

Antônio Augusto Fonseca Júnior

**Epidemiologia molecular
de amostras brasileiras
do vírus da doença de Aujeszky**

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

Área de Concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Jenner Karlisson Pimenta dos Reis

**Belo Horizonte
UFMG – Escola de Veterinária
2008**

Agradecimentos

Aos meus pais, pela ajuda e estímulo;

À Daiane por estar comigo e apoiar durante boa parte desse trabalho;

Ao professor Jenner K. Pimenta dos Reis, por ter aceito me orientar durante esse trabalho;

Ao professor Rômulo Cerqueira Leite, pela ajuda e aprendizado durante esse tempo;

Ao professor Marcos Bryan Heneimann, grande colaborador em todas as análises, com informações e ensino essenciais para ao avanço nos estudos;

Ao Marcelo Fernandes Carmagos, que ajudou e apoiou desde o início tanto se dispondo à co-orientação quanto para ensinar;

Ao Ricardo Aurélio Nascimento Pinto, diretor do LANAGRO/MG, e ao Pedro Moacir C. P. Mota, coordenador da Seção de Biologia do LANAGRO/MG, pela liberação para os estudos do mestrado;

Ao Anapolino Macedo de Oliveira, pelo apoio na execução dos trabalhos e incentivo para a continuação dos estudos;

Aos colegas da Virologia, Alberto, Annita, Anselmo, Jaqueline, Lucília, Marconi, Pedro cujo apoio não foi apenas na execução dos trabalhos, mas também na convivência e nas conversas;

Ao pessoal do Retrolab, Elizangêla, Fernanda, Gissandra, Juliano, com quem aprendi muito nas reuniões periódicas.

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
1 INTRODUÇÃO	11
2.0 REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1 Taxonomia do SHV-1	11
2.2 Genoma do SHV-1	12
2.3 Capsídeo, Tegumento e Envelope	13
2.4 Glicoproteínas	13
2.5 Penetração e Replicação	15
2.6 Latência	15
2.7 Epidemiologia	16
2.8 Impacto Econômico	16
2.9 Sinais Clínicos	16
2.10 Diagnóstico	17
2.11 Vacinação	18
2.12 Controle e Erradicação	18
2.13 Epidemiologia Molecular	19
3 MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 Amostras	20
3.2 Extração do DNA	22
3.3 PCR	22
3.4 Purificação dos Produtos de PCR	22
3.5 Seqüenciamento	22
3.6 Análise Molecular	22
3.7 Análise Preditiva da Restrição Enzimática	23
3.8 Análise de Recombinação	24
3.9 Análise Preditiva das Seqüências Traduzidas	24
3.9.1 Análise da Estrutura Secundária e Homologia	24
3.9.2 Identificação de Sítios Específicos de Seleção Positiva e Seleção Negativa	24
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4.1 Amplificação, Purificação e Seqüenciamento	25
4.2 Análise Molecular	25
4.3 Análise De Recombinação	34
4.4 Análise Preditiva da Restrição Enzimática	36
4.5 Análise Preditiva das Seqüências Traduzidas	36
4.5.1 Análise das Estruturas Secundárias e Homologia	36
4.5.2 Identificação de Sítios Específicos de Seleção Positiva e Seleção Negativa	46
5 CONCLUSÃO	48
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Propriedades e funções das glicoproteínas do SHV-1	15
Quadro 2: Amostras virais utilizadas no trabalho	21
Quadro 3: Amostras do GenBank selecionadas para construção da árvore filogenética para gE	23
Quadro 4: Amostras do GenBank selecionadas para construção da árvore filogenética para gC	23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estimativa da Divergência Evolutiva entre os grupos exposta em porcentagem	26
Tabela 2: Estimativa da Divergência Evolutiva entre os grupos exposta em porcentagem	29
Tabela 3: Resultado da Análise de Recombinação no programa START2	36

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Árvore evolutiva de vários tipos genômicos europeus do SHV-1 baseada em análise de restrição (Christensen et al., 1988).	20
Figura 2: Filograma da relação genealógica entre amostras brasileiras. Árvore reconstruída utilizando-se o gene de gE como alvo e o modelo de Neighbor-Joinning com 1.000 réplicas de Bootstrap.	27
Figura 3: Filograma da relação genealógica entre amostras brasileiras e internacionais. Árvore reconstruída utilizando-se o gene de gE como alvo e o modelo de Neighbor-Joinning com 1.000 réplicas de Bootstrap.	28
Figura 4: Filograma da relação genealógica entre amostras brasileiras. Árvore reconstruída utilizando-se o gene de gC como alvo e o modelo de Neighbor-Joinning com 1.000 réplicas de Bootstrap.	30
Figura 5: Filograma da relação genealógica entre amostras brasileiras e internacionais. Árvore reconstruída utilizando-se o gene de gC como alvo e o modelo de Neighbor-Joinning com 1.000 réplicas de Bootstrap.	31
Figura 6: Mapa com distribuição das amostras feito a partir do programa Google Earth (disponível em www.earth.google.com).	32
Figura 7: Gráfico com o perfil da escala da média de hidrofília de Hopp & Woods com intervalo de análise de 7 aminoácidos.	37
Figura 8: Resultado da análise de estrutura secundária e acessibilidade relativa a solvente pelo programa Scratch para as amostras 3303 e 3319 representando os grupos A e B1.	38
Figura 9: Resultado da análise de estrutura secundária e acessibilidade relativa a solvente pelo programa Scratch para as amostras Shope e Nova Prata representando B2.	39
Figura 10: Gráfico com o perfil da escala da média de hidrofobia de Kyte & Doolittle com intervalo de análise de 7 aminoácidos.	40
Figura 11: Gráfico com o perfil da escala da média de hidrofília de Hoops & Woods com intervalo de análise de 7 resíduos.	41
Figura 12: Gráfico com o perfil da escala da média de hidrofília de Hoops & Woods com intervalo de análise de 7 resíduos.	41

Figura 13: Resultado da procura por domínios em Prodom para amostras 3303 (grupo A), 3319 (grupo B), Bartha e 3338.	42
Figura 14: Predição do efeito das mudanças de aminoácidos na função protéica pelo programa SIFT	43
Figura 15: Predição da estrutura secundária resultante da análise no programa nnPredict	43
Figura 16: Resultado da análise de acessibilidade a solvente pelo programa Scratch	43
Figura 17: Resultado do teste para pressão seletiva em gC	47
Figura 18: Resultado do teste para pressão seletiva em gE	48

RESUMO

A doença de Aujeszky é uma enfermidade causada pelo Herpesvírus suídeo 1 (SuHV-1) e é responsável por perdas econômicas consideráveis na indústria de suínos. É caracterizada por sinais clínicos graves com alta letalidade em animais jovens e pode estabelecer infecção latente no glânglios neuronais. O primeiro diagnóstico no Brasil ocorreu em 1912 em São Paulo (SP). Novos focos ocorreriam depois com um impacto de um milhão de reais por ano somente no estado de Santa Catarina (SC). É uma doença de notificação obrigatória desde 1934 e um programa de erradicação foi aprovado em 2007. O objetivo desse trabalho foi utilizar a epidemiologia molecular como uma ferramenta para assistir no estudo dos focos. Vinte e cinco isolatos das regiões sul e sudeste, a estirpe padrão Shope e a estirpe vacinal Bartha foram multiplicadas em células PK-15 e submetidas a uma PCR para os genes de gE e gC. A estirpe Bartha (sB) amplificou apenas para gC como esperado. Os amplicons foram purificados, quantificados e seqüenciados utilizando-se o Big Dye Terminator Kit. As seqüências foram editadas e alinhadas com Bioedit (v. 7.0.5.3) e as árvores filogenéticas foram reconstruídas no MEGA 4.0 usando o método de Neighbor-Joining. As seqüências para gE foram altamente conservadas e agrupadas em dois grupos maiores (A e B, dividida em B1 e B2). Um grupo foi formado por Shope, isolados de 1983 e 1984 do Paraná (PR), Minas Gerais (MG) e dois isolados de SP. Isolados de SC e do Rio Grande do Sul (RS) agruparam-se no grupo B. O subgrupo B2 foi formado por isolados de focos ocorridos em 1983 (SC), 2000 (PR) e 2003 (RS). A árvore filogenética para gC teve valores de bootstraps maiores com quase todos os isolados nos mesmos grupos que da árvore de gE. Apenas dois isolados de RS (anos 1954 e 2003) agruparam-se em B2. Todos os outros isolados de SC e dois de SP agruparam-se em B1. Shope e sB e um isolado de SP (1990) agruparam-se em um quarto e novo grupo. Resultados mostraram que os isolados brasileiros agruparam-se em quatro diferentes grupos. Os focos mais recentes no PR e RS foram causados por isolados similares aos encontrados em SC desde 1984. Dois alelos para gE foram encontrados e podem estar relacionados com os períodos dos focos nos estados do Sul. As mutações não-sinônimas não tiveram influência nos sítios funcionais para N-glicosilação (N-g) em ambos os genes. Seqüências de gC tiveram maior variabilidade e adições e deleções de trincas de nucleotídeos. Nenhum dos três domínios de ligação à heparina foram afetados pelas mutações. Um sítio quente entre os nucleotídeos 535 e 559 resultou em uma mudança de uma região hidrofóbica para hidrofílica nos isolatos de SC, RS e sB. Apesar das muitas mutações em sB, as mesmas não ocorreram no domínio hidrofóbico N-terminal de 22 aminoácidos. Esse domínio funciona como uma seqüência sinal e já foi descrito anteriormente como mutado em sB de modo a participar na redução da virulência da estirpe. Todos os isolados brasileiros, exceto um de SP, agruparam-se em clados diferentes dos isolados internacionais. Os resultados provam que os isolados brasileiros divergem geneticamente das estirpes internacionais, mas não possuem mudanças significativas na composição dos aminoácidos.

