MDBK). Seal e Whetstone (1994) relataram que em cultivos celulares não existem diferenças morfológicas entre os isolados de BoHV-1 e BoHV-5, e que o efeito citopático (ECP) visualizado nas células infectadas pelos Herpesvírus, em geral, é caracterizado por uma macrocitose e perda da morfologia

celular, ficando as células bastante arredondadas além de levar à destruição de outras em algumas áreas. Ocorre também uma degeneração celular podendo haver, ocasionalmente, a formação de sincício, além de formação de longos filamentos provenientes da extensão celular (Spilki et al., 2003).

Técnicas como a imunofluorescência, imunoperoxidase e uso de anticorpos poli ou monoclonais também são empregadas depois de realizado o isolamento via cultivo celular (Salvador et al., 1998)

2.6.2.2 - Detecção do antígeno viral

Segundo a OIE (http://www.oie.int/eng/normes/manual/A_00056.htm) para a detecção do antígeno viral de BoHV-1, preconiza-se o uso de *swabs* genitais, oculares e nasais, dos quais podem ser feitos esfregaços diretamente em lâminas de vidro, ou por depósito em celular após centrifugação.

Utiliza-se neste material a imunofluorescência direta ou indireta, utilizando anti-soro específico. Para a obtenção dos melhores resultados, é necessário amostrar muitos animais por rebanho, enquanto ainda há descarga nasal serosa. Os esfregaços podem ser secos ao ar e fixados em acetona dentro de 24 horas. A grande vantagem desta técnica é a rapidez do diagnóstico, e a desvantagem é a baixa sensibilidade quando comparada ao isolamento viral.

A OIE sugere ainda a imunofluorescência ou imunohistoquímica para detecção de antígenos em fragmentos coletados na necropsia, utilizando anticorpos monoclonais. Alkan e colaboradores (2000) apontam a técnica de imunofluorescência direta como importante ferramenta para acessar o antígeno do BoHV-1 em *swabs*, em infecção única ou em co-infecção com outros agentes respiratórios.

Edwards e Gitao (1987) relataram o uso de um sistema de ELISA com sinal amplificado pela avidina-biotina e a hemaglutinação

reversa passiva para a detecção de antígenos do BoHV-1. Os autores relataram, porém, que nenhum dos dois testes foi comparável em sensibilidade ao isolamento viral.

2.6.2.3 - Diagnóstico sorológico

Técnicas como soroneutralização, ELISA direto, indireto e competitivo são testes sorológicos amplamente utilizados para se diagnosticar infecção por Herpesvírus bovinos. São utilizados quando se deseja demonstrar ausência de infecção (recomendado pela OIE quando da importação e/ou exportação de animais); quando se deseja estabelecer a prevalência da infecção em uma dada região ou propriedade, em estudos epidemiológicos; para fins de pesquisa, quando utilizado em testes de novas vacinas e desafios; para auxiliar em programas de erradicação; e para se diagnosticar uma infecção aguda.

A prevalência e distribuição geográfica da infecção pelo BoHV-5 em bovinos são pouco conhecidas. Este fato é devido, em parte, à ampla distribuição da infecção e vacinação do BoHV-1, associados à dificuldade de diferenciação entre BoHV-1 e BoHV-5 por técnicas tradicionais de diagnóstico sorológico, como a soroneutralização viral, que é amplamente utilizada. Até o momento não se encontra disponível no mercado um teste sorológico que diferencie o BoHV-5 do BoHV-1. Os testes existentes possuem reação cruzada para estes dois vírus, gerando diagnósticos imprecisos, dificultando ainda os programas de controle das herpesvíroses.

Testes de ELISA têm sido relatados para investigação de soroprevalência, mas, em sua grande maioria, têm sido desenvolvidos para a detecção de anticorpos após a vacinação com amostras deletadas, com o intuito de se diferenciar o gado vacinado daquele naturalmente infectado pelo BoHV-1 (Letellier, 2001). Ainda trabalhando com amostras deletadas, Wellenberg e colaboradores (2001) mostraram que anticorpos contra BoHV-5 possuíam reação cruzada com o BoHV-1 em alguns testes, mas o mesmo não era observado em testes

de BoHV-1 - gE - ELISA de bloqueio. Os autores relatam um possível uso deste teste na diferenciação sorológica entre infecções causadas por BoHV-1 e BoHV-5.

2.6.2.4 - Diagnóstico por técnicas moleculares

As técnicas que têm se mostrado mais eficazes na detecção e/ou diferenciação dos herpesvírus bovinos são as baseadas no estudo dos ácidos nucleicos. As técnicas de restrição enzimática e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) são bastante empregadas, devido à sua especificidade, sensibilidade e rapidez de execução (Belak e Ballagi-Pordány, 1993).

A técnica de PCR tem se mostrado mais específica e sensível quando comparada às técnicas tradicionais de diagnóstico, como isolamento viral, hibridização e imunofluorescência para o diagnóstico dos Herpesvírus bovinos (Rocha et al., 1999; Moore et al., 2000)

Botelho (2000) desenvolveu uma PCR *nested* baseada na amplificação de parte do gene codificador da gG do BoHV-5, utilizando-se como amostra DNA extraído e/ou sobrenadante de cultivo celular. Essa PCR se mostrou eficaz e rápida para a detecção do BoHV-5 em amostras clínicas frescas e parafinadas.

Alegre e colaboradores (2001) descreveram uma PCR multiplex onde foi considerado possível o emprego de sobrenadante de cultura celular, *swab* nasal, sêmen e fragmentos de cérebro como amostras passíveis de avaliação. A PCR desenvolvida por essa equipe não requer etapas como a de PCR *nested* ou restrição enzimática. Porém, o seu desempenho não se mostrou reprodutível em nossas condições laboratoriais (Afonso, 2005, comunicação pessoal).

Segundo estudo conduzido por D'arce e colaboradores (2002), ensaios de restrição enzimática são eficazes na diferenciação de subtipos de Herpesvírus bovinos. Nesse estudo empregou-se com sucesso duas

enzimas na diferenciação de BoHV-1 e BoHV-5: *BstE* II e *Hind* III. Os autores relataram que, além da diferenciação entre os dois tipos virais, esta técnica permitiu também a subtipagem de isolados brasileiros.

Em 2005, Claus e colaboradores utilizaram parte do gene que codifica a glicoproteína C no desenvolvimento de uma PCR multiplex para detecção e diferenciação de BoHV-1 e BoHV-5, usando amostras isoladas em cultivo celular e previamente diagnosticadas via PCR *semi-nested*, provenientes de animais com suspeita clínica de BoHV-1 e BoHV-5.

As técnicas moleculares têm ainda sido utilizadas na diferenciação entre os subtipos BoHV-1 e BoHV-1.2. A homologia genética entre esses dois vírus é ainda maior do que a encontrada entre BoHV-1 e BoHV-5, o que torna sua diferenciação mais difícil.

Têm sido empregadas técnicas como restrição enzimática e PCR, bem como reatividade a polipeptídeos e anticorpos monoclonais, nesta diferenciação (Spilki et al., 2005). Costa e colaboradores (2005) relataram o uso de parte da região codificadora da glicoproteína B para diferenciação de BoHV-1,1, BoHV-1.2 e BoHV-5.

Os autores utilizaram o estudo de seqüências motivo baseadas nas repetições de G-C presentes no final da região codificadora da gB, particularmente das seqüências 5'-G(A/T)CC-3'. A análise dessas seqüências-motivo diferenciou, com precisão, isolados de BoHV-1.1, BoHV-1.2 e BoHV-5, mostrando-se uma ferramenta útil no diagnóstico diferencial.

2.7 - Prevenção e controle

Os Herpesvírus circulam entre seus hospedeiros há milhões de anos. Conseqüentemente, espécies correlatas de hospedeiros podem ter sido infectadas por Herpesvírus geneticamente relacionados. Os *Alphaherpesvírus* de ruminantes têm mostrado ser um agrupamento de vírus

extremamente relacionados ao BoHV-1 (BoHV-5, *Bubaline herpesvirus 1*, *Caprine herpesvirus 1*, *Cervid herpesvirus 1 e 2* e *Elk herpesvirus 1*). Estes vírus compartilham propriedades antigênicas e relações sorológicas, evidenciando a necessidade de considerá-los quando da inserção de programas de controle e erradicação do BoHV-1 (Thiry et al., 2006).

Atualmente são conhecidas diversas vacinas atenuadas ou inativadas, específicas contra BoHV-1. Geralmente as vacinas atenuadas são aplicadas via intranasal ou intramuscular, enquanto as vacinas inativadas, formadas por vírus inativados ou partículas víricas e adjuvantes, são geralmente aplicadas por via intramuscular e subcutânea. Também foram desenvolvidas diversas vacinas com marcadores moleculares, com a vantagem de se conseguir distinguir, através de testes sorológicos, animais vacinados e animais infectados, podendo ser muito útil em programas de erradicação de herpesvírus bovino. O uso intensivo de programas de vacinação contra herpesvírus bovino pode reduzir a prevalência de animais infectados de forma considerável.

A OIE preconiza que uma vacina para a prevenção da infecção por BoHV-1, deverá promover imunização por um período de, no mínimo, um ano nos animais vacinados.

Além disso, as vacinas devem promover uma redução de sinais clínicos nos animais no caso de uma infecção, promover uma proteção efetiva em caso de infecção por um vírus à campo e não causar reações adversas como aborto, indução de sintomas clínicos e reações locais e/ou sistêmicas (http://www.oie.int/eng/en_index.htm).

Devido à semelhança genômica entre os herpesvírus bovinos, acredita-se que as vacinas intranasal e intramusculares para BoHV-1 aplicadas à vacas no período pré-desmame também sejam eficientes na prevenção da meningoencefalite causada por BoHV-5 (George, 1991). No entanto, essa afirmação ainda é controversa, segundo alguns autores, que salientam que

tal teoria ainda é pouco testada (Oldoni et al., 2004).

Apesar da proteção cruzada observada em vacinas contra BoHV-1, Vogel e colaboradores (2002) concluíram que a melhor alternativa seria incluir antígenos do BoHV-5 nessas vacinas, com intuito de se ampliar o espectro de ação contra os dois subtipos virais em zonas onde os mesmos circulam.

Recentemente, Spilki e colaboradores (2004) analisaram a habilidade da vacina deletada da gE do BoHV-1 de conferir proteção contra a infecção pelo BoHV-5. Neste trabalho, os autores concluíram que a vacina recombinante de BoHV-1 não foi capaz de conferir total proteção no desafio com o BoHV-5.

Vários estudos têm sido conduzidos para o desenvolvimento de vacinas de DNA, uma vez que o interesse por elas é crescente devido ao seu fácil desenvolvimento e produção e, também, devido ao fato de serem necessárias poucas doses a fim de se atingir uma imunização celular e humoral eficiente. Atualmente, a grande maioria das pesquisas de vacinas de DNA são baseadas na produção de gD secretada por uma célula transfectada, que aumenta a quantidade de antígeno disponível. A utilização de vacinas de DNA possui várias vantagens.

Primeiramente, estas vacinas são facilmente construídas e produzidas, além disso, apenas alguns poucos nanogramas de DNA são necessários para induzir uma resposta imune eficiente. Finalmente, apenas algumas doses podem induzir a produção de resposta humoral e celular (Oliveira et al., 2000).

2.8 - Ensaio da Mobilidade de Heteroduplex (HMA)

O Ensaio da Mobilidade de Heteroduplex (*Heteroduplex Mobility Assay* - HMA) é uma técnica largamente utilizada em medicina humana para se determinar os subtipos de HIV (Delwart et al., 1993; Carneiro-Proietti et al., 2000). O HMA é também empregado para subtipar amostras de *Mycobacterium*

sp utilizando a microheterogeneidade da região 16s (Waleria-Aleixo et al., 2000). Recentemente o HMA já foi também utilizado com sucesso na investigação de diversidades genômicas de Norovírus (Green et al., 2004) e em análises filogenéticas do vírus da Varicela humana (Muir et al., 2002).

A técnica se baseia na migração do DNA da amostra padrão e da amostra de campo a ser testada, amplificados por PCR, desnaturados e hibridizados. As pequenas diferenças na composição de nucleotídeos levam à erro de pareamento das fitas de DNA (*gap*), o que causa a redução da velocidade de migração quando sob ação eletroforética em gel de poliacrilamida, por se tratar de fragmentos “heteroduplexes”. Quanto maior for a diferença filogenética entre a amostra testada e a amostra padrão, maior será a distância entre elas encontrada no gel de poliacrilamida, decorrente da menor velocidade de corrida (Delwart et al., 1993).