Palavras-chave: Pseudorabia, epidemiologia molecular, suínos, Doença de Aujeszky

ABSTRACT

Aujeszky's disease is a disease caused by Suid Herpesvirus 1 (SuHV-1) and responsible for considerable economic losses in the swine industry. The illness is marked by severe clinical signs with high lethality in young animals and can establish latent infection in the neuronal ganglia. The first diagnostic in Brazil was done in 1912 in São Paulo (SP). New outbreaks occurred since then with an impact of one million reais per year in Santa Catarina State (SC). It is a notifiable disease since 1934 and an eradication program was approved in 2007. The objective of this work was to use molecular epidemiology as a tool to assist in the study of the outbreaks. Twenty five isolates from south and southeast regions, the standard strain Shope and the vaccine strain Bartha were multiplied in PK-15 cells and submitted to PCR for gE and gC genes. The strain Bartha (sB) only amplified for gC as expected. The amplicons were purified, quantified and sequenced using Big Dye Terminator Kit. Sequences were edited and aligned with Bioedit (v.7.0.5.3) and the phylogenetic trees constructed in MEGA 4.0 using the Neighbor-Joining Method. Sequences for gE were highly conserved and grouped in two major groups (A and B, divided in B1 and B2). A group were formed by Shope, isolates from 1983 and 1984 from Paraná (PR), Minas Gerais (MG) and two strains from SP. Isolates from SC and Rio Grande do Sul (RS) clustered in B1 group. The B2 group had three isolates, one from each southern state from outbreaks occurred in 1983 (SC), 2000 (PR) and 2003 (RS). Phylogenetic tree for gC had higher bootstraps values with almost all isolates in the same groups as in gE tree. Only two strains from RS (years 1954 and 2003) clustered in B2. All other strains from SC and two from SP clustered in B1 group. Strains Shope, Bartha and an isolate from SP (1990) clustered in a fourth and new group. Results showed that Brazilian isolates clustered in four different groups. The most recent outbreaks in PR and RS were caused by strains similar to those occurred in SC since 1984. Two alleles for gE were found and could be related to periods of outbreaks in southern states. The non-synonymous mutations had no influence in the functional sites for N-glycosilation (N-g) in both genes. gC sequences had more variability, some triplets deletions and additions. None of the six N-g sites or the three heparin-binding domains were affected by the mutations. A hot spot region between nucleotides 535 and 559 resulted in a change from hydrophobic to a hydrophilic region in isolates related to Santa Catarina, Rio Grande do Sul and sB. Despite the many mutations in sB, these changes did not occur in 22-amino-acid N-terminal hydrophobic domain. This domain functions as a signal sequence and was previous described that mutations in this region in sB were responsible for the reduction in N-g and maturation of gC, which would affect virulence. All Brazilian isolates, except for one sample from São Paulo, clustered in different clades from the international isolates. Results prove that Brazilian isolates diverge genetically from international strains but do not have significant mutations in amino acid composition. It also showed a different result for the signal previously described for sB.

Keywords: Pseudorabies, molecular epidemiology, swine, Aujeszky's disease

1 INTRODUÇÃO

O herpesvírus suídeo 1 (SHV-1) é o causador da pseudo-raiva, enfermidade contagiosa e epidêmica que acomete suínos em diversas fases de produção. A doença foi descrita pela primeira vez em bovinos em 1813, apesar da maior importância econômica em suínos. Foi descrita como “mad itch” por causa do prurido intenso e eventual morte ocorridos nos animais acometidos. Devido aos sinais clínicos parecidos com os da raiva, passou a ser denominada pseudo-raiva na Suíça, em 1849. A outra denominação, Doença de Aujeszky (DA), passou a ser utilizada depois de 1902, quando Aládar Aujeszky estabeleceu que o agente etiológico não era bacteriano. Apenas em 1934, Sabin e Wright identificaram o agente etiológico da pseudo-raiva como um herpesvírus imunologicamente relacionado com o herpes simplex e herpes B vírus.

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

um ambiente que favorece a manutenção e difusão do vírus dentro do rebanho.

Os suínos constituem o quarto maior rebanho brasileiro, com cerca de 32.013.227 cabeças em 2002, de acordo com dados do IBGE. A produção é de 2.240 mil toneladas por ano com um consumo per capita de 12 kg/habitante/ano. As exportações somam 528,2 mil toneladas com uma receita de 1,04 bilhão de reais. Sendo uma produção importante para o país, é fundamental o estudo de enfermidades que podem causar alto impacto como a DA. A DA é uma doença de notificação obrigatória e citada na lista de enfermidades da Organização Mundial de Saúde Animal, o que gera a possibilidade de criação de barreiras sanitárias que impossibilitam o comércio ou diminuem o valor da carne suína no mercado internacional.

O objetivo desse trabalho foi analisar amostras do SHV-1 isoladas de focos da DA desde a década de oitenta, permitindo um melhor entendimento dos padrões de distribuição e migração do vírus e sua evolução no território brasileiro.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 TAXONOMIA DO SHV-1

O SHV-1 é um membro da subfamília *Alphaherpesvirinae* dentro da família *Herpesviridae*. Existem quatro gêneros de alphaherpesvírus, estabelecidos segundo similaridade de seqüência genômica: *Varicellovirus* (varicella-zoster vírus), *Simplex-virus* (herpes simplex vírus tipo 1), *infectious laryngotracheitis-like vírus* (vírus da laringotraqueíte infecciosa) e *Marek's disease-like vírus* (vírus da doença de Marek). O SHV-1 foi agrupado no gênero *Varicellavirus*

com outros importantes patógenos de animais como herpesvírus bovino 1 (BHV-1) e herpesvírus eqüino 1 e 4 (EHV-1 e EHV-4) (Klupp et al., 2004).

Trabalhos recentes ratificam a taxonomia do SHV-1 a partir de seqüenciamento e análise filogenética. A comparação de seqüências de DNA altamente conservadas de genes de glicoproteínas dos herpesvírus permitiu demonstrar a semelhança genética entre o SHV-1 e o BHV-1, demonstrando que o vírus da pseudo-raiva é ainda mais próximo do herpesvírus bovino do que do varicella-zoster vírus (McGeoch, 1994; McGeoch, 2000).

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

2.2 GENOMA DO SHV-1

O genoma do vírus da Doença de Aujeszky é uma molécula de DNA linear em fita dupla com o tamanho entre 140 e 150 kb, aproximadamente 143.461 nucleotídeos. Estima-se que possua 73 genes. Mais de 70 open reading frames (ORFs) foram identificadas com homólogos relacionados com outros alphaherpesvirus, nenhuma única ao SHV-1. Há um alto percentual de

guanina e citosina (68 % a 74 %), sendo a terceira base do códon aquela com maior índice de incidência G+C. o genoma consiste em uma seqüência única longa (U_L) de 100 kb e uma seqüência única curta (U_S) de 10 kb suportada por duas seqüências invertidas, a interna (IR) e a terminal (TR). Tal disposição genômica é referida como classe 2 ou D, característica do gênero *Varicellazostervirus*. A presença de seqüências invertidas é um fenômeno intrigante para o qual não se encontrou significância fenotípica (Klupp et al., 2004).

Uma deleção na junção das seqüências U_L e repetição interna reduz a virulência do SHV-1. Quando o vírus é inoculado por via intranasal, há uma virulência reduzida e não há produção dos sinais neurológicos característicos da infecção. Ocorre replicação eficiente no local de inoculação e tecidos nervosos periféricos, entretanto a replicação é restrita no sistema nervoso central (Dean et al., 1995).

Foi sugerido que o precursor da região U_S inclui um progenitor de uma glicoproteína simples e origina-se de uma fonte não-herpesviral. Eventos de recombinação resultantes em duplicação e divergência foram sugeridos como fatores importantes na evolução das seqüências flanqueadoras e da família de genes das glicoproteínas da região U_S (McGeoch, 1990).

Variantes genômicas de uma cepa de campo podem coexistir. Foi comprovado que um conjunto de variantes genômicas do SHV-1 é uma característica estável de uma cepa. Mesmo que possam ser encontradas diferentes variantes em populações diferentes, os *pools* são indistinguíveis (Christensen, 1995).

2.3 CAPSÍDEO, TEGUMENTO E ENVELOPE

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

Os genes homólogos do capsídeo do SHV-1 são o UL18 (parte das estruturas triplex entre os capsômeros, em conjunto com UL38, proteína de 295 aminoácidos, 31,6 kDa), UL19 (proteína maior que forma hexons e pentons, 1330 aminoácidos, 146 kDa), UL26 (requerida para formação do capsídeo e maturação, 524 aminoácidos, 54,6 kDa), UL 26.5 (substrato para UL26, 278 aminoácidos, 54,6 kDa), UL35 (103 aminoácidos, 11,5 kDa) e UL38 (forma triplexes com UL18, 368 aminoácidos, 40 kDa). Outros genes são UL25, cujo produto é requerido para montagem do capsídeo, UL21 e UL6, cujo produto é sítio de ancoragem da terminase (Newcomb et al., 1999; Klupp et al., 2004).

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

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

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

2.4 GLICOPROTEÍNAS

As glicoproteínas do SHV-1 são homólogas às glicoproteínas do HSV. Depois do 18th International Herpesvirus Workshop (1993) foi recomendado que os nomes dados a essas glicoproteínas do agente da doença de Aujeszky fossem os mesmos das proteínas homólogas do herpes vírus simplex. Os nomes antigos e os novos aparecem no Quadro 1.

A glicoproteína gB tem peso molecular de 155 kDa e é formada por um complexo de 3 subunidades, a, b e c (Christensen, 1995). É essencial para o desenvolvimento do SHV-1, com importância na penetração e na difusão célula-célula (Mettenleiter, 1996). É a mais conservada entre as proteínas dos alphaherpesvirus, sendo inclusive usada em análises filogenéticas entre as diferentes espécies dessa subfamília

(Robins et al., 1987; Ros et al., 1999; McGeoch et al., 2000).

O peso molecular de gC é de 92 kDa. É o componente principal na ligação à superfície celular. A ausência de gC causa diminuição da virulência em porcos com mais de 3 semanas de idade, porém não há efeito em neonatos. Desconhece-se o modo como a idade afeta a virulência (Nauwynck, 1997). A combinação com gE tem papel no egresso do vírus da célula infectada. A glicoproteína está envolvida em dois passos distintos de adesão do vírus à célula (Zsak et al., 1991). Contém oito sítios de N-glicosilação e três domínios redundantes de ligação à heparina (HBD) (Trybala et al., 1998). A glicoproteína C é imunologicamente importante e o gene que a codifica é uma das regiões mais variáveis do genoma do SHV-1 (Ishikawa et al., 1996).

O gene da glicoproteína gD está localizado na região U_s e é provavelmente co-traduzido com gI. Há apenas 20 bases entre o códon de terminação da gD e o códon de iniciação da gI, à jusante (Petrovskis, 1986). Está envolvida na anexação e penetração do vírus, sendo essencial nesse sentido, porém não é requerida para o espalhamento célula-célula.

A estrutura da glicoproteína E é composta por três domínios distintos: um domínio extra-celular de 428 aminoácidos, um domínio trans-membrana hidrofóbico de 26 aminoácidos e um domínio

citoplasmático altamente carregado de 123 aminoácidos (Tirabassi et al., 1998). As glicoproteínas gE e gI formam um complexo ligado não-covalentemente que é expresso na membrana da célula infectada (Nauwynck, 1997). Não são essenciais para o desenvolvimento do vírus, porém a ausência de gE reduz a virulência. É comumente deletada nas vacinas atenuadas de SHV-1 (Mulder et al., 1994; Stegeman et al., 1997). Os vírus deletados possuem uma capacidade reduzida para infectar neurônios de segunda e terceira ordem nas rotas olfatórias e do trigêmeo.

O gene para gH está localizado a jusante do gene da timidina quinase e codifica uma proteína de 95 kDa. Representa a segunda glicoproteína mais conservada entre os herpesvírus (Christensen, 1995). É essencial para o desenvolvimento do vírus com papel de destaque na penetração e na difusão célula-célula (Nauwynck, 1997).

Outras glicoproteínas são gG, que se acumula no meio de células infectadas e não é associada a nenhuma função ou característica fenotípica; gK, essencial, conservada entre os alphaherpesvírus e com papel na difusão célula-célula; gL, essencial, conservada na família dos herpesvírus e com papel na penetração e difusão célula-célula; gM, com função modulada na penetração e conservada na família dos herpesvírus e forma um heterodímero com gN (Christensen, 1995).

Quadro 1: Propriedades e funções das glicoproteínas do SHV-1

Designação	Gene	Essencial	Adesão	Penetração	Difusão célula-célula	Difusão Neuronal	Conservada *		
							α	β	γ
gB (gII)	UL27	+	-	+	+	+	+	+	+
gC (gIII)	UL44	-	[+]	-	-	-	+		
gD (gp50)	US6	+	[+]	+	[+]	-	+		
gE (gI)	US8	-	-	-	[+]	[+]	+		
gG (gX)	US4	-	-	-	-	-	+		
gH	UL22	+	-	+	+	+	+	+	+
gI (gp63)	US7	-	-	-	[+]	[+]	+		
gK	UL53	+	?	?	+	?	+		
gL	UL1	+	-	+	+	?	+	+	+
gM	UL10	-	?	[+]	-	-	+	+	+
gN	UL49,5	-	-	[+]	-	-			

+, função essencial; [+], função moduladora; -, sem envolvimento; ?, sem informações

* Conservação entre os alfa-, beta- e gama-herpesvírus.

2.5 PENETRAÇÃO E REPLICAÇÃO

A penetração e replicação do SHV-1 foram descritas por Pomeranz et al. (2005). A entrada do SHV-1 na célula ocorre a partir da interação das glicoproteínas virais com a membrana celular. Primeiro ocorre a adesão pela interação de gC na matriz extracelular; gD liga-se a um receptor celular específico e estabiliza a interação célula-víron. gB, gH e gL mediam a fusão do envelope viral e da membrana plasmática celular para permitir a penetração do capsídeo e do tegumento no citoplasma celular. Enquanto o processo de adsorção depende de temperatura e de energia, a fusão independe desses fatores. O tegumento toma controle da maquinaria de síntese protéica celular imediatamente, enquanto as proteínas do capsídeo e do tegumento interno são transportadas através de microtúbulos até o núcleo celular. A proteína tegumentar VP16 ativa a RNA polimerase II celular para a transcrição do gene IE180.

A proteína do IE180 é expressa no citoplasma e levada de volta para o núcleo celular onde ativa a transcrição

dos genes precoces pela RNA polimerase II. As proteínas dos genes precoces envolvem-se na síntese de DNA viral ou ativadoras de transcrição. A replicação do DNA viral, ocorrida pelo mecanismo de "rolling-cycle", sinaliza os estágios mais tardios do ciclo de replicação e a síntese das proteínas verdadeiramente tardias. As proteínas do capsídeo são transportadas para o núcleo onde ocorre a maturação do capsídeo e a inserção do DNA genômico. Durante a saída do núcleo celular, o nucleocapsídeo viral funde-se com a membrana interna, adquirindo seu envelope primário, e escapa para o espaço perinuclear. A morfogênese segue com a perda do envelope primário e o ganho do envelope final em associação com o tegumento nas organelas de secreção celular. O vírus maduro é levado para a superfície celular em uma espécie de compartimento ou vesícula derivada do compartimento do envelope.

2.6 LATÊNCIA

Animais sobreviventes de uma infecção aguda do SHV-1 estarão inevitavelmente infectados com o vírus

em sua forma latente pelo restante de suas vidas. A latência geralmente ocorre no gânglio trigêmeo ou bulbo olfatório dos suínos. O vírus não pode ser isolado nesse estado, no entanto seu genoma permanecerá em forma nucleossomal. O genoma permanece ativo para transcrição, mas apenas uma pequena região é transcrita (Pomeranz et al., 2005).

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

2.7 EPIDEMIOLOGIA

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

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

A doença é considerada endêmica no Brasil (Groff et al., 2003). Focos já foram registrados em Minas Gerais, Rio de Janeiro e todos os estados da região

Sul. Estudos realizados entre 1982 e 1986 em São Paulo relataram a existência de 66 focos da DA, além de um levantamento sorológico que determinou uma prevalência de 2,6% (Cunha et al., 1998). O estado de Santa Catarina registra a ocorrência da enfermidade desde 1983 com um aumento gradativo das granjas afetadas até o início do século XXI, quando se notou uma diminuição no número de relatos (Groff et al., 2003).

2.8 IMPACTO ECONÔMICO

A DA está difundida mundialmente e é considerada uma importante causa de perdas econômicas na criação de suínos (Piatti, 2001). Campanhas de erradicação já foram feitas em vários países, sendo que o programa de erradicação da DA na Inglaterra teve uma duração de dez anos. Nos Estados Unidos, a estimativa do custo do programa de erradicação foi de 197,1 milhões de dólares, sendo que haveria um ganho de 336,5 milhões de dólares para o consumidor e 35,9 milhões de dólares para o produtor (Miller, 1996).

No Brasil, a enfermidade tem um impacto de quase um milhão de reais, um dado estimado exclusivamente para o estado de Santa Catarina (Zanella, 2001). Em 2003, 5.075 animais foram destruídos e 29.350 foram abatidos. Nos anos seguintes, houve uma diminuição de focos, com apenas 3 focos relatados em 2005 (OIE, 2006).