O HMA é também uma técnica interessante por auxiliar na investigação sobre possíveis recombinações gênicas e correlações filogenéticas entre agentes (Delwart et al., 1995). Esta premissa é de grande valor no estudo dos Herpesvírus bovinos, uma vez que circulam nos rebanhos brasileiros amostras de grupos e subtipos distintos, ocasionando doença clínica e a geração de animais latentemente infectados (assintomáticos), dificultando o controle destas viroses.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Amostras utilizadas

3.1.1 - Amostras Padrão

Foi utilizada como amostra padrão para BoHV-1 a amostra Colorado (ATCC 864, proveniente do pulmão de um bovino com infecção respiratória, título $10^{4,89}$ TCID₅₀/50µl na 6^a passagem). Para BoHV-1.2 foi utilizado DNA purificado da amostra K22, cedido pela Dra. Monika Engels (*Universität Zürich, Virologisches Institut – Vetsuisse – Fakultät - Suíça*). E, como amostra padrão para BoHV-5 foi utilizada a amostra EVI-88 (título $10^{6,67}$ TCID₅₀/50µl, na 15^a passagem), cedida pelo Doutor Paulo M. Roehe, FEPAGRO Saúde Animal/Instituto de Pesquisas veterinárias Desidério Finamor (RS).

Tabela 1 - Amostras virais utilizadas neste trabalho.

Amostra	Procedência	Material trabalhado	Sexo e/ou Idade	Sintomatologia	Ano de isolamento
EVI-88 Padrão de BoHV-5	Centro de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor	SNC	—	Encefalite (Roehe et al., 1997)	1995
Colorado Padrão de BoHV-1	ATCC 864	-	M	—	-
K22 Padrão de BoHV-1.2	Universität Zürich, Virologisches Institut, Suíça	DNA Purificado			-
728	Lavras, MG	SNC	F 3anos	Postura em decúbito lateral direito, opistótono, movimentos de pedalagem e tetania muscular	2000
711	Estrela do Sul, MG	SNC	F 5 anos	Andar cambaleante e salivação intensa	2000
Mutum	Mutum, MG	SNC	F 5 anos	Excitação, hipersensibilidade ao toque e som, síndrome medular baixa, dificuldade locomotora, decúbito lateral.	2004
MVB	Central de Inseminação Artificial	Sêmen	M	Animal assintomático	1993
MVA	Central de Inseminação Artificial	Sêmen	M	Animal assintomático	1993
KA98	Central de Inseminação Artificial	Sêmen	M	Animal assintomático	1993
BG	Central de Inseminação Artificial	Sêmen	M	Animal assintomático	1993
BA	Central de Inseminação Artificial	Sêmen	M	Animal assintomático	1993
VS	Central de Inseminação Artificial	Sêmen	M	Animal assintomático	1993
DF	Central de Inseminação Artificial	Sêmen	M	Animal assintomático	1993
DQ	Central de Inseminação Artificial	Sêmen	M	Animal assintomático	1993
1184*	Coromandel, MG.	SNC	M 2 anos	Sintomatologia Nervosa	2005
93*, 99* e 60* (animais da mesma propriedade)	Rebanho leiteiro em Caeté	Swab nasal	F	Anorexia, queda abrupta na produção de leite, enfisema subcutâneo na região dorsal, descarga muco-seroso, taquipnéia, edema pulmonar e estertores creptantes.	2005

* Amostras isoladas e caracterizadas neste trabalho de mestrado. As demais fazem parte do acervo do LABMIC e já vêm sendo trabalhadas em outras dissertações e teses.

3.1.2 - Amostras testadas

Neste trabalho foram estudados 15 isolados clínicos obtidos de sêmen, sistema nervoso e *swab* nasal, conforme detalhado na Tabela 1. As amostras provenientes de sêmen, obtidas de uma Central de Inseminação Artificial (C.I.A.) foram coletadas e classificadas como BoHV-1 por Rocha (1994), através de testes de neutralização viral frente à soro anti-BoHV-1 e por PCR *nested* (Rocha, 1998). Sendo parte do acervo de amostras do Laboratório de Biologia de Microrganismos Intracelulares/ICB - UFMG (LABMIC), estas amostras continuaram sendo caracterizadas à medida que novas técnicas foram sendo implementadas e, no ano de 2003, algumas destas amostras foram recharacterizadas como BoHV-5 (Gomes et al., 2003). A amostra Mutum foi cedida pelo professor Dr. Elias Jorge Facury Filho, da Escola de Veterinária da UFMG, coletada de um animal que apresentou sintomatologia nervosa com posterior morte, em abril de 2004. As amostras 1184, 60, 93 e 99 foram cedidas pela professora Dra. Zélia Inês Portela Lobato, também da Escola de Veterinária da UFMG. A amostra 1184 foi obtida de SNC de um touro com sintomatologia nervosa, em uma propriedade rural localizada no município de Coromandel, MG. As amostras 60, 93 e 99 foram obtidas de *swab* nasal de três animais com sintomatologia respiratória aguda, provenientes de uma mesma propriedade rural, no interior de Minas Gerais, no município de Caeté. As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Virologia da EV-UFMG, onde se procedeu ao isolamento viral, tendo sido observado o efeito citopático (ECP) característico em cerca de 90% da monocamada celular em menos de 24 horas pós-inoculação.

As amostras 711 (título $10^{6,2}$ TCID₅₀/50µl, na 9ª passagem) e 728 (título $10^{6,57}$ TCID₅₀/50µl, na 6ª passagem) foram cedidas pela Dra. Marília Oliveira Cavaliere, do Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), coletadas em agosto de 2000 de animais com sintomatologia nervosa. Ambas foram consideradas negativas para o exame de raiva, utilizando imunofluorescência. O

isolado 711 foi coletado em 21/08/00 em Estrela do Sul, Minas Gerais, de uma amostra de cérebro de uma fêmea sem raça definida de cinco anos de idade, que apresentava andar cambaleante e salivação intensa. O isolado 728 foi coletado em 25/08/00 em Lavras, Minas Gerais, de uma amostra de cérebro de uma fêmea de três anos de idade, que apresentava comportamento alterado, postura em decúbito lateral direito, opistótono, movimentos de pedalagem e tetania muscular.

3.2 - Cultivo celular

Utilizou-se a linhagem contínua de células MDBK (Madin-Darby Bovine Kidney), cultivadas em meio Mínimo Essencial de Eagle (MEE) (Sigma, EUA), suplementado com soro fetal bovino (SFB) (GibcoBRL, EUA) 5%, e livre de anticorpos e vírus da Diarréia Bovina à Vírus (BVD) e IBR, com Penicilina (1,6mg/L), Estreptomicina (0,4mg/L) e Fungisona (2,5mg/L). As células foram inoculadas com as diferentes amostras quando atingiam uma confluência de 80-90%.

3.3 - Extração do DNA

Foi utilizado o método de extração do DNA total das amostras (células infectadas) virais utilizando-se fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (Sambrook et al., 1989), sendo realizadas algumas modificações. Foram acrescentados 500µl de sobrenadante celular e igual quantidade de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). Após agitação constante, as mesmas foram incubadas a 37°C por 5 minutos. As misturas foram, então, centrifugadas a 4.400g por 5 minutos em microcentrífuga à temperatura ambiente. Com auxílio de uma micropipeta as duas fases formadas foram separadas, transferindo-se a fase aquosa para microtubos novos, onde foram novamente submetidas ao tratamento com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico e, ao sobrenadante final, foi adicionado igual volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). A mistura foi agitada rapidamente e centrifugada a 12.000g por 5 minutos.

Após a centrifugação, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo. Foram, então, adicionados 2,5 volumes de etanol 100% gelado e acetado de sódio 3M pH 5,2 até uma concentração final de 0,25M, e o tubo foi invertido suavemente. Em seguida, a mistura foi incubada a -20°C *overnight*. O pellet obtido após 30 minutos de centrifugação a 16.000g a 5°C foi ressuspenso em 500µl de etanol 70% gelado. Após suave homogeneização, a mistura foi centrifugada a 17.000g por 5 minutos, sob refrigeração de 4°C. O sobrenadante foi descartado e os microtubos foram invertidos sobre uma folha de papel absorvente até estarem completamente secos. Foram, então, adicionados 30µl de água MilliQ® e a mistura homogeneizada cuidadosamente, para que o precipitado aderido à parede do tubo fosse diluído à água. Após a extração, os

DNAs das 17 amostras foram estocados sob refrigeração.

3.4 - PCR

A PCR desenvolvida neste trabalho envolveu duas etapas, sendo uma PCR *semi-nested*, utilizando três iniciadores. Os mesmos foram desenhados com base em parte da seqüência que codifica a glicoproteína G, comum aos BoHV-1.1, BoHV-1.2 e BoHV-5.

Foi utilizado o programa *Oligo Primer Analysis* (<http://www.oligo.net/>) para o estudo dos iniciadores e condições iniciais de PCR. Os tamanhos esperados dos amplicons da PCR *semi-nested* bem como seqüência dos iniciadores, orientação e localização são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Iniciadores, orientação, localização e tamanho esperado do amplicon.

Iniciadores	Vírus – Acesso no <i>GenBank</i> - Localização dos iniciadores	<i>Amplicon PCR externa / PCR semi-nested</i>
Senso Taccctgctgggctggacc	BoHV-1.1 (AJ004801) (117910-117928)	620pb / 533pb BoHV-1.1
	BoHV-1.2 (Z23068) (3846-3864)	
	BoHV-5 (AY261359) (120131-120149)	
Antisenso gcgatcgcgaggccgatgag	BoHV-1.1 (AJ004801) (118529-118510)	620pb / 533pb BoHV-1.2
	BoHV-1.2 (Z23068) (4465-4446)	
	BoHV-5 (AY261359) (120732-120713)	
Senso interno (<i>nested</i>) Ggcgactgggctgaggct	BoHV-1.1 (AJ004801) (117997-118015)	602pb / 515pb BoHV-5
	BoHV-1.2 (Z23068) (3933-3951)	
	BoHV-5 (AY261359) (120218-120236)	

3.4.1 - Condições das reações

As reações de PCR foram realizadas à partir do DNA extraído como no tópico 3.4. As reações foram realizadas em um volume total de 20µl, onde foi utilizado tampão da enzima *Taq* polimerase 10X (PROMEGA, Brasil), 1,2mM de MgCl₂, 0,2mM de dNTPs, glicerol 1% (v/v) e DMSO 1% (v/v) dNTPs 200 µM, 1 U de *Taq* DNA polimerase, 5µl de DNA purificado de cada amostra (10ng/µl), MgCl₂ (1,2mM) e 20pmol de cada iniciador (reação PCR externa ou interna). Aos tubos foi adicionada uma fina camada de óleo mineral. O programa utilizado na PCR externa consistiu de um ciclo a 95°C por 3

minutos, seguido por 35 ciclos a 94°C por 1 minuto, 61°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, e uma etapa final de extensão de 7 minutos a 72°C. Em seguida procedeu-se a PCR *semi-nested*, sendo utilizado como molde 2µl de produto da PCR externa e a mesma concentração de reagentes. Foram testadas duas temperaturas de anelamento na PCR *semi-nested*, tendo sido escolhido 63°C. Os testes iniciais foram realizados com as amostras padrão de BoHV-1.1, BoHV-1.2 e BoHV-5 (Tabela 1) e, após, foram testadas as amostras clínicas, previamente isoladas em cultivo celular.

3.5 - Análise dos produtos de PCR

Dez microlitros de produtos de PCR, tanto das amostras padrão como das amostras clínicas, foram submetidos à análise por eletroforese em gel de agarose 1,2% (89mM Tris-borato, 2mM EDTA, pH 8,2) acrescido de brometo de etídio (0,5µg/mL), sendo utilizado tampão de corrida TBE 1X em um sistema de eletroforese horizontal a 100V por 1 hora. Para a determinação do tamanho do produto de PCR foi utilizado um padrão de tamanho molecular (100 pb Ladder, Invitrogen, Brasil).

3.6 - Restrição enzimática dos produtos de PCR

Depois de realizadas as PCR's, foram verificados os perfis de restrição enzimática dos produtos amplificados, utilizando-se a enzima *XhoI* (PROMEGA, Brasil). Após diluição no tampão específico, foi adicionada uma UI de enzima a 10 microlitros de produto de PCR e, em seguida, as amostras foram incubadas a 37°C durante 4 horas. Os produtos das restrições foram submetidos à resolução em gel de agarose 2% e, em seguida, fotografados.