2.9 SINAIS CLÍNICOS

Os sintomas desenvolvidos pelos animais infectados pelo SHV-1, segundo Kluge et al. (1999), variam principalmente segundo a faixa etária, estando ainda associados à amostra e dose infecciosa. Há uma predileção pelos tecidos nervosos e respiratórios,

sendo os primeiros mais freqüentes em animais jovens e os últimos nos mais velhos. O desenvolvimento da enfermidade nem sempre é aparente, sendo detectável apenas por sorologia em alguns rebanhos enquanto em outros ocorre uma rápida e grave disseminação do agente. A ausência dos sintomas clínicos é mais freqüente quando não há animais muitos jovens no local, sendo esses os mais susceptíveis à infecção.

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

Dois a quatro dias de idade: Ocorre um período de incubação de dois a quatro dias antes que os sinais clínicos sejam observados. Nota-se então febre (41 °C), anorexia e depressão. Dentro de 24 horas, poderá haver sinais ligados ao sistema nervoso central (SNC) como hipersalivação, incoordenação, ataxia e tremores. Os animais afetados tendem a se sentar como cães devido à paralisia dos membros posteriores. Após a apresentação dos sinais clínicos no SNC, os animais tendem a morrer em 24-36 horas. A mortalidade alcança até 100 %.

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

dias). A mortalidade é mais freqüente nos leitões que apresentam sinais do SNC e naqueles que sofrem uma infecção secundária concomitante aos sintomas respiratórios.

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

Animais adultos: Os sinais desenvolvidos são similares aos dos animais de terminação. Fêmeas prenhas abortam freqüentemente. Ocorre a reabsorção do feto no primeiro semestre de gestação. As falhas reprodutivas entre o segundo e o terceiro trimestres são caracterizadas pelo aborto e nascimento de animais fracos ou prematuros. Esses sintomas ocorrem em cerca de 20 % das fêmeas infectadas.

2.10 DIAGNÓSTICO

O Manual de Testes de Diagnóstico e Vacinas de Animais Terrestres (OIE, 2004) prevê o diagnóstico da DA utilizando-se isolamento viral em células de linhagem suscetíveis como PK15. Testes sorológicos e de detecção de DNA também são indicados.

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

As técnicas de PCR são previstas para a o diagnóstico, mas ainda sem um procedimento padrão. Recomenda-se a utilização de regiões conservadas como os genes para gB e gD. A técnica pode contribuir para o diagnóstico da DA e identificação rápida dos vírus em campanhas de monitoramento ou de erradicação para se analisar a presença de animais únicos reativos, i. e., indivíduos do rebanho que reagem positivamente nos testes de ELISA utilizados no monitoramento que aparentemente não são infectados (Bascuñana, 1997).

Doenças para o diagnóstico diferencial são influenza suína, pneumonia enzoótica, pasteurelose suína, peste suína clássica, meningite estreptocócica, hipoglicemia neonatal, intoxicação por sal, leptospirose (MAPA, 2007).

2.11 VACINAÇÃO

A utilização de vacinas tem um papel importante na redução das perdas econômicas causadas pela DA. Sua função principal é a de reduzir ou até prevenir as conseqüências clínicas da infecção. Possuem um potencial para interferir na disseminação do vírus, ainda que os animais não estejam protegidos contra infecções

subseqüentes. A escolha de sua utilização é parte importante de um programa de erradicação, podendo ser altamente necessária em propriedades localizadas em regiões de alto risco. Soma-se a isso a possibilidade de a vacinação reduzir a disseminação do vírus em um rebanho infectado, facilitando os testes e remoção dos contaminados (Mengeling et al., 1997).

As vacinas para a DA estão disponíveis como vacinas vivas ou inativadas. A deleção de genes específicos é essencial para a posterior diferenciação dos animais vacinados. O Plano de Contingência da Doença de Aujeszky prevê a utilização de ambas com deleção para gE, mas apenas em focos com diagnóstico laboratorial positivo para DA. A diferenciação de animais vacinados é feita por ELISA, mas ainda existe a possibilidade de diagnóstico por PCR para identificação de animais únicos reativos.

2.12 CONTROLE E ERRADICAÇÃO

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

Antes do desenvolvimento do plano estadual, a unidade federativa deverá realizar um inquérito soropidemiológico nos estabelecimentos de criação com histórico de ocorrência da doença ou vacinação. Uma vez aplicadas as normas, haverá a necessidade de um segundo inquérito para se solicitar a

certificação de zona livre ou provisoriamente livre. Em caso de atividade viral não ser observada já no primeiro inquérito e o estado estiver de acordo com a normas e exigências sanitárias federais e da OIE, poderá haver a solicitação direta da certificação.

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

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

2.13 EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR

A epidemiologia integra a prática veterinária como um fator indispensável para um desenvolvimento e exploração bem sucedidos dos rebanhos. Essa área do conhecimento engloba o estudo de determinantes de saúde, doença e produtividade nas populações. Dentre as ferramentas da epidemiologia molecular utilizadas estão as técnicas de biologia molecular. O termo já foi confundido apenas como o estudo de taxonomia e filogenia. Levin et al. (1999) definem o objetivo da epidemiologia molecular como “identificar os microparasitas responsáveis pelas doenças infecciosas e determinar suas

fontes físicas, suas relações biológicas, as rotas de transmissão e os genes responsáveis pela virulência, antígenos relevantes para vacina e resistência a drogas”.

As técnicas da biologia molecular são variadas, no entanto serão citados aqui apenas as relevantes a esse trabalho. O polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP, *restriction fragment length polymorphism*) trabalha com o corte do DNA do microorganismo por enzimas de restrição. O genoma fragmentado é então analisado através de eletroforese em gel onde são visualizadas bandas de tamanhos diferentes de acordo com os cortes. As diferenças no perfil de bandas são geradas por polimorfismos que afetam os sítios de restrição, permitindo então diferenciar amostras virais.

Os isolados de campo do SHV-1 foram subdivididos em tipos genômicos através da análise de padrões de fragmentos de restrição, principalmente com o uso da enzima BamHI. Uma sistematização foi sugerida por Hermann et al. (1984) propondo três tipos genômicos para os isolados europeus. Foi confirmada e incrementada posteriormente, criando divisões dentro dos tipos genômicos (Christensen, 1988). As subdivisões são tipo genômico I (Ia, Ia, Ib, In, Ip, Is, Iip), encontrado no Reino Unido, Suécia e Nova Zelândia, tipo genômico II (IIa, IIp), encontrado no Japão e Europa Central, tipo genômico III (IIIa, IIIp), encontrado na Dinamarca. Uma árvore filogenética para os diferentes tipos genômicos foi proposta por Christensen et al. (1988) (Fig. 1).

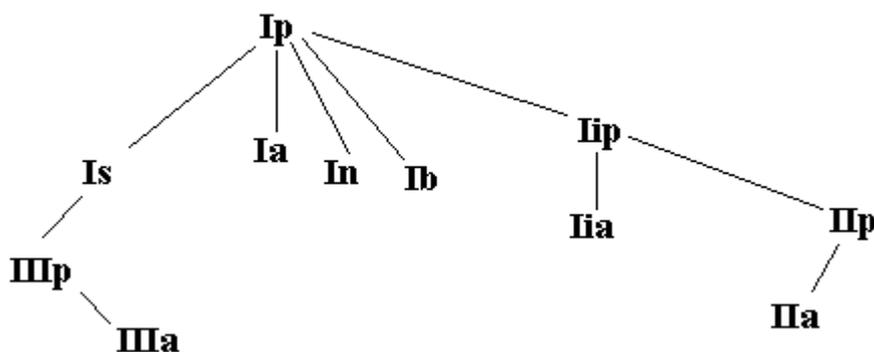


Figura 1: Árvore evolutiva de vários tipos genômicos europeus do SHV-1 baseada em análise de restrição (Christensen et al., 1988).

A estabilidade do genoma do SHV-1 foi testada em onze passagens sucessivas in vivo em suínos, todas analisadas com enzimas de restrição. Apenas na sexta passagem foi possível perceber uma variabilidade nas junções entre U_S e as seqüências repetidas e no término da região U_L (Wathen, 1984). Uma região hipervariável foi identificada à jusante e adjacente à região codificadora da glicoproteína gB, contudo a expressão de gB não foi influenciada seja pelo tamanho ou pela composição da unidade repetida. Regiões do genoma que têm transcrição muito ativa, como os fragmentos de BamHI 4, 7, 9 e 11, são conservadas nas cepas de campo européias (Christensen, 1995).

Nem sempre o genoma inteiro do vírus é necessário para a diferenciação. Pode-se utilizar os produtos amplificados pela reação em cadeia da polimerase (PCR) como alvo dos métodos. Um deles envolveria a PCR e o RFLP, em que os fragmentos seriam submetidos à restrição enzimática. Uma outra técnica trabalha com o seqüenciamento dos amplicons. É mais sensível do que o RFLP, permitindo a comparação de genes ou parte dos mesmos e a construção de árvore

filogenéticas que permitiram agrupar e entender o relacionamento entre as amostras.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAS

As amostras de vírus isolados no Brasil e amostras de referência foram fornecidas pela rede laboratorial do MAPA e pela EMBRAPA Suínos e Aves (Quadro 2). Os vírus foram isolados de suínos e bovinos e replicados em células da linhagem PK 15 (rim de suíno).