3.7 - Purificação dos produtos de PCR

Para que algumas amostras fossem seqüenciadas, visando comprovar a especificidade do amplicon, estas foram amplificadas na PCR semi-nested, em um volume de 50 microlitros. Os produtos foram, então, visualizados em luz ultravioleta em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio. Com o auxílio de um bisturi, as bandas desejadas foram retiradas do gel e colocadas em tubos de 1,5 mL e purificadas com o kit WIZARD® PCR Preps DNA Purification System (PROMEGA, Brasil), seguindo-se o protocolo desenvolvido pelo fabricante.

3.8 - Seqüenciamento e análise das seqüências

Após a purificação dos produtos de PCR, as amostras foram seqüenciadas em

seqüenciador automático MegaBACE no ICB - UFMG.

As seqüências obtidas foram editadas fazendo-se uso do programa Chromas (versão gratuita 1.45 - Technelysium Pty, Ltd – <http://technelysium.com.au/chromas.htm>) e alinhadas com auxílio do programa Clustal W versão 1.8 DOS (<http://www.csc.fi/molbio/progs/clustalw>), para obtenção das seqüências consenso. As seqüências editadas foram analisadas para a determinação da similaridade em relação aos nucleotídeos com amostras de BoHV-1.1, BoHV-1.2 e BoHV-5, previamente depositadas, utilizando-se os programas Blastn e Blastx, utilizando-se os bancos de dados *nr* (GenBank + EMBL + DDBJ + PDB *sequences* – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

3.9 - Análise Filogenética das seqüências

As seqüências produzidas neste trabalho foram alinhadas com as demais seqüências de BoHV-1.1, BoHV-1.2 e BoHV-5 provenientes do banco de dados *GenBank*. O alinhamento e a construção da árvore foram realizados no software gratuito MEGA disponível na internet para (<http://www.megasoftware.net/>) a árvore construída pelo método *Neighbor-Joining*, com 1000 réplicas de *bootstrap*. Esta árvore define as distâncias entre as amostras tendo por base o alinhamento de suas seqüências. Para estas análises, foi utilizada também uma seqüência de um membro da subfamília *Alphaherpesvirinae* como *outgroup* (BoHV-2 - *Simplexvirus*).

3.10 - Ensaio da Mobilidade do Heteroduplex (HMA)

Testou-se o ensaio de HMA com a finalidade de se distinguir os três subtipos de Herpesvírus aqui discutidos, através da eventual formação de heteroduplexes. Primeiramente foram testados os produtos de PCR das amostras padrão (Colorado, K22 e EVI-88). Cinco microlitros de cada amostra foram colocados aos pares (Colorado x K22, Colorado x EVI-88, EVI-88 x K22), em presença de tampão de anelamento 10X (1M NaCl, 100mM Tris-HCl

pH 7,8, 20mM EDTA). Várias temperaturas e tempos foram testados (2 minutos a 94°C; 10 minutos a 94°C; 12 minutos a 94°C; 10 minutos a 94°C + 3 minutos a 60°C; 12 minutos a 94°C + 3 minutos a 60°C) e, em seguida, cada tubo era colocado em banho de gelo (gelo picado mais água em mesma proporção) para choque térmico.

As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 5% a 200 V. As corridas foram realizadas em tampão de corrida TAE 1X (20,3mM KH₂PO₄, 10,04M Tris-acetato, 10mM EDTA pH 8,0), em um sistema de eletroforese vertical (aparelho: cuba vertical 16mm da GIBCO-BRL). Os tempos de corrida em géis de poliacrilamida 5% variaram entre 120 a 240 minutos. Depois de padronizados o tempo e temperatura, procedeu-se a análise com os demais produtos de PCR das amostras clínicas, tendo sido realizados mixes onde 5µl de cada amostra a ser testada foram colocados em um tubo contendo 5µl de amostra padrão (amostra clínica x Colorado, amostra clínica x EVI-88 e amostra clínica x K22), tampão de anelamento e, em seguida, procedida a termociclagem. Para cada amostra clínica,

um tubo contendo 5µl da mesma e 5µl de água foi utilizado como controle do padrão de corrida da própria amostra. Para ajustar perfeitamente a quantidade de DNA utilizada entre as amostras clínicas e as amostras padrão, após a PCR, 1µl de cada amplicon foi depositado sobre um gel de agarose 1%, em forma de *dot* e a leitura foi feita por comparação visual em transiluminador UV. Após a corrida, os géis de poliacrilamida foram corados com prata. O gel foi mantido a 4°C em solução fixadora (10% etanol; 0,5% ácido acético) *overnight*. Em seguida a solução foi retirada e a solução de prata 0,2% foi acrescentada (0,2g prata; 50mL solução fixadora; 50mL H₂O) por 10 minutos. Após o gel ser lavado duas vezes com H₂O, foi acrescentada a solução reveladora (15g NaOH (1,5%); 3mL formaldeído 37%; H₂O qsp 1L). Assim que as bandas começaram a aparecer, a solução reveladora foi descartada acrescentando-se água. Quando o gel estava na coloração desejada, a água foi retirada e a solução fixadora novamente despejada sobre o mesmo, ficando este a 4°C. Abaixo, uma foto representativa do HMA, adaptada de Siddappa et al. (2004).

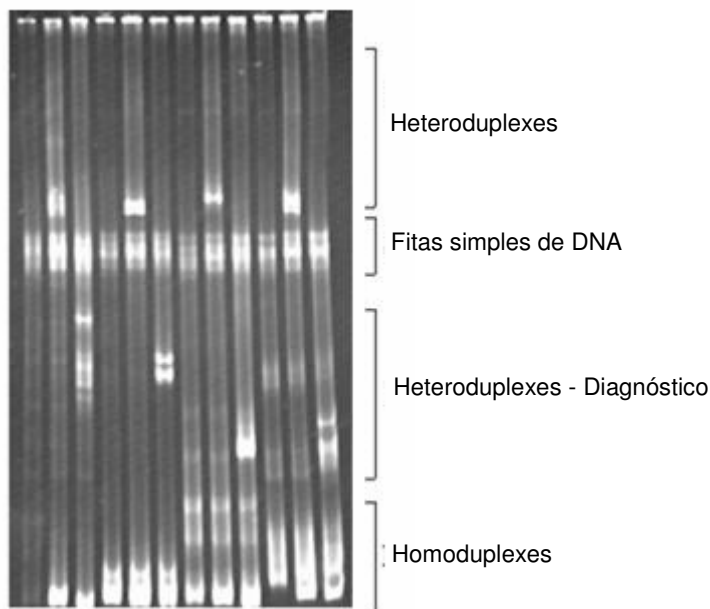


Figura 1 - Representação do HMA. A faixa de heteroduplexes abaixo das fitas simples e acima dos homoduplexes é que é lida como a tipagem. Adaptado de: Siddappa et al. (2004).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Padronização da PCR semi-nested

A padronização da PCR semi-nested (composta de um passo inicial de amplificação, denominado PCR externa e um segundo passo denominado PCR interna) foi realizada com as amostras padrão Colorado, K22 e EVI-88, utilizando-se como molde o DNA purificado de cada uma. A concentração de reagentes e temperaturas da PCR externa não necessitaram alteração do primeiro protocolo idealizado, tendo a mesma

funcionado satisfatoriamente. A temperatura de anelamento do segundo ciclo de PCR foi testada a 63°C e 65°C, apresentando 63°C resultado levemente superior, fazendo com que fosse a temperatura adotada durante todos os experimentos. Embora todas as amostras tivessem o seu DNA dosado e adicionado como molde na mesma proporção, a Figura 2 mostra que a amostra Colorado não amplificou na PCR externa, sendo a banda esperada somente quando realizado o segundo passo da PCR. As amostras K22 e EVI-88 já apresentaram amplificação visível na PCR externa, tendo apresentado bandas extras na PCR interna.

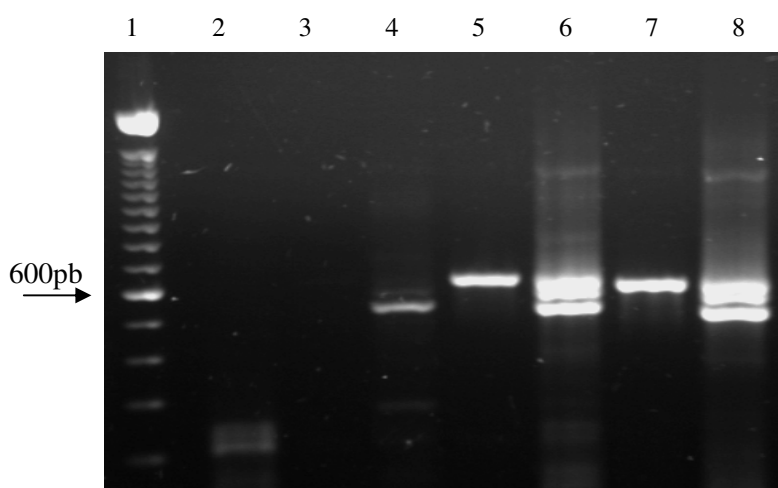


Figura 2 - Gel de agarose 1,2% corado por brometo de etídio, com a seguinte seqüência de amostras: Canaleta 1: Padrão de tamanho molecular (100pb ladder - Invitrogen); Canaleta 2: Controle negativo – mix de reagentes; Canaleta 3: Colorado (PCR externa); Canaleta 4: Colorado (PCR interna); Canaleta 5: K22 (PCR externa); Canaleta 6: K22 (PCR interna); Canaleta 7: EVI-88 (PCR externa); Canaleta 8: EVI-88 (PCR interna).

4.2 - PCR semi-nested das amostras clínicas

Uma vez padronizada a PCR das amostras padrão purificadas, foram trabalhadas as amostras extraídas de cultivo celular. Como procedimento padrão do LABMIC, a primeira análise realizada foi a PCR para detecção

do gene normalizador β -actina bovina, que funciona como uma comprovação da eficácia da extração do DNA (Hirsch, 2005, comunicação pessoal). O resultado encontra-se na Figura 3. Observou-se que quatro amostras não apresentaram amplificação, e, para os procedimentos seguintes as mesmas foram reajustadas em suas quantificações de DNA.

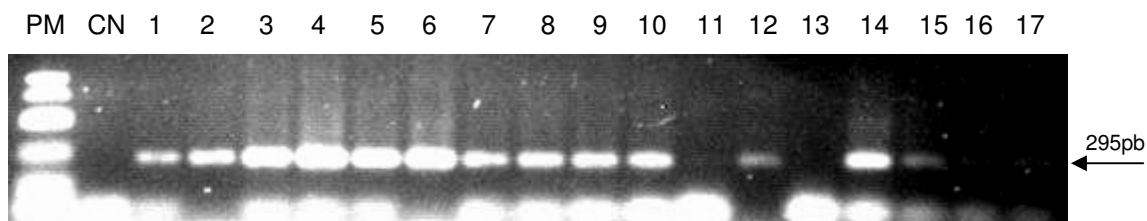


Figura 3 - Eletroforese em gel de agarose 1,2% apresentando resultado da pesquisa do gene da β -actina nas 17 amostras provenientes de cultivo celular. PM: Padrão de tamanho molecular (100bp ladder – Invitrogen); CN: controle negativo – mix de reagentes. Canaletas 1:EVI-88; 2:728; 3:MVA; 4:MVB; 5:711; 6:KA98; 7:BG; 8:BA; 9:VS; 10:DF; 11:Colorado; 12:DQ; 13:Mutum; 14:1184; 15:93; 16:99; 17:60.

Após a execução da PCR para detecção de parte do gene normalizador β -actina, as amostras clínicas foram então submetidas à PCR *semi-nested* para amplificação do genoma BoHV-1.1, BoHV1.2 ou BoHV-5. Observa-se na Figura 4 um bom perfil de

amplificação e, para algumas amostras verifica-se a presença de banda extra. Este padrão não compromete, porém, o resultado do teste, uma vez que a banda do amplicon no tamanho esperado está presente apontando a positividade das amostras.

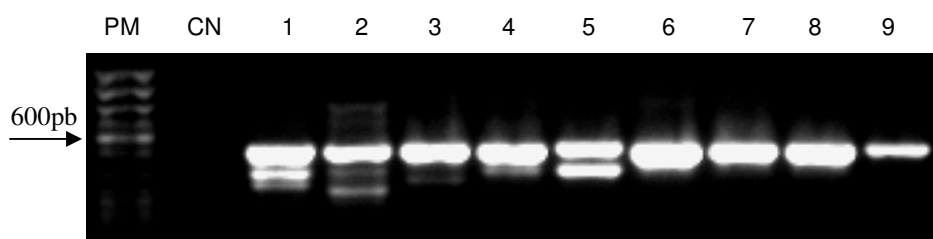


Figura 4 - Resultado da PCR *semi-nested* observada em gel de agarose 1,2%. PM: Padrão de tamanho molecular (100bp ladder – Invitrogen); CN: controle negativo – mix de reagentes. Canaletas 1:EVI-88; 2:MVB; 3:BG; 4:DF; 5:Colorado; 6:1184; 7:93; 8:99; 9:60.

A PCR desenvolvida mostrou-se sensível para a amplificação de amostras de campo. Embora tenha sido padronizada uma PCR *semi-nested* (com dois passos de amplificação), muitos trabalhos que também o fizeram, têm demonstrado ainda a necessidade de se avaliar amplicons de amostras clínicas em géis de poliacrilamida, os quais são até 100 vezes mais sensíveis que a agarose quando corados pela prata. Os resultados em géis de agarose são de

mais fácil manipulação e podem facilitar a liberação dos resultados com maior rapidez.

4.3 - Análise de perfil enzimático

A avaliação do perfil enzimático das amostras foi utilizada como uma ferramenta para se distinguir os dois tipos virais. O quadro abaixo aponta a análise *in silico* para o provável perfil de restrição.

Quadro 1 - Perfil de restrição das amostras padrão de BoHV-1.1, BoHV-1.2 e BoHV-5.

<p>BoHV1.1 (AJ004801) ggcgactgggctgcggtgcttccccgccctgttgaggtgacgcggtgtggggcaacgtaagcgccgagagctgggctggcc gaccgatcgactacgccgacgaaggggtgaggtcgaagtgc ▼tcgaggacgaagccgggagcgccagcggaacctgcc gcaggacgaccccgacccgacctgcagattgccggaccgtcgggctctttagcgaagcgacatgttccggaccgccagcggg cccgaatcgctgctgatcggcgccgttgccaaggacgtcctgacggtgcccctcaatctgccgcccggcgtcttacgaggccctgc gaaacgcatcgctggagtgaactcccgccgagaccggcgacgcagcgggtggtggtgatgtctctccaggagcccgtcgc cc ▼tcgagcgcgccccgatccccgcccaccgatccggagtttgggctctttggcctgccgatgaccccgccgtcggcgcg catttcacatcggcctcgcatcg</p> <p>BoHV-5 (AY261359) ggcgactgggctgcggtgcttccccgctcgtcgaagtgcagctgagctggggaacgtgagcgccgagagctgggctgg acgactcgaccggcgattacgaggacgaggacgggagcgctagcggggaccgcaggaaaaagaccccgatcttacggactg ccggattaacaggctcttcgacgagagcgacatgttccggaacgccagcgggcccgcactcgtgtaatcggcgccgctgccaag ggcatcttgacctgccccttggcctgccggccgcccgtcttacgaggccctgcggaacgcctcgtggagtgaacgcccgcatg cgcgagaccggcgagatgttggcggcggtgtagtggtgacgccaccaccgcccagaagtccgcccgtccgagcggcgtcc gattccccggcaaccgactcggatttgggctcttggctgcccactgatcccgccacgcccgcgcatctacatcgccctcgcatg gc</p> <p>BoHV-1.2 (Z23068) ggcgactgggctgcggtgcttccccgctcgtcgaaggtgacgtggtgtggggcaacgtgagcgccgagagctgggctggc cgaccgatcgactacgccgacgaaggggtgaggtcgaagtgc ▼tcgaggacgaagccgggagcgccagcggaacctgcc cgcaggacgaccccgacccgacctgcagattgccggaccgtcgggctctttagcgaagcgacatgttccggaccgccgccc gcccgaatcgctgctgatcggcgccgttgccaaggacgtcctgacggtgcccctcaatctgccgcccggcgtcttacgaggccctg cgaaacgcatcgctggagtgaactcccgccgagaccggcgacgcagcgggtggtggtgatgtctctccaggagcccgtcgc gcc ▼tcgagcgcgccccgatccccgcccaccgatccggagtttgggctctttggcctgctgatgaccccgccgtcggcgcg catttcacatcggcctcgcatcg</p>
--

Sítio da enzima - *Xho* I: C▼TCGAG . As amostras de BoHV-1 e BoHV-1.2 possuem 2 sítios para a enzima *Xho* I. Após a restrição, o segmento de 533pb é fragmentado em 130pb, 297pb e 106pb. A amostra de BoHV-5 não possui sítios de restrição, mantendo o tamanho de 515pb após as restrições com quaisquer das 2 enzimas utilizadas.

A Figura 5 mostra o perfil de restrição dos padrões Colorado (BoHV-1.1), K22 (BoHV-1.2) e EVI-88 (BoHV-5). Pode ser observado que as amostras de Herpesvírus bovino 1 foram restringidas pela enzima *Xho*I, o que

não aconteceu com a amostra EVI-88, comprovando a eficiência desta técnica na separação das amostras de BoHV-1.1 e BoHV-5.

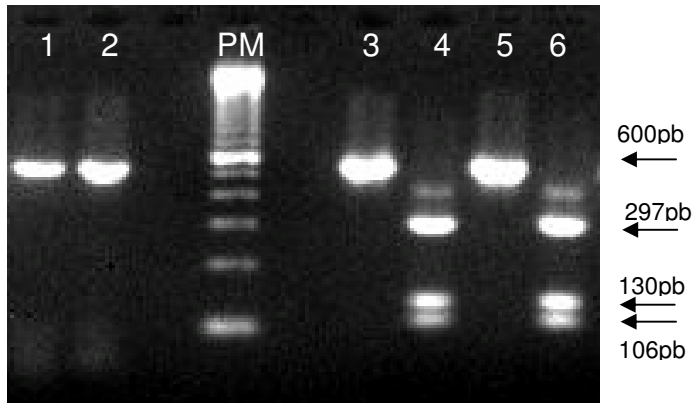
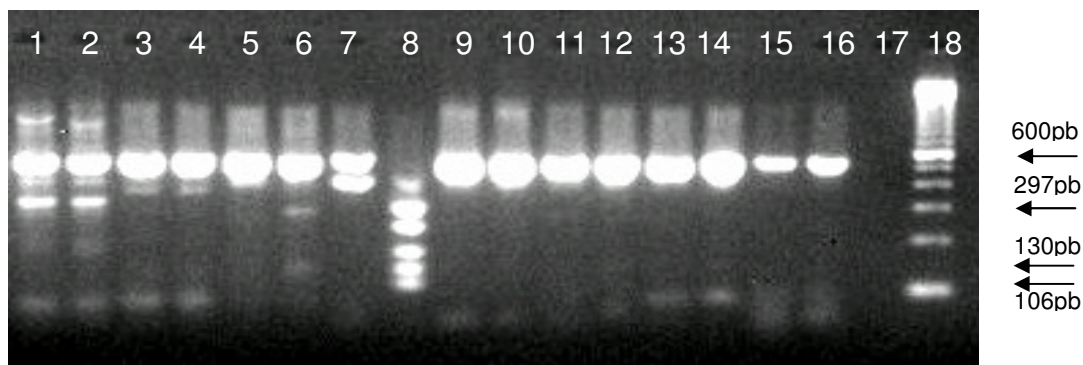


Figura 5 - Análise de perfil de restrição enzimática. Canaletas ímpares e pares: amostra e amostra clivada com *Xho*I, respectivamente. Canaletas 1 e 2: EVI-88 (BoHV-5); canaletas 3 e 4: Colorado (BoHV-1.1); canaletas 5 e 6: K22 (BoHV-1.2). Marcador de tamanho molecular - 100pb ladder (Invitrogen).

Na Figura 6 apresenta-se o resultado da restrição enzimática de amostras de campo com a enzima *Xho* I.

Figura 6 - Análise de perfil de restrição enzimática.



Canaletas: 1:MVB; 2:MVB-R; 3:711; 4:711-R; 5:DF; 6:DF-R; 7: Colorado (cultivo celular); 8:Colorado-R; 9:1184; 10:1184-R; 11:93; 12:93-R; 13:99; 14:99-R; 15:60; 16:60-R; Canaleta 17 – Controle negativo de reação. R = amostra restringida com a enzima *Xho* I. Canaleta 18: marcador molecular 100pb ladder Invitrogen

A restrição das amostras de campo com a enzima *Xho* I mostrou que praticamente todas as amostras trabalhadas são BoHV-5. De fato, como relatado na Tabela 1, as amostras 728, 711, Mutum, MVA, MVB, KA98, BG, BA, VS, e DQ pertencem ao acervo do LABMIC e já foram anteriormente caracterizadas com outras ferramentas. A única amostra a apresentar perfil de restrição característico de BoHV-1 foi a amostra de sêmen DF. As amostras isoladas durante este trabalho: 1184, 90, 93 e 60 foram pela primeira vez caracterizadas utilizando a PCR desenvolvida nesta dissertação como ferramenta.

4.4 - Análise do Ensaio da Mobilidade do Heteroduplex (HMA)

Primeiramente o HMA foi testado nas amostras padrão, com a finalidade de se testar temperatura e tempo de corrida para, então, poder ser utilizado com os isolados clínicos. Após os testes verificou-se que a melhor resolução dos heteroduplexes foi conseguida com a corrida a 200V / 195 minutos. Após o ajuste da quantidade de DNA em sistema de *dot*, todos os géis contiveram sempre os seguintes padrões: cada uma das amostras padrão para comparação (DNA padrão + água) e, cada uma das amostras clínicas + água, seguidos da amostra clínica + cada um dos DNA's padrão (Colorado-BoHV-1.1, K22-BoHV-1.2 e EVI-88-BoHV-5). Os resultados são representados nas Figuras 7, 8 e 9.

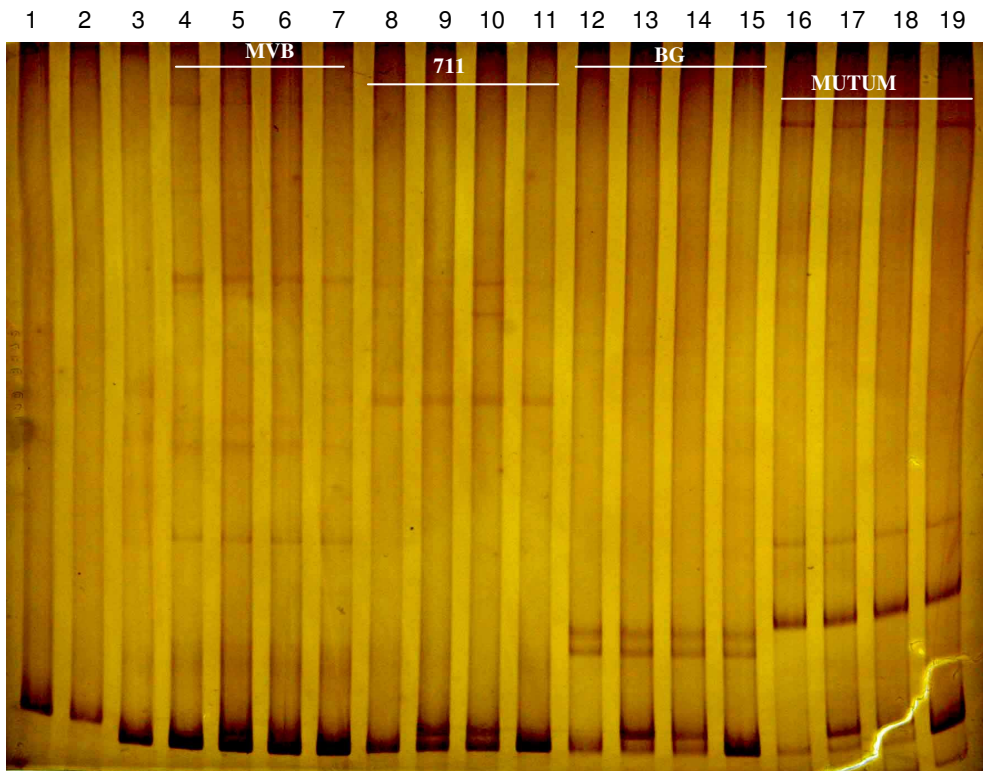


Figura 7 - HMA - Canaletas: 1- Colorado (padrão); 2- K22 (padrão); 3- EVI-88 (padrão); 4 – MVB e água; 5 – MVB e Colorado; 6 – MVB e K22; 7 – MVB e EVI-88; 8 – 711 e água; 9 – 711 e Colorado; 10 – 711 e K22; 11 – 711 e EVI-88; 12 – BG e água; 13 – BG e Colorado (padrão); 14 – BG e K22; 15 – BG e EVI-88; 16 – Mutum e água; 17 – Mutum e Colorado; 18 – Mutum e K22; 19 – Mutum e EVI-88.