A estirpe Shope é uma cepa padrão virulenta. A cepa Bartha é atenuada, sendo deletada para o gene de gE, parte de gI e parte de US_2 , além de carregar mutações em gC (Petrovskis et al., 1986).

Algumas amostras foram consideradas inadequadas para replicação em cultivo celular devido à contaminação ou ao título viral reduzido. Foi necessário o uso de antibióticos e diferentes passagens para uma replicação satisfatória do vírus. Naquelas em que não foi possível, extraiu-se o DNA das ampolas e garrafas de cultivo celular enviados.

Quadro 2: Amostras virais utilizadas no trabalho

Vírus	Espécie	Origem	Característica	Ano de Isolamento
Shope	Bovino	ATCC; Hungria	Cepa de referência	1942*
Bartha	Suíno	EMBRAPA	Atenuada**	
Nova Prata	Bovino	RS	Isolado	1956
031	Suíno	Coronel Vívica - PR	Isolado	1984
673	Suíno	M. Cândido Rondon - PR	Isolado	1984
936	Suíno	Santa Rosa - PR	Isolado	1983
Piau	Suíno	Igarapé - MG	Isolado	1984
F3288	Suíno	Seara - SC	Isolado	2002
F3293	Suíno	Xanxerê - SC	Isolado	1983
F3303	Suíno	Toledo - PR	Isolado	1984
F3308	Suíno	Rio do Sul - SC	Isolado	1989
F3333	Suíno	SC	Isolado	2002
F3338	Suíno	Ipumirim - SC	Isolado	1983
F3380	Suíno	Concórdia - SC	Isolado	1986
F3356	Suíno	Concórdia - SC	Isolado	1988
F3370	Suíno	Concórdia - SC	Isolado	1984
F3319	Suíno	Concórdia - SC	Isolado	1989
PR I	Suíno	Cambará - PR	Isolado	2000
PR II	Suíno	Araucária - PR	Isolado	2000
SC 1955	Suíno	SC	Isolado	2003
SC 992	Suíno	SC	Isolado	1999
EVI-192/03	Suíno	Ponte Preta - RS	Isolado	2003
EVI-193/03	Suíno	Erechim - RS	Isolado	2003
EVI-011/03	Suíno	Pinheirinho do Vale - RS	Isolado	2003
IB341/86	Suíno	Bragança Paulista - SP	Isolado	1986
IB373/90	Suíno	São Paulo - SP	Isolado	1990
IB113/91	Suíno	Floreal - SP	Isolado	1991
IB198/91	Suíno	Paranapanema - sp	Isolado	1991
IB514/92	Suíno	Cerqueira Cezar - SP	Isolado	1992
IB622/92	Suíno	Franca - SP	Isolado	1992

* Bang, 1942. ** deletada para gE, parte de gl e parte de US2, mutações em gC (Petrovskis et al., 1986).

3.2 EXTRAÇÃO DO DNA

Após a replicação dos vírus, a suspensão foi clarificada para retirar os *debris* proveniente das células centrifugando-se a 4.000 g durante 30 minutos. O material foi alicotado em frascos de 1,5 mL e centrifugado novamente a 10.000 g por 1 hora a 4 °C. O sedimento foi ressuscitado com 40 µL de NaOH 50 mM, homogeneizado por 5 minutos em vórtex e incubado por 5 minutos a 95 °C. Em seguida foram adicionados 10 µL de solução Tris-HCL 0,5 M (pH 8,0) e feita a homogeneização em vórtex por 5 minutos e o material foi armazenado a – 20 °C.

3.3 PCR

Foram padronizadas duas PCRs para amplificação das seqüências a serem utilizadas na epidemiologia molecular do SHV-1. A reação para gE (cujo alvo é a porção média da glicoproteína) foi baseada em Huang et al. (2004) adaptada segundo as seguintes condições:

Iniciadores: gE-nF
CCGCGGGCCGTGTTCTTTGT; gE-nR
CGTGGCCGTTGTGGGTCAT

Produto: 500 pares de base.

Reagentes (para reação de 20 µL): 5 pmol de cada iniciador, 0,5 U de Taq polimerase, 10% de tampão Tris-HCL, 1,5 mM de MgCl₂, 5 % de DMSO, 200 µM da mistura de DNTP.

Ciclos de Amplificação: 94 °C por 4 min, 35 ciclos a 94 °C por 1 minuto, 60 °C por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto, seguido de um ciclo de extensão a 72 °C por 5 minutos.

A reação para gC foi adaptada dos protocolos citados em Goldberg et al. (2001) e Goldberg (2003) e teve como alvo a parte codificante região N-

terminal da proteína. As seguintes condições foram utilizadas para amplificação das amostras:

Iniciadores: gC-2U ; gC-1L

Produto: 790 pares de base.

Reagentes (para reação de 20 µL): 5 pmol de cada iniciador, 1,0 U de Taq polimerase, 10% de tampão Tris-HCL, 1,5 mM de MgCl₂, 5 % de DMSO, 200 µM da mistura de DNTP.

Ciclos de Amplificação: 94 °C por 5 min, oito ciclos a 94 °C por 1 minuto, 67 °C por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto, 28 ciclos a 94 °C por 1 minuto, 64 °C por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto, seguido de um ciclo de extensão a 72 °C por 7 minutos.

3.4 PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR

Realizou-se um total de quatro a seis reações por amostra. As variações se devem às diferentes quantidades de DNA encontradas e à quantidade de amplicon necessária para o seqüenciamento. Os produtos das PCRs foram inoculados em um gel de agarose 1,5%. Realizou-se a eletroforese a 110 v por 35 minutos. As bandas foram cortadas com o auxílio de um bisturi e purificadas segundo o protocolo definido pelo kit Wizard® DNA Purification System (Promega, Estados Unidos). Após a purificação, a concentração de DNA das soluções foi calculada através da inoculação de 2 µL de cada amostra em gel de agarose 1,5 % juntamente com um padrão de massa.

3.5 SEQÜENCIAMENTO

As amostras purificadas foram submetidas a seqüenciamento no LANAGRO/MG no seqüenciador ABI 3130 utilizando Big Dye versão 3. O protocolo para seqüenciamento de gE

foi o seguinte: 10% de Big Dye, 10% de Saving Buffer, 5 pmol de iniciador, 20 a 30 ng de DNA, água destilada e deionizada q.s.p 10 µL. O protocolo para seqüenciamento de gE foi o seguinte: 25% de Big Dye, 10% de Saving Buffer, 5 pmol de iniciador, 70 a 90 ng de DNA, água destilada e deionizada q.s.p 10µL. Os eletroferogramas foram analisados no programa Sequencing Analysis 5.2 para verificação da qualidade do seqüenciamento.

Cada amostra foi seqüenciada de três a quatro vezes utilizando os iniciadores senso e anti-senso. A edição foi realizada no programa Bioedit versão 7.0.5.3 (Hall, 2007) utilizando-se como padrão as seqüências NIA-3 (número de acesso no GenBank: D49437) para gC

e amostra Becker (número de acesso no GenBank: AY368490) para gE.

3.6 ANÁLISE MOLECULAR

As seqüências foram alinhadas no programa MEGA versão 4.0 (Tamura et al., 2007) (utilizando-se os valores padrão para alinhamento. As árvores foram construídas no mesmo programa através do método *Neighbor-Joinning* com 1000 réplicas de bootstrap, modelo *Maximum Composite Likelihood*. Além das duas árvores com as amostras brasileiras para gE e gC, foram feitas outras duas com a soma de seqüências de amostras internacionais disponíveis no GenBank (Quadros 3 e 4).

Quadro 3: Amostras do GenBank selecionadas para construção da árvore filogenética para gE

Amostra	Origem	Número de Acesso
Becker	Estados Unidos	AY368490
Fa	China	AF403049
Min-A China	China	AY170318
La	China	AY173125S2
PRV-SH	China	AF207700
Rice	Estados Unidos	M14336
Yangsan	Coréia	AY249861

Quadro 4: Amostras do GenBank selecionadas para construção da árvore filogenética para gC

Amostra	Origem	Espécie	Número de Acesso
NIA-3	Irlanda do Norte	Suíno	D49437
Indiana S	Estados Unidos	Não informado	D49436
Yamagata S-81	Japão	Suíno	D49435
Ea	China	Suíno	AF158090
Fa	China	Suíno	AF403051
PRV43	Estados Unidos	Ovino	AF176479
PRV4411	Estados Unidos	Ovino	AF176481
PRV4520	Estados Unidos	Caprino	AF176482
PRV7438	Estados Unidos	Suíno	AF176483
PRV7652	Estados Unidos	Caprino	AF176484
PRV7739	Estados Unidos	Caprino	AF176485
PRV8033	Estados Unidos	Guaxinim	AF176486
PRV8044	Estados Unidos	Bovino	AF176487
PRV8095	Estados Unidos	Suíno	AF176488
PRV9164	Estados Unidos	Suíno	AF176489
PRV10501	Estados Unidos	Suíno	AF176490
PRV10649	Estados Unidos	Ovino	AF176491
PRV11243	Estados Unidos	Suíno	AF176492
PRV12271	Estados Unidos	Suíno	AF176493
PRV12481	Estados Unidos	Suíno	AF176494
PRV12486	Estados Unidos	Suíno	AF176495

3.7 ANÁLISE PREDITIVA DA RESTRIÇÃO ENZIMÁTICA

As seqüências foram submetidas à análise de bioinformática para a predição de pontos de cortes de enzimas que pudessem diferenciar os grupos definidos pela análise filogenética. Foi utilizado o programa pDraw32 versão 1.0 (disponível em: www.acaclone.com).