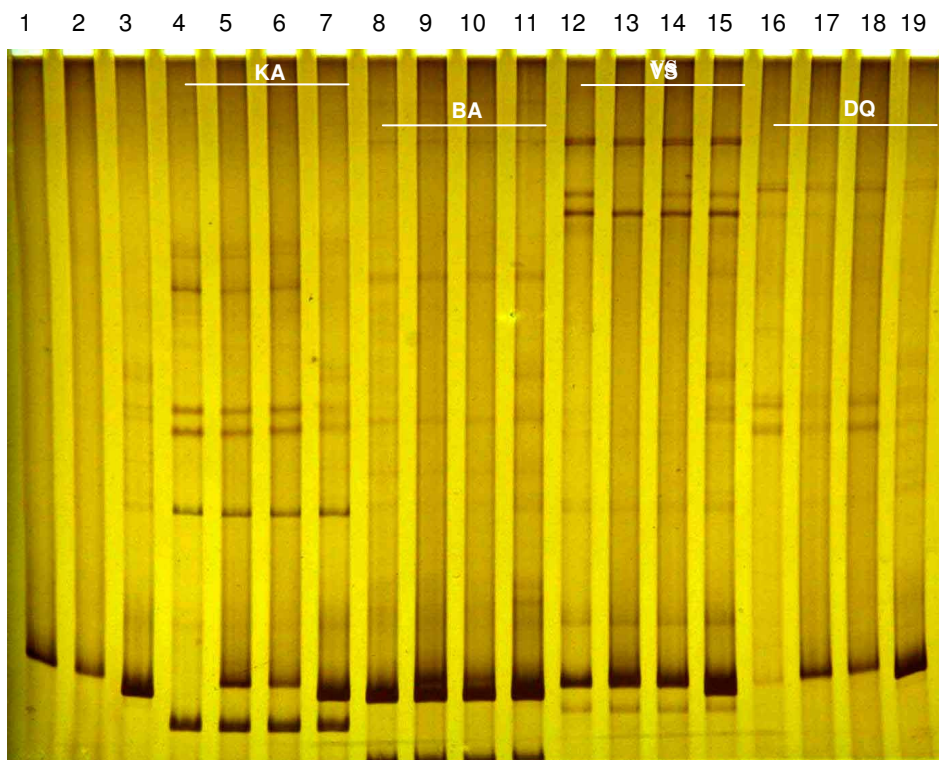


Figura 8 – HMA - Canaletas: Colorado (padrão); 2- K22 (padrão); 3- EVI-88 (padrão); 4 – KA e água; 5 - KA e Colorado; 6- KA e K22; 7 – KA e EVI-88; 8 – BA e água; 9 – BA e Colorado (padrão); 10 – BA e K22; 11 – BA e EVI-88; 12 – VS e água; 13 – VS e Colorado; 14 – VS e K22; 15 – VS e EVI-88; 16 – DQ e água; 17 – DQ e Colorado; 18 – DQ e K22; 19 – DQ e EVI-88.

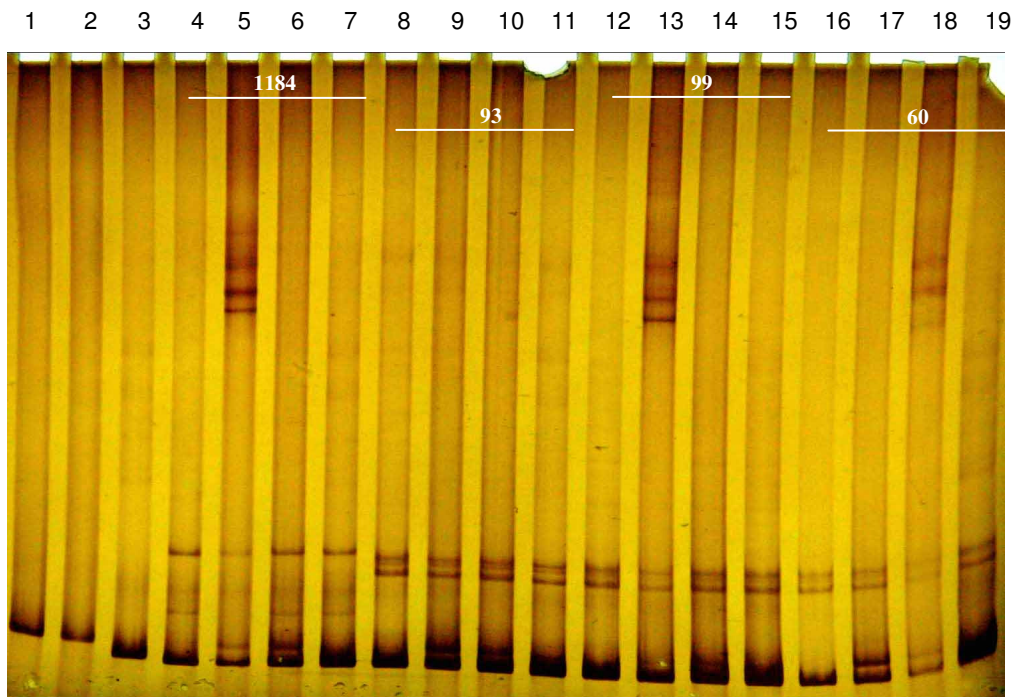


Figura 9 – HMA - Canaletas: 1 - Colorado (padrão); 2- K22; 3- EVI-88 (padrão); 4 – 1184 e água; 5 – 1184 e Colorado; 6 – 1184 e K22; 7 – 1184 e EVI-88; 8 – 93 e água; 9 – 93 e Colorado; 10 – 93 e K22; 11 – 93 e EVI-88; 12 – 99 e água; 13 – 99 e Colorado; 14 – 99 e K22; 15 – 99 e EVI-88; 16 – 60 e água; 17 – 60 e Colorado; 18 – 60 e K22; 19 – 60 e EVI-88.

O ensaio HMA é baseado na observação da migração da fita dupla de DNA, resultante da desnaturação e reanelamento de DNA de amostra padrão + DNA de amostras clínicas, amplificados por PCR. O não pareamento total dos nucleotídeos, além das inserções e deleções de nucleotídeos causam uma redução na mobilidade eletroforética destes fragmentos em géis de poliacrilamida não desnaturantes. Se uma fita pareia-se totalmente com a outra, é formado o homoduplex, se o pareamento é apenas parcial, indicando regiões homólogas, mas, contendo pequenas regiões com *gaps*, é chamada de heteroduplex. Cada heteroduplex que é formado migra com uma mobilidade distinta, indicando que a composição fita-específica afeta sua mobilidade (Delwart et al., 1995). Esta mobilidade de heteroduplexes é geralmente proporcional ao grau de distância genética entre duas amostras (Delwart et al., 1993). Durante a desnaturação e reparamento, devido à velocidade com que as mudanças são

efetuadas, parte das fitas não se pareiam e, as mesmas correm juntas no gel, mostrando uma linha no meio exato do mesmo, que norteia a visualização dos heteroduplexes que se forma abaixo (Figura 1 – Material e Métodos).

Embora tenham sido testadas temperaturas variadas de abertura e pareamento das fitas de DNA, o HMA, nas condições aqui trabalhadas, não se mostrou uma técnica efetiva na diferenciação das amostras. Observando-se as Figuras 7, 8 e 9, o primeiro fato que chama a atenção, é a não formação das fitas simples, marcadoras do meio do gel. Observando-se os géis com atenção, pode ser visualizada uma maior quantidade de heteroduplex sempre para a mistura amostra de campo x amostra de EVI-88 (padrão de BoHV-5), porém, os heteroduplexes não apresentam nitidez suficiente para o fechamento da subtipagem.

A única evidência encontrada foi a distância percorrida pelas bandas referentes às amostras de BoHV-1.1(533pb) e BoHV-1.2 (533pb) quando comparadas à percorrida por amostras de BoHV-5(515pb). O amplicon de BoHV-5 é um pouco menor que os demais, migrando mais rapidamente no gel e evidenciando uma pequena distância entre estes e as amostras de BoHV-1.1 e 1.2. Observa-se para as amostras de campo trabalhadas a migração do homoduplex sempre com a banda mais baixa (BoHV-5, provavelmente).

Os testes de HMA têm sido utilizados com sucesso para muitos microrganismos, especialmente HIV (Barbosa et al., 1998), hepatite C (Siddappa et al., 2004) e norovírus (Green et al., 2004).

Nenhum dos agentes acima possui um conteúdo tão alto de GC quanto o relatado para os herpesvírus. O conteúdo de GC no amplicon trabalhado foi de: 70% - BoHV-1.1; 70,3% - BoHV-1.2 e 68% - BoHV-5. Possivelmente, embora houvessem regiões com pequenos *gaps* e até mesmo deleções de mais três bases entre os tipos virais que favoreceria a técnica trabalhada, o alto conteúdo de GC das amostras dificultou a padronização do teste. Como este teste é de baixo custo, possui facilidade de realização e oferecem avaliações preciosas de isolados clínicos, outras regiões que não a codificadora da glicoproteína G podem ser trabalhadas no futuro.

4.5 - Análise por seqüenciamento dos produtos de PCR

Com o objetivo não só de analisar a especificidade do produto amplificado mas, principalmente, com o intuito de se conhecer as amostras de Herpesvírus bovinos circulantes em nossos rebanhos os amplicons foram seqüenciados. As amostras foram seqüenciadas no mínimo duas vezes e, em ambos os sentidos. Puderam ser seqüenciadas com sucesso as amostras BA e BG (sêmen), as amostras 1184 e 711 (SNC) e as amostras 60, 90 e 93 (*swab* nasal). A Figura 10 mostra o alinhamento das amostras seqüenciadas (60, 93, 90, BA, BG, 711 e 1184) com o padrão de BoHV-5 – AY261359 (amostra SV/507) seqüenciada em 2003. A Figura 11 mostra o alinhamento das seqüências deste trabalho com os padrões mundiais de BoHV-1.1., BoHV-1.2 e BoHV-5, além da seqüência das amostras padrão BoHV-1.1/Colorado e BoHV-5/EVI-88, seqüenciadas em nosso laboratório. Nestas seqüências, as bases representadas em vermelho se mostram conservadas entre todas as seqüências analisadas e as bases azuis e pretas demarcam as diferenças entre estas seqüências. Nestas figuras pode-se notar claramente que existem motivos conservados entre estes dois tipos virais e que estes são exclusivos de BoHV-1 ou de BoHV-5, dividindo-os em dois grupos distintos.

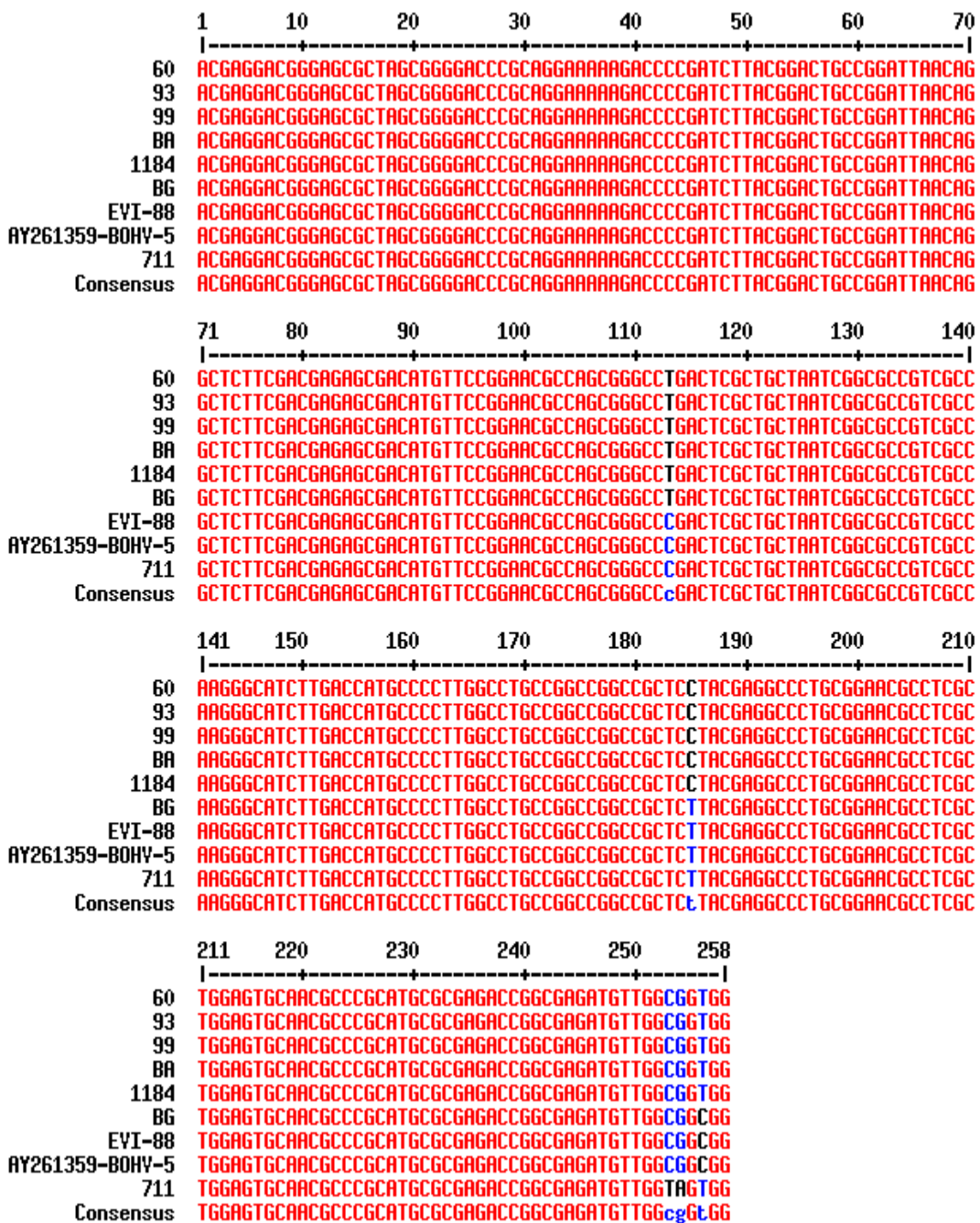


Figura 10 - Alinhamento de parte da região codificadora da gG – isolados clínicos usando como seqüência líder a amostra AY261359, protótipo mundial de BoHV-5 previamente depositada no GenBank.