3.8 ANÁLISE DE RECOMBINAÇÃO

As seqüências foram submetidas à busca por sítios de recombinação utilizando o programa SimPlot 3.5.1 (Lole et al., 1999) e confirmadas no programa START2 (Jolley et al., 2001). Seqüências de gC foram os alvos para a análise, tendo sido escolhida como amostra questão IB341/86. As amostras de referência selecionadas foram IB373/90, IB113/90, Bartha, Shope e Indiana S. Os seguintes parâmetros foram selecionados: *Maximum Likelihood* como modelo de distância, razão de transição/transversão 2,0, *Neighbor-Joining* para construção das árvores (com valor de 1000 Bootstraps).

3.9 ANÁLISE PREDITIVA DAS SEQÜÊNCIAS TRADUZIDAS

3.9.1 ANÁLISE DA ESTRUTURA SECUNDÁRIA E HOMOLOGIA

As seqüências de nucleotídeos foram traduzidas utilizando-se o programa Bioedit e, em seguida, submetidas ao EML – Functional Sites in Proteins (disponível em <http://elm.eu.org/>) para análise e confirmação dos domínios de glicosilação. A análise dos graus de hidrofobia e hidrofília foi realizada através do método da Média de Hidrofobia de Kyte & Doolittle (janela de scan de sete resíduos, sem *gaps*) e

método da Média de Hidrofília de Hoops & Wood (janela de scan de seis resíduos, sem *gaps*). Os alvos das análises foram o peptídeo sinal formado pelos 22 primeiros aminoácidos, os seis sítios de glicosilação e três domínios de ligação à heparina. O programa SIFT (disponível em: <http://blocks.fhcrc.org/sift/SIFT.html>) (Ng et al., 2003) foi utilizado para prever o grau de tolerância nas mutações. A análise para verificação da influência das mutações na estrutura secundária foi realizada no programa nnPredict (disponível em <http://alexander.compbio.ucsf.edu/~nomi/nnpredict.html>) e Scratch (disponível em <http://www.ics.uci.edu/~baldig/scratch/index.html>). A procura por domínios foi realizada no programa ProDom (disponível em <http://prodom.prabi.fr/prodom/current/html/home.php>).

3.9.2 IDENTIFICAÇÃO DE SÍTIOS ESPECÍFICOS DE SELEÇÃO POSITIVA E SELEÇÃO NEGATIVA

As seqüências de gE e gC foram submetidas à busca por sítios específicos de seleção positiva e seleção negativa no programa Selecton (Stern et al., 2007; disponível em <http://selecton.bioinfo.tau.ac.il/>). O tamanho das seqüências foi considerado adequado para a análise e a presença de sítios quentes em gC evidencia a possibilidade de pressão seletiva (Nekrutenko et al., 2002). As seqüências de gE foram submetidas ao teste para se verificar a ausência e os níveis de pressão purificadora.

Utilizou-se como parâmetros seqüências previamente alinhadas no Bioedit com cortes para um número de nucleotídeos divisível por três (incluindo *gaps* em grupos de três), árvore

previamente construída adaptada para o formato de Newick, modelo M8 com pressão seletiva admitida. A amostra escolhida foi 3256, por fazer parte do maior agrupamento (B1). Os resultados foram verificados estatisticamente utilizando-se o modelo nulo M8a.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 AMPLIFICAÇÃO, PURIFICAÇÃO E SEQÜENCIAMENTO

As PCRs demonstraram diferentes eficiências na amplificação do DNA extraído. A reação para gE revelou-se mais produtiva, gerando maior quantidade de DNA. A amplificação dos produtos de gC revelou-se mais trabalhosa e com um maior custo devido à menor quantidade de amplicons gerada.

As diferentes concentrações obtidas durante a purificação das amostras se deve justamente às diferenças na quantidade de DNA viral extraído dos cultivos celulares e das ampolas dos vírus que não apresentaram multiplicação ao serem inoculados. Duas amostras, IB514/92 e PR I, não obtiveram um resultado de seqüenciamento aproveitável para gC.

4.2 ANÁLISE MOLECULAR

Foi reconstruída uma árvore filogenética para se entender o padrão de distribuição das amostras de SHV-1 no Brasil, permitindo também uma comparação com os isolados internacionais. As árvores reconstruídas revelaram padrões semelhantes que corroboraram uma a outra (Fig. 2, 3, 4 e 5).

As seqüências de gE revelaram-se mais conservadas, inculindo valores menores

de bootstrap por possuírem um menor número de sítios informativos. As amostras se dividiram em dois grandes grupos denominados A e B, sendo B subdividido em B1 e B2. As amostras do grupo A estão correlacionadas com focos ocorridos entre 1983 e 1984 no Paraná e em Minas Gerais. Associam-se às mesmas duas amostras paulistas (IB373/90 e IB341/86). IB341/86 apresentou maior distância dentro do grupo A.

As amostras do grupo B1 foram formadas por isolados provenientes de São Paulo, Santa Catarina, Paraná e Rio Grande do Sul. B2 foi formado por três amostras, uma de cada estado da região Sul (Fig. 2).

As medidas de distância foram calculadas utilizando-se como modelo evolutivo Kimura 2 Parâmetros. A distância média global foi de 0,481%, demonstrando o alto grau de similaridade entre as seqüências. As distâncias dentro dos grupos foram de 0,07% no grupo A e 0% nos grupos B1 e B2. A diferença entre as seqüências do grupo A se deve principalmente à presença de IB341/86. Na ausência da mesma, nota-se que não existe diferença entre as seqüências, com um resultado de 0%. A distância entre o grupo A e B1 foi de 0,96%, entre A e B2 de 1,2% e entre B1 e B2 de 0,25%. A média global de diferença entre as amostras cai para 0,45%.

A amostra Shope apresentou uma mutação ausente em todas as outras amostras, nacionais ou internacionais. A troca de uma guanina por uma adenina deve ter ocorrido devido a mutações após sucessivas passagens celulares implicando em uma exceção e não em uma regra, apesar de essa amostra ser considerada padrão.

A árvore filogenética construída com a inclusão das seqüências internacionais demonstrou a divergência dos SHV-1 brasileiros em relação aos isolados do restante do mundo (Fig. 3). A amostra que mais se assemelha às estrangeiras é a IB341/86, que já demonstrara um certo grau de divergência. Os grupos B1 e B2, ao contrário do grupo A, divergiram ainda mais das amostras internacionais, o que demonstra uma diferenciação maior dos isolados mais recentes. A posição dos grupos na

árvore é suportada por um alto valor de Bootstrap (96%).

A medida da distância entre as amostras foi realizada dividindo-se as amostras em grupos como EUA, Asiático e a amostra Shope. Observa-se a divergência relativamente maior entre os grupos brasileiros. O grupo A se diferencia mais das amostras de B1 e B2 do que dos isolados internacionais (Tab. 1).

Tabela 1: Estimativa da Divergência Evolutiva entre os grupos exposta em porcentagem

Grupos	A	B1	B2	Asiático	EUA	Shope
A	--					
B1	0,961	--				
B2	1,212	0,248	--			
Asiático	0,849	1,351	1,606	--		
EUA	0,462	0,997	1,249	0,999	--	
Shope	0,461	1,248	0,997	0,847	0,497	--