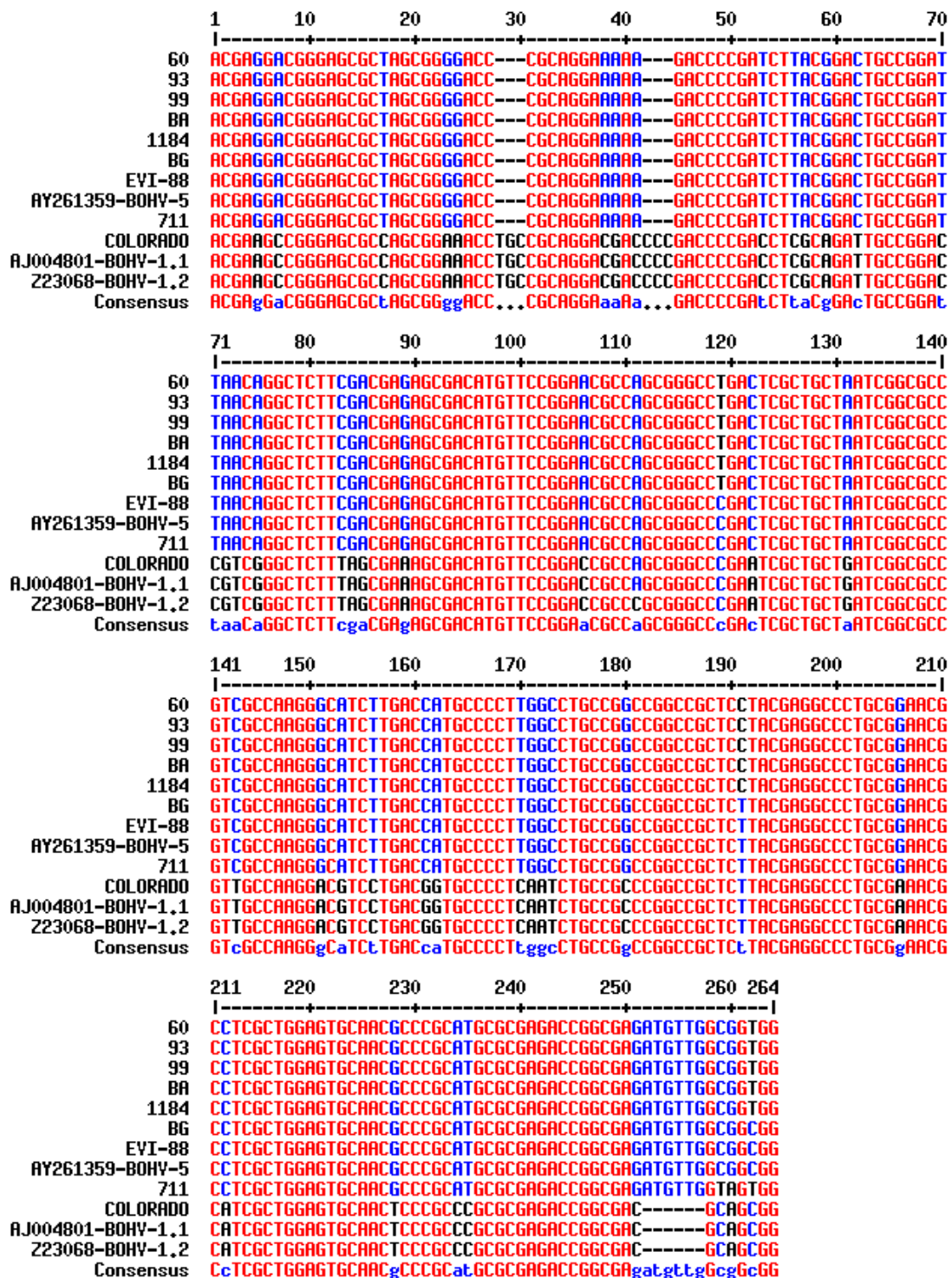


Figura 11 - Alinhamento das amostras seqüenciadas, com os padrões de BoHV-1.1 e BoHV-1.2 depositadas previamente no GenBank, além da seqüência das amostras padrão BoHV-1.1/Colorado e BoHV-5/EVI-88, seqüenciadas em nosso laboratório.

Quando se alinhou as amostras de BoHV-5 (Figura 10), observou-se que esta parte região codificadora da glicoproteína G é altamente conservada. Na posição 113 da Figura, há uma troca de T/C, onde T é vista em todas as amostras clínicas deste trabalho (exceto para a amostra 711, isolada de SNC, que se comporta como os padrões) e C é vista nas amostras EVI-88 e SV507. Na posição 185, há uma troca de C/T, onde C é encontrada nas amostras 60, 99, 93, BA 3 1184 T é encontrada em 711, BG, EVI-88 e SV/507. Na posição 256 uma vez mais uma troca de T/C é apresentada, onde amostras com T são 60, 93, 99, BA, 1184 e 711 e amostras com C - BG, EVI-88 e SV-507. Existem ainda duas trocas da amostra 711, nas posições 253 e 254, onde todas as amostras apresentam um CG e somente a 711 apresenta um TA. Esta amostra foi seqüenciada quatro vezes, sentido senso e antisenso e, foi a única a ser seqüenciada em dois diferentes laboratórios, comprovando a veracidade das trocas.

Na análise da Figura 11, fica comprovada a excelência da região estudada para a separação das amostras de BoHV-5 x BoHV-1. São observadas três importantes regiões de inserção/deleção entre os dois vírus nos posicionamentos aproximados das bases 30, 40 e 250, além de algumas trocas pontuais entre as amostras dos dois vírus.

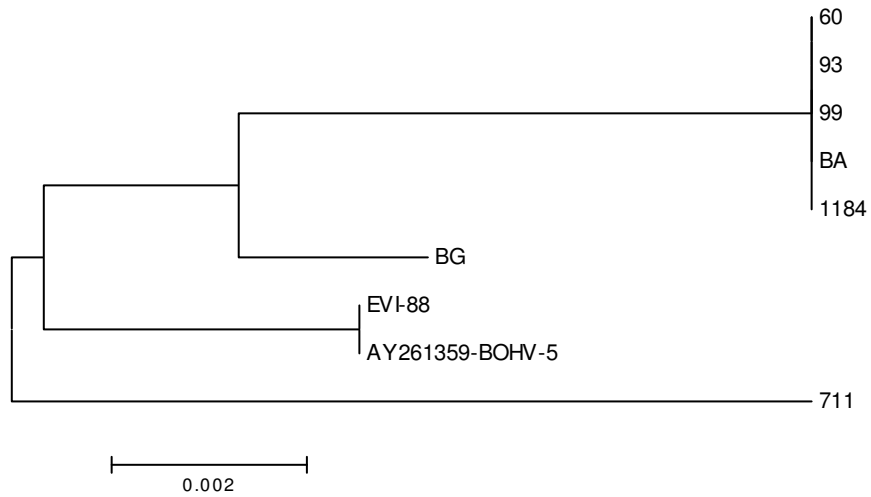
Estudos anteriores realizados no Laboratório de Biologia de Microrganismos Intracelulares (Gomes et al., 2003) demonstraram que esta região da glicoproteína G é capaz de distinguir entre amostras de BoHV-1 e BoHV-5, uma vez que as primeiras apresentam uma deleção de 06 bases na porção final deste gene. Sendo assim, utilizou-se esta mesma região nas análises de seqüências bem como na filogenia, com o objetivo de se verificar se estas diferenças se mantinham nas seqüências analisadas bem como se existiam diferenças entre as amostras de BoHV-5 provenientes de sistema nervoso central, sêmen e *swab* nasal.

As seqüências de gG foram utilizadas também na construção de uma árvore filogenética para determinação da proximidade entre as amostras analisadas. O programa MEGA foi utilizado e a árvore construída a partir do método *Neighbor-Joining*, com 1000 réplicas de *bootstrap*.

A quantidade de bases seqüenciadas entre as amostras variou de 415 a 258pb, tendo sido então utilizado 258pb para os alinhamentos e estudos de inferência. Os resultados obtidos pelas análises pelo método de máxima parcimônia foram os mesmos daqueles obtidos pelo método *Neighbor-Joining*. Na Figura 12 (A e B) estão representadas as árvores filogenéticas construídas a partir das seqüências de gG.

Observa-se na figura 12A (amostras de BoHV-5) que as amostras 60, 99 e 93 (isoladas de animais de mesmos rebanho com sintomatologia respiratória) formaram um agrupamento juntamente com as amostras 1188 (SNC) e BA (sêmen). Um pouco distanciada, mas, ainda próxima a este agrupamento ficou a amostra BG (sêmen). As amostras EVI-88 e AY261359 (SV/507), ambas padrão de BoHV-5 formaram um agrupamento único. Como era de se esperar, tendo em vista as trocas observadas nas Figuras 10 e 11, a amostra 711, formou um ramo mais distante. Para a Figura 12B, dois grupos distintos foram formados entre as amostras de BoHV-5 e BoHV-1. Novamente as amostras 60, 99 e 93 (*swab* nasal) formaram um agrupamento juntamente com as amostras 1188 (SNC) e BA (sêmen).

Apesar de agrupar todas as amostras de BoHV-5, não foi possível a diferenciação daquelas de sistema nervoso central, *swab* nasal e de sêmen, uma vez que todas foram reunidas em um mesmo grupo, isso se deve provavelmente ao fato da glicoproteína G ser conservada entre estas amostras, não demonstrando grandes diferenças em suas seqüências.



12A



12B

Figura 12: Árvores filogenéticas das seqüências da glicoproteína G de BoHV. Estas foram construídas à partir de seqüências de 258 nucleotídeos codificadores da glicoproteína G de diferentes amostras de herpesvírus bovino. O alinhamento destas foi utilizado na construção da árvore, ambos utilizando-se o programa MEGA. Foi utilizado o método Neighbor-Joining nas análises, com 1000 réplicas de bootstrap. 12A – somente amostras de BoHV-5. 12B – BoHV-5 e BoHV-1.

4.6 - Relato de co-infecção entre Herpesvírus Bovino 5 e Vírus Respiratório Sincicial Bovino

Durante o desenvolvimento desta dissertação, nosso grupo de pesquisa recebeu para análise *swab* de muco nasal de três animais de um mesmo rebanho leiteiro (provenientes do município de Caeté – MG), no qual os animais apresentavam uma sintomatologia respiratória aguda. As amostras foram denominadas em nosso laboratório de 93, 99 e 60. O surto mostrou em torno de 30% de morbidade, atingindo fêmeas primíparas e pluríparas. Ao exame clínico os animais apresentaram temperatura corporal elevada (40 a 41,5°C), anorexia, queda acentuada da produção leiteira, ligeiro aumento de salivação, sendo ainda observados sinais de depressão e desidratação. À anamnese os animais apresentavam taquipnéia, estertores crepitantes, descarga muco-serosa e respiravam com dificuldade, evidenciando o comprometimento respiratório.