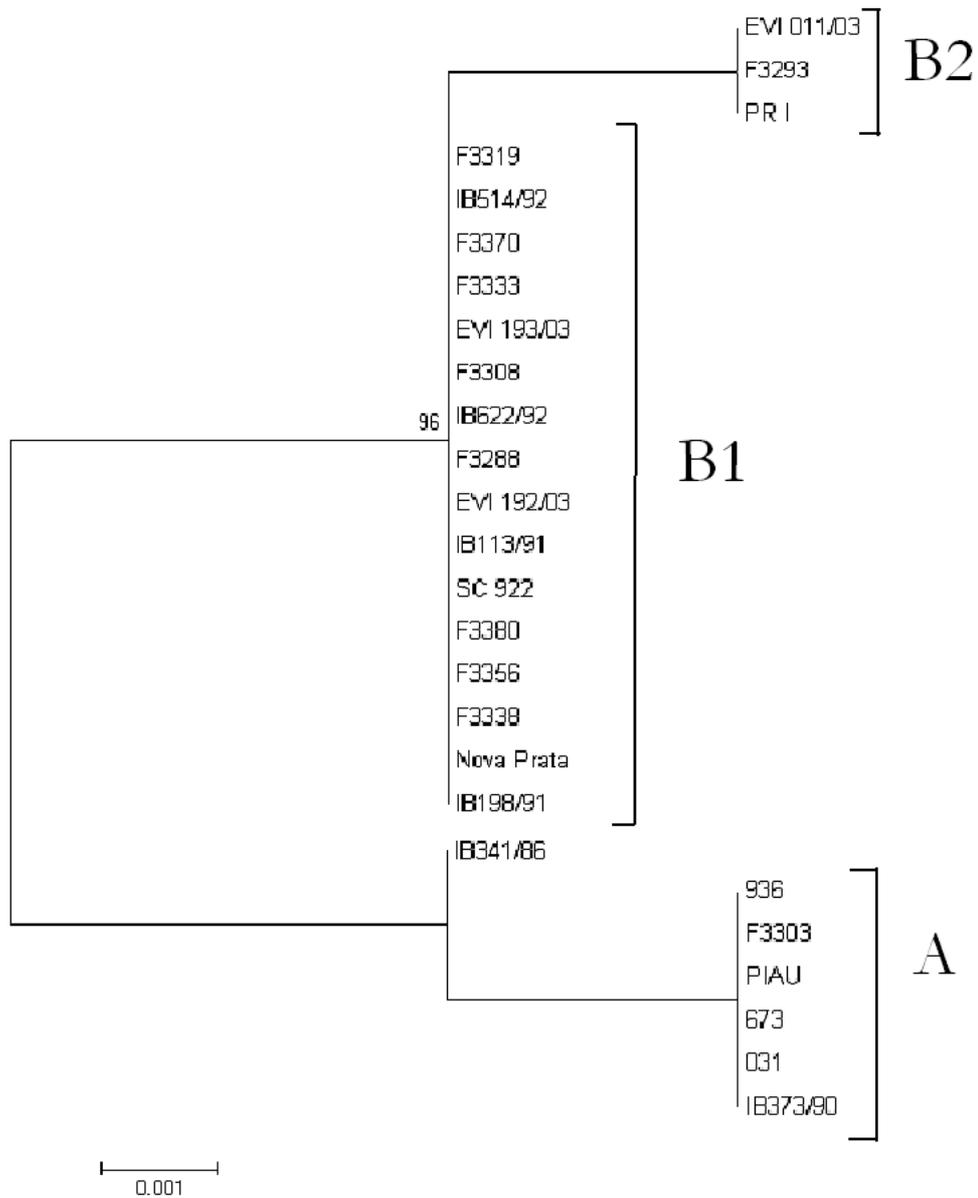


Figura 2: Filograma da relação genealógica entre amostras brasileiras. Árvore reconstruída utilizando-se o gene de gE como alvo e o modelo de Neighbor-Joining com 1.000 réplicas de Bootstrap.

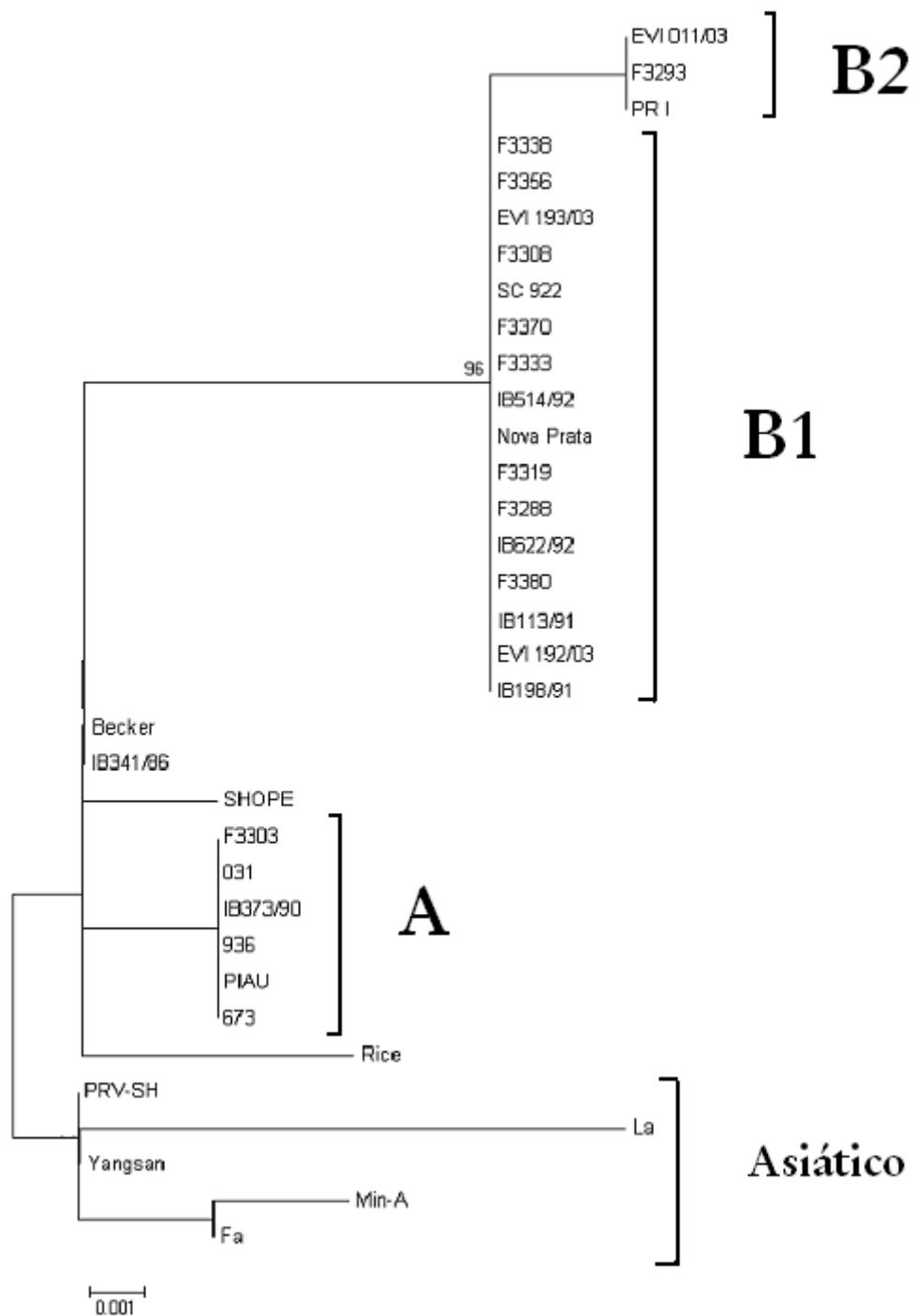


Figura 3: Filograma da relação genealógica entre amostras brasileiras e internacionais. Árvore reconstruída utilizando-se o gene de gE como alvo e o modelo de Neighbor-Joining com 1.000 réplicas de Bootstrap.

A árvore reconstruída com base nas seqüências de gC apresentou perfil bastante semelhante à árvore de gE (Fig. 4). As principais diferenças são os valores de *bootstrap* maiores, a troca de posição de algumas amostras que formavam o grupo B2, constituído agora por EVI 011/03 e Nova Prata, e o posicionamento de IB341/86 e Shope em outro grupamento, localizando-se junto a Bartha no denominado grupo C. Esse foi assim chamado pela presença do isolado brasileiro que se mostrou nitidamente diferente das outras amostras nacionais.

O cálculo das distâncias entre os grupos foi feito sem a presença de Bartha e Shope, admitindo o grupo C como constituído somente por IB341/86. A distância média global é de 0,779%. A divergência dentro dos grupos A, B1 e B2 é de 0,047%, 0,019% e 0%. O resultado do cálculo das distâncias entre os grupos, relacionado-se A com B1, B2 e C, foi de 1,452% e 1,732% e 2,744%, respectivamente. A divergência entre B1 em relação a B2 e C é de 0,291% e 2,150%. O resultado do cálculo para B2 e C é 1,849%.

A existência de um maior número de seqüências internacionais depositadas nos bancos de dados permitiu a construção de uma árvore maior e mais definida, na qual se percebeu nitidamente o afastamento das amostras nacionais (Fig. 5). Mesmo com a aproximação de uma amostra

japonesa e uma norte-americana, ainda verifica-se que os grupos B1 e B2 mantêm-se em clados diferentes. IB341/86 relaciona-se com uma amostra norte-americana, Shope e Bartha, formando ainda um grupo separado. Alguns exemplares norte-americanos foram agrupados em A. Para se determinar as mudanças nos resultados dos cálculos das distâncias evolutivas, criou-se outros três grupos, denominados D, E e China. D englobou o isolado japonês Yamagata S81 e o isolado norte americano de bovino PRV8044, E foi constituído por NIA-3 e diversas amostras norte-americanas e China por duas seqüências chinesas.