Os *swabs* nasais foram encaminhados ao Laboratório de Virologia do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG, aos cuidados da professora Dra. Zélia Inês Portela Lobato. As amostras foram inoculadas em monocamadas de células MDBK e apresentaram efeito citopático em cerca de 80% da monocamada em menos de 24 horas. O sobrenadante do cultivo foi então encaminhado ao Laboratório de Biologia de Microrganismos Intracelulares (LABMIC – ICB-UFMG) e também para a professora Dra. Clarice Arns, do Laboratório de Biologia Animal do Instituto de Biologia da UNICAMP, uma vez que (de acordo com o quadro observado) a suspeita clínica foi dirigida para a BoHV-1 (Rinotraqueíte Infecciosa Bovina) e Vírus Respiratório Sincicial Bovino (BRSV).

A equipe da Dra. Clarice Arns procedeu ao isolamento em monocamada de células da linhagem CRIB (células MDBK isentas de BVD), e logo em seguida o material foi testado em PCR específica para detecção do BRSV, e em teste de imunoperoxidase,

ambos confirmando a presença do vírus da BRSV nas três amostras enviadas.

No LABMIC, onde é desenvolvido este trabalho, as amostras foram também testadas na PCR desenvolvida durante esta dissertação, seguida de seqüenciamento. As amostras foram também positivas para BoHV-5, tendo o seqüenciamento confirmado esta premissa.

Embora o BoHV-5 seja disseminado por via respiratória e utilize esta via para o estabelecimento da latência no gânglio trigeminal (Vogel et al., 2004), a maioria dos relatos de infecção por este vírus se relaciona quase que exclusivamente a doença neurológica. Meyer e colaboradores (2001) relatam que o BoHV-5, diferentemente do BoHV-1, estabelece latência também na mucosa nasal e traqueal, além do gânglio trigeminal. Fatores como estresse, imunossupressão, transporte e, especialmente co-infecções, podem levar à reativação viral após um período de latência, uma vez que novos vírus são sintetizados nos sítios de latência e re-excretados nos sítios iniciais de infecção (Callan e Metre, 2004). A latência em mucosa nasal e traqueal poderia facilitar a disseminação viral por esta via. Vários relatos de infecção experimental de BoHV-5 em bezerros relatam infecção respiratória branda, com descarga nasal serosa, espirros e dificuldade respiratória. Porém, segundo Meyer e colaboradores (2001) estes sinais podem progredir até quadros respiratórios mais severos. Estes autores relatam a infecção em animais jovens. Neste trabalho, observou-se a infecção em animais adultos, já em fase de lactação.

No caso aqui descrito, o médico veterinário responsável pelo rebanho relatou ainda que vários rebanhos leiteiros da região circunvizinha apresentavam o mesmo quadro no mesmo período. Para o BoHV-1, o espalhamento por aerossóis é demonstrado em distâncias de 4 metros (Mars et al., 2000), embora seja especulado que para BoHV-1 e BoHV-5 esta transmissão possa ocorrer, durante os surtos, até em distâncias em torno de oito km (Callan e Metre, 2004).

O *Vírus Respiratório Sincicial Bovino* causa síndrome respiratória aguda em bovinos. Segundo Almeida e colaboradores (2005), pouco ainda se conhece sobre o papel do BRSV em doenças respiratórias nos bovinos no Brasil.

Estudos de soroprevalência de BRSV apontam altos números de soropositividade nos animais testados, mostrando a circulação deste importante agente viral nos rebanhos brasileiros (Arns et al., 2003).

No caso aqui relatado, não há como comprovar qual dos dois agentes foram responsáveis pela indução do grave quadro respiratório, muito provavelmente ambos. Tem sido estudada a co-infecção de BRSV e *Haemophilus somnus* (Gershwin et al., 2005), e BRSV e BVDV (Vírus da Diarreia Viral Bovina) (Brodersen e Kelling, 1999) ambos conduzidos em infecção experimental. Este é o primeiro relato de co-infecção entre BRSV e *Herpesvírus bovino 5*.

5. CONCLUSÕES

Foi padronizada uma técnica de PCR que amplifica parte da região codificadora da gG. A mesma foi capaz de detectar as amostras padrão de BoHV-1.1, BoHV-1.2 e BoHV-5. O teste mostrou-se também eficiente em amplificar amostras clínicas.

A restrição do amplicon com a enzima *XhoI* mostrou-se eficiente na separação de amostras de BoHV-5 e BoHV-1. A região trabalhada mostrou-se eficiente na separação de amostras de BoHV-1 e BoHV-5 também pelo seqüenciamento dos amplicons.

Para a região estudada (codificadora da gG), e, nas condições trabalhadas, o HMA não apresentou resultados satisfatórios.

Foi descrito durante este trabalho um caso de co-infecção entre o *Vírus Respiratório Sincicial Bovino* e BoHV-5 em uma propriedade leiteira, no interior de Minas Gerais. Esse relato evidencia a importância da triagem de agentes que induzem

quadros assemelhados, chamando a atenção para a necessidade de melhoria e disponibilização de testes diagnósticos eficientes em Medicina Veterinária. Este relato evidenciou também o envolvimento do *Herpesvírus bovino 5* em quadros respiratórios e em animais adultos em fase de lactação.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFSHAR, A., EAGLESOME, M.D. Viruses associated with bovine semen. **Vet. Bull.**, v.60, n.2, p.93-109, 1990.

ALEGRE, M.; NANNI, M.; FONDEVILA, N. Development of a multiplex polymerase chain reaction for the differentiation of bovine Herpesvirus-1 and -5. **J. Vet. Med.**, v.48, n. 8, p.613-621, 2001.

ALICE, F.J. Isolamento do vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) no Brasil. **Rev. Bras. Biol.**, v.38, n.4, p.919-920, 1978.

ALKAN, F.; OZKUL, A.; BILGE-DAGALP, S. et al. Virological and serological studies on the role of PI-3 virus, BRSV, BVDV, and BHV-1 on respiratory infections of cattle. I The detection of etiological agents by direct immunofluorescence technique. **Dtsch. Tierarztl Wochenschr.**, v.107, n.5, p. 193-195, 2000.

ALMEIDA, R.S.; SPILKI, F.R.; ROEHE, P.M.; ARNS, C.W. Detection of Brazilian bovine respiratory syncytial virus strain by a reverse transcriptase-nested-polymerase chain reaction in experimentally infected calves. **Vet. Microbiol.**, v.105, n.2, p.131-135, 2005.

ARNS, C.S., et al. Characterization of bovine respiratory virus isolated in Brazil. **Braz. J. Med. Bio. Res.**, n.36, p.213-218, 2003.

ASBIA - Associação Brasileira de Inseminação Artificial, disponível em: <<http://www.asbia.org.br/>>. Acessado em: 07/02/2006.

BABIUK, L.A.; VAN DER HURK, S.D.L.; TIKOO, S.K. Immunology of bovine herpesvirus 1 infection. **Vet. Microbiol.**, v.53, n. 1-2, p. 31-42, 1996

BARBOSA, E.F.; CARNEIRO-PROIETTI, A.B.F.; OLIVEIRA, D.R.; et al. HIV-1 Detection and Subtyping by PCR and Heteroduplex Mobility Assay in Blood Donors: Can These Tests Help to Elucidate Conflicting Serological Results? **Transfus. Sci.**, v.19, n.1, p.39-43, 1998.

BELÁK, S.; BALLAGI-PORDÁNY, A. Application of the polymerase chain reaction (PCR) in veterinary diagnostic virology. **Vet. Res. Commun.**, v.17, n.1, p.55-72, 1993.

BELKNAP, E.B.; COLLINS, J.K.; AYRES, V.K.; SCHULTHEISS, P.C. Experimental infection of neonatal calves with neurovirulent bovine herpesvirus type 1.3. **Vet. Pathol.**, v.31, n.3, p.358-365, 1994.

BELTRÃO, N. **Herpesvírus bovino tipo 5 (BHV-5): infecção experimental de bovinos e utilização de coelhos como modelo.** 2000. 54f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

BLASTN E BLASTX - Programa, bancos de dados *nr* (GenBank + EMBL + DDBJ + PDB sequences). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>>. Acessado em: 20/12/2006.

BOTELHO, R. G. A. **Desenvolvimento de testes de PCR para BoHV-5 e sua aplicação no diagnóstico de casos clínicos.** 2000. 45f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

BRASIL/Infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis. Disponível em: <<http://www.oie.int/hs2/>>. Acessado em: 20/12/2005.

BRODERSEN, B.W.; KELLING, C.L. Alteration of leukocyte populations in calves concurrently infected with bovine respiratory syncytial virus and bovine viral diarrhoea virus. **Viral Immunol.**, v.12, n. 4, p. 323-34, 1999.

CALLAN, R.J.; METRE, D.C.V. Viral diseases of the ruminant nervous system. **Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.**,v.20, n.2 p.327-62, 2004.

CARNEIRO-PROIETTI, A.B.F.; BARBOSA-STANCIOLI, E.F ; MARTINSLIMA, M.; et al. HIV - Subtyping by Heteroduplex Mobility Assay in Patients with Bleeding Disorders. **Rev. Bras. Hematol. Hemot.**, v. 21, n. 2, p. 1-5, 2000.

CENTRO NACIONAL DE INFORMAÇÃO BIOTECNOLÓGICA, disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/index.htm>>. Acessado em: 13/12/2005.

CHROMAS – programa, versão gratuita 1.45 - Technelysium Pty, Ltd, disponível em: <<http://technelysium.com.au/chromas.htm>>. Acessado em: 16/12/2005.

CIACCI-ZANELA, J.; STONE, M.; HERNDERSON, G.; JONES, C. The latency-related gene of bovine Herpesvirus 1 inhibits programmed cell death. **J. Virol.**, v.12, p.9734-9740, 1999.

CLUSTAL W – programa, versão 1.8 DOS, disponível em: <<http://www.csc.fi/molbio/progs/clustalw>>. Acessado em: 29/11/2005.

CORREA, F.R.; VIDOR, T.; SCHILD, A.L. et al. Meningoencefalite e necrose do cortex cerebral em bovinos causadas por herpesvírus bovino-1. **Pesqui. Vet. Bras.**, v.9, p.13-16, 1989.

COSTA, E.A.; BARBOSA-STANCIOLI, E.F.; LEITE, R.C. et al. Utilização de parte da região codificadora da glicoproteína b na diferenciação do herpesvírus bovino 1.1, herpesvírus bovino 1.2 e herpesvírus bovino 5. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.57, n.2, p. 143-149,2005.

- D'ARCE, R.C.F.; ALMEIDA, R.S.; SILVA, T.C. et al. Restriction endonuclease and monoclonal antibody analysis of Brazilian isolates of bovine Herpesvirus types 1 and 5. **Vet. Microbiol.**, v.88, n.4, p.315-324, 2002.
- DELHON, G.; MORAES, M. P.; LU, Z. et al. Genome of bovine herpesvirus type 5. **J. Virol.**, v. 77, p.10339-10347, 2003.
- DELWART, E.L.; SHPAER, E.G.; LOUWAGIE, J.; et al. Genetic relationships determined by a DNA heteroduplex mobility assay: analysis of HIV-1 env genes. **Science**, v. 262, n. 5137, p.1257-1261, 1993.
- DELWART, E.L.; HERRING, B.; RODRIGO, A.G.; et al. Genetic subtyping of human immunodeficiency virus using a heteroduplex mobility assay. **PCR Methods Appl.**, v.4, n. 5, p. 202-216, 1995.
- DELWART, E.L.; SHPAER, E.G.; MULLINS, J.I.; **Heteroduplex Mobility Assays for phylogenetic analysis**. San Diego: Academic Press, 1995, 160 p.
- DIEL, D.G.; FONSECA, E.T.; SOUZA, S.F.; et al. O Herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) pode utilizar as rotas olfatória ou trigeminal para invadir o sistema nervoso central de coelhos, dependendo da via de inoculação. **Pesqui. Vet. Bras.**, v.25, n.3, p. 164-170, 2005.
- EDWARDS, S.; GITAO, G.C. Highly sensitive antigen detection procedures for the diagnosis of infectious bovine rhinotracheitis: amplified ELISA and reverse passive haemagglutination. **Vet. Microbiol.**, v. 13, n.2, p.135-141, 1987.
- ENGELS, M.; ACKERMANN M. Pathogenesis of ruminant Herpesvírus infections. **Vet. Microbiol.**, v.53, n.3, p.3-15, 1996.
- ESTEVES, P.A.; SPILKI, F.R.; FRANCO, A.C.; et al. Bovine herpesvirus type 5 in the semen of a bull not exhibiting clinical signs. **Vet. Rec.**, v.152, n. 21, p.658-659, 2003.
- FLORES, E. F. Herpesvírus Bovino Tipo (BHV-1). In: ENCONTRO INTERNACIONAL DE VIROLOGIA MOLECULAR VETERINÁRIA, 1996, Santa Maria, **Anais...**, Santa Maria, RS, 1996, p. 149-156.
- GEORGE, L.W. Understanding the encephalitic form of infectious bovine rhinotracheitis. **Food Anim. Pract.**, p.335-337, 1991.
- GERSHWIN, L.J.; BERGHAUS, L.J.; ARNOLD, K.; et al. Immune mechanisms of pathogenetic synergy in concurrent bovine pulmonary infection with *Haemophilus somnus* and bovine respiratory syncytial virus. **Vet. Immunol. Immunopathol.** v.107, n. 1-2, p. 119-30, 2005.
- GOMES, L.I.; ROCHA, M.A.; COSTA, E.A. et al. Detecção de herpesvírus bovino (BoHV-5) em bovinos do sudeste brasileiro. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.54, n.2, p. 217-220, 2002.
- GOMES, L.I.; ROCHA, M.A.; SOUZA, J.C. et al. Bovine herpesvirus 5 (BoHV-5) in bull sêmen: amplification and sequence analysis of the US4 gene. **Vet. Res. Commun.**, v.27, n.6, p. 495-504, 2003.
- GREEN, J.; GALLIMORE, C.I.; SHORE, J. et al., Application of the heteroduplex mobility assay (HMA) for the investigation of the genomic diversity among noroviruses in environmental samples. **J. Virol. Methods**, v.120, n.1, p.59-67, 2004.
- HAGE, J.J.; SCHUKKEN, Y.H.; DIJKSTRA, Th. et al. Milk production and reproduction during a subclinical bovine herpesvirus 1 infection on a dairy farm. **Prev. Vet. Med.**, v. 34, n. 2-3, p. 97-106, 1998.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2005). Disponível em: www.ibge.gov.br/. Acessado em: 10/01/2006.

INMAN, M.; ZHOU, J.; WEBB, H.; et al. Identification of a Novel Bovine Herpesvirus 1 Transcript Containing a Small Open Reading Frame That Is Expressed in Trigeminal Ganglia of Latently Infected Cattle. **J. Virol.**, v. 78, n. 10, p. 5438-5447, 2004.

KAASHOEK, M.J.; RIJSEWIJK, F.A.; RUULS, R.C.; et al. Virulence, immunogenicity and reactivation of bovine herpesvirus 1 mutants with a deletion in the gC, gG, gI, gE or in both the gI and gE gene. **Vaccine**. v.16, n. 8, p. 802-809, 1998.

KENDRICK, J.W.; McENTEE, K. The effect of artificial insemination with semen contaminated with IBR-IPV virus. **Cornell Vet.**, v.57, n.22, p.3-11, 1987.

LETELLIER, C; DELANGRE, A.; DE SMET, A. et al. Characterization of monoclonal antibodies directed against the bovine herpesvirus-1 glycoprotein E and use for the differentiation between vaccinated and infected animals. **Vet. Microbiol.**, v.83, n.4, p. 301-315, 2001.

MARS, M.H.; DE JONG, M.C.; VAN MAANEN, C. et al. Airborne transmission of bovine herpesvirus 1 infections in calves under field conditions. **Vet. Microbiol.**, v. 76, n. 1, p.1-13, 2000.

MEGA – software gratuito, disponível em: <http://www.megasoftware.net/>. Acessado em: 06/11/2005.

MEYER, G.; LEMAIRE, M.; ROS, C. et al. Comparative pathogenesis of acute and latent infections of calves with bovine herpesvirus types 1 and 5. **Arch. Virol.**, v. 146, n.4, p.633-652, 2001.

MOORE, S., GUNN, M.; WALLS, D. A rapid and sensitive PCR-based diagnostic assay to detect bovine herpesvirus 1 in routine diagnostic submissions. **Vet. Microbiol.**, v.75, n.2, p.145-153, 2000.

MUELLER, S.B.K.; IKUNO, A.A.; CAMPOS, M.T.G.R. et al. Isolamento e identificação do vírus da rinotraqueíte infecciosa dos bovinos de um rim de feto bovino (IPV/IBR). **Arq. Inst. Biol. São Paulo**, v.45, n.3, p.187-190, 1978.

MUIR, W.B.; NICHOLS, R.; BREUER, J. Phylogenetic analysis of Varicella-Zoster virus: evidence of intercontinental spread of genotypes and recombination. **J. Virol.**, v.76, n.4, p.1971-1979, 2002.

MUYLKENS, B.; MEURENS, F.; SCHYNTS, F.; et al. Les facteurs de virulence des alphaherpèsvirus. **Virologie**, v.7, n.6, p. 401-415, 2003.

NAKAMICHI, K.; OHARA, K.; KUROKI, D. et al. Bovine herpesvirus 1 glycoprotein G is required for viral growth by cell-to cell infection. **Virus Res.**, v.68, n.2, p. 175-181, 2000.

NAKAMICHI, K.; KUROKI, D.; MATSUMOTO, Y. et al. Bovine herpesvirus 1 glycoprotein G is required for prevention of apoptosis and efficient viral growth in rabbit kidney cells. **Virology**, v. 279, n.2, p. 488-498, 2001.

OIE. Disponível em: http://www.oie.int/eng/normes/manual/A_00056.htm. Acessado em:17/01/2006.

OLDONI, I.; WEIBLEN, R.; INKELMANN, M.A. et. al. Production and characterization of monoclonal antibodies to a brazilian bovine herpesvirus type 5. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.37, n.2, p.213-221, 2004.

OLIGO primer analysis. Disponível em: <http://www.oligo.net/>. Acessado em: 23/01/2006.

- OLIVEIRA, S.C.; HARMS, J.S.; ROSINHA, G.M. et al. Biolistic-mediated gene transfer using the bovine herpesvirus-1 glycoprotein D is an effective delivery system to induce neutralizing antibodies in its natural host. **J. Immunol. Methods**, v. 245, n. 1-2, p. 109-118, 2000.
- OSÓRIO, F.A. Latency of bovine herpesvírus 1. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE HERPESVÍRUS BOVINO (TIPO 1 E 5) E VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA (BVDV), 1998, Santa Maria. **Anais...**, Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, RS, 1998, p.117-126.
- PASTORET, P.P.; THIRY, E.; BROCHIER, B., et al. Bovine herpesvirus 1 infection in cattle: pathogenesis, latency, consequences of latency. **Ann. Rech. Vet.**, v.13, n.3, p.221-235, 1982.
- PEREZ, S.E.; BRETSCHEIDER, C.; LEUNDA, M.R. et al. Primary infection, latency and reactivation of bovine herpesvirus type 5 in the bovine nervous system. **Vet. Pathol.**, v. 39, n. 4, p.437-444, 2002.
- ROCHA, M.A. **Herpesvírus Bovino-1 em touros de uma central de sêmen – soroneutralização e isolamento no sêmen.** Belo Horizonte, 1994. 51 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- ROCHA, M.A. **Desenvolvimento de um sistema de PCR *nested* para a detecção do Herpesvírus Bovino-1 em sêmen e feto abortado.** Belo Horizonte, 1998. 94f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- ROCHA, M.A.; BARBOSA, E.F.; GUEDES, R.M.C. et al. Detection of BHV-1 in a naturally infected bovine fetus by a nested PCR assay. **Vet. Res. Commun.**, v.23, n.2, p. 133-141, 1999.
- ROCK, D.; LOKENSGARD, J.; LEWIS, T. et al. Characterization of dexamethasone-induced reactivation of latent bovine herpesvirus 1. **J. Virol.**, v.66, n.4, p. 2484-2890, 1992.
- ROEHE, P.M.; TEIXEIRA, M.B.; ESTEVES, P.A. et al. Situação do BoHV-1 e BHV-5 no Brasil. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE HERPESVÍRUS BOVINO E VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA, 1998, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria: UFSM, 1998, p.89-96.
- ROEHE, P.M.; SILVA, T.C.; NARDI, N.B. et al. Diferenciação entre o vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (BHV-1) e herpesvírus da encefalite bovina (BHV-5) com anticorpos monoclonais. **Pesqui. Vet. Bras.**, v.17, n. 1, p. 41-44, 1997.
- ROIZMAN, B.; DESROSIERS, R.C.; FLECKENSTEIN, B. et al. The family Herpesviridae: an update. The Herpesvirus Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. **Arch. Virol.**, v.123, n.3-4, p. 425-449, 1992.
- SALVADOR, S.C.; LEMOS, R.A.A.; CORREA, F.R. et al. Meningoencefalite em bovinos causada por herpesvírus bovino-5 no Mato Grosso do Sul e São Paulo. **Pesqui. Vet. Bras.**, v.18, n.2, p.76-83, 1998.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. In: **MOLECULAR cloning: a laboratory manual.** New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, p.545.
- SCHWYZER, M.; ACKERMANN, M. Molecular virology of ruminant herpesvirus. **Vet. Microbiol.**, v.53, n. 1-2, p.17-29, 1996.
- SEAL, B.S.; WHETSTONE, C.A. Immediate-early gene expression and gene mapping comparisons among isolates of bovine herpesvirus 1 and 5. **Vet. Microbiol.**, v. 38, n.4, p. 369-384, 1994.

- SIDDAPPA, N.B.; DASH, P.K.; MAHADEVAN, A. et al. Identification of subtype C Human Immunodeficiency virus type 1 by subtype-specific PCR and its use in the characterization of viruses circulating in the southern parts of India, **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, n. 6, p. 2742-2751, 2004.
- SPILKI, F.R.; FRANCO, A.C.; TEIXEIRA, M.B. et al. Bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) in a calf with rabies. **Pesqui. Vet. Bras.**, v. 23, n.1, p. 1-4, 2003.
- SPILKI, F.R.; SILVA, A.D.; HÜBNER, S.O. et al. Partial protection induced by a BHV-1 recombinant vaccine against challenge with BHV-5. **Ann. Acad. Sci.**, v. 1026, p. 247-250, 2004.
- SPILKI, F.R.; ESTEVES, P.A.; SILVA, A.D. et al. A monoclonal antibody-based ELISA allows discrimination between responses induced by bovine herpesvirus subtypes 1 (BoHV-1.1) and 2 (BoHV-1.2). **J. Virol. Methods**, v. 129, n.2, p. 191-193, 2005.
- THIRY, J.; KEUSER, V.; MUYLKENS, B. et al. Ruminant alphaherpesviruses related to bovine herpesvirus 1. **Vet. Res.**, v. 37, n. 2, p. 169-190, 2006.
- TRAPP, S.; BEER, M.; METTENLEITER, T.C. Biology of bovine herpesviruses, **Berl. Muench. Tieraerztl. Wochenschr.**, v.16, n.5-6, p.171-178, 2003.
- VAN DER OIRSCHORT, J.T.; STRAVER, P.J.; LIESHOUT, J.A.M. et al. A sub-clinical infection of bulls with bovine herpesvirus type 1 at an artificial insemination centre. **Vet. Rec.**, v.132, n.2, p. 32-35, 1993.
- VOGEL, F.S.F.; FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; KUNRATH, C.F. Atividade neutralizante anti-herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e 5 (BoHV-5) no soro de bovinos imunizados com vacinas contra o BoHV-1. **Cienc. Rural**, v.32, n.5, p.881-883, 2002.
- VOGEL, F.S.F.; LIMA, M.; FLORES, E.F. et al. Replicação e excreção viral durante a infecção aguda e após a reativação da latência induzida por dexametasona em bezerros inoculados com os herpesvírus bovinos 1 (BoHV-1) e 5 (BoHV-5). **Cienc. Rural**, v.34 n.5, p.1619-1621, 2004.
- WALERIA-ALEIXO, A; KROON, E.G.; CAMPOS, M.A. et al. Heteroduplex mobility assay for rapid, sensitive and specific detection of mycobacteria. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v.36, n.4, p.225-35, 2000.
- WELLENBERG, G.J.; MARS, M.H.; VAN OIRSCHOT, J.T. Antibodies against bovine herpesvirus (BHV) 5 may be differentiated from antibodies against BHV1 in a BHV1 glycoprotein E blocking ELISA. **Vet. Microbiol.**, v. 78, n. 1, p. 79-84, 2001.
- WINKLER, M.T.C.; DOSTER, A.; SUR, J.H.; JONES, C. Analysis of bovine trigeminal ganglia following infection with bovine herpesvirus 1. **Vet. Microbiol.**, v.86, n.1-2, p. 139-155, 2002.