A posição de Yamagata S 81 pode ser questionada se for fruto de uma recombinação como proposto por Christensen (1995). É bastante provável que seja mais uma evidência de que as amostras do grupo B são derivadas de tipos genômicos da Europa Central de focos ocorridos na Holanda, Dinamarca e Bélgica (Todd et al., 1985), enquanto o grupo A seria derivado dos EUA ou de amostras inglesas e húngaras.

A divergência entre as amostras do grupo A teve um aumento mínimo depois da adição das amostras norte-americanas subindo para 0,058%. O grupos C, D, E e China apresentaram distâncias de 0,880%, 0,437%, 0,298% e 1,468%. As distâncias evolutivas entre os grupos são mostradas na Tabela 2.

Tabela 2. Estimativa da Divergência Evolutiva entre os grupos

	A	B1	B2	C	D	E	China
A	--						
B1	1,517	--					
B2	1,810	0,311	--				
C	2,102	2,014	1,696	--			
D	2,480	1,117	0,802	1,178	--		
E	1,199	2,386	2,478	1,578	1,817	--	
China	5,853	6,180	6,499	5,453	5,945	5,527	--

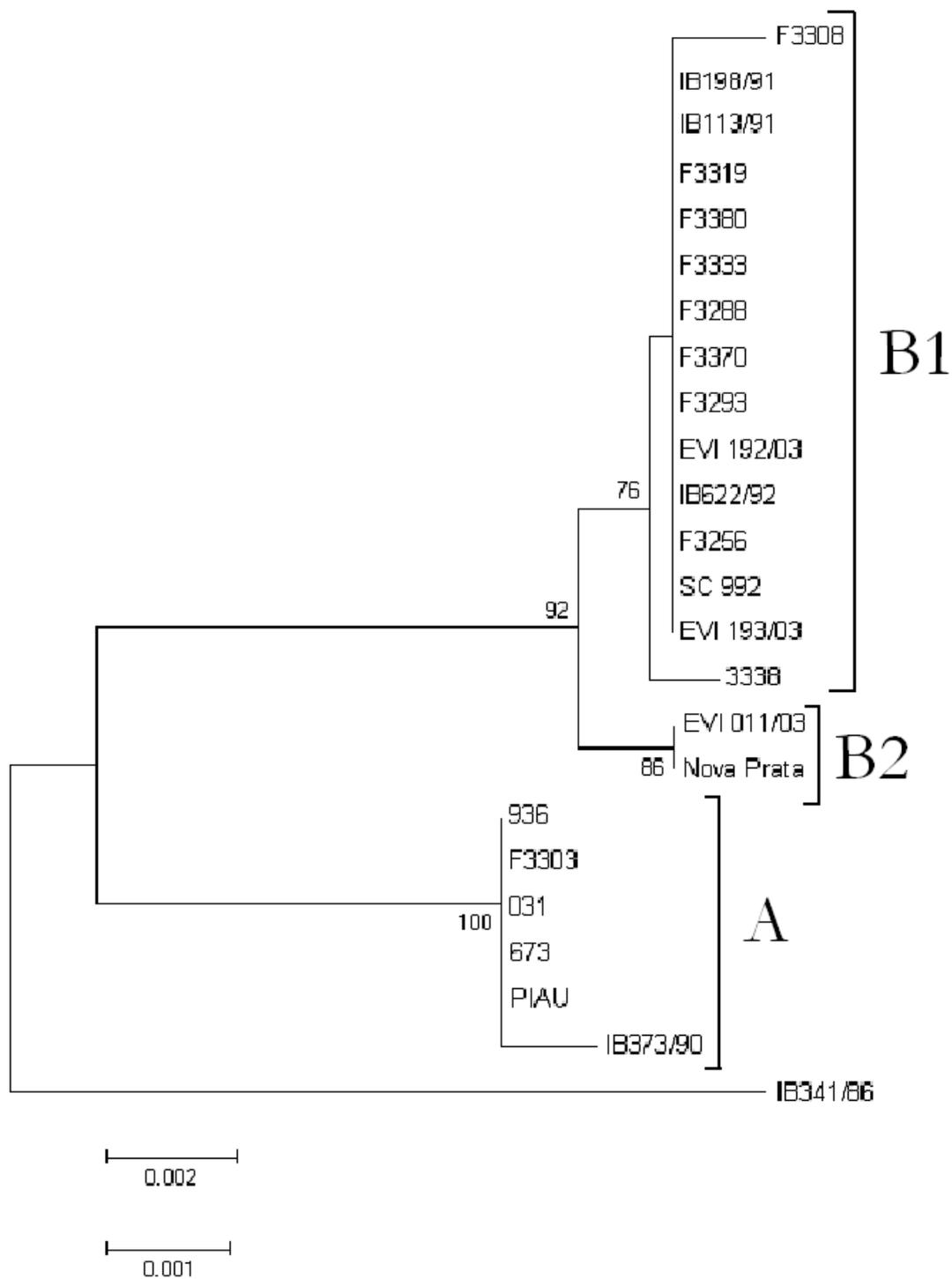


Figura 4: Filograma da relação genealógica entre amostras brasileiras. Árvore reconstruída utilizando-se o gene de gC como alvo e o modelo de Neighbor-Joining com 1.000 réplicas de Bootstrap.

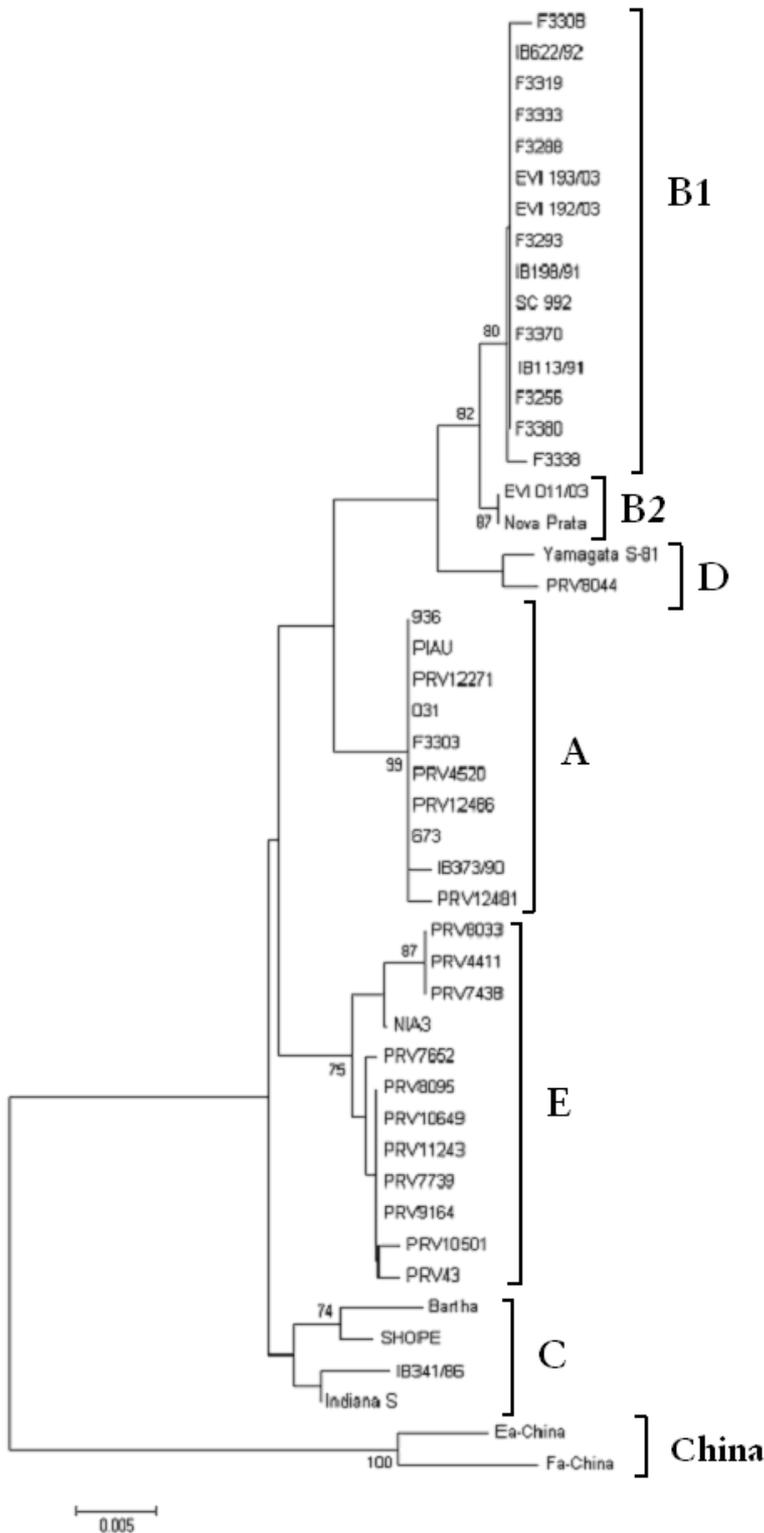


Figura 5: Filograma da relação genealógica entre amostras brasileiras e internacionais. Árvore reconstruída utilizando-se o gene de gC como alvo e o modelo de Neighbor-Joining com 1.000 réplicas de Bootstrap..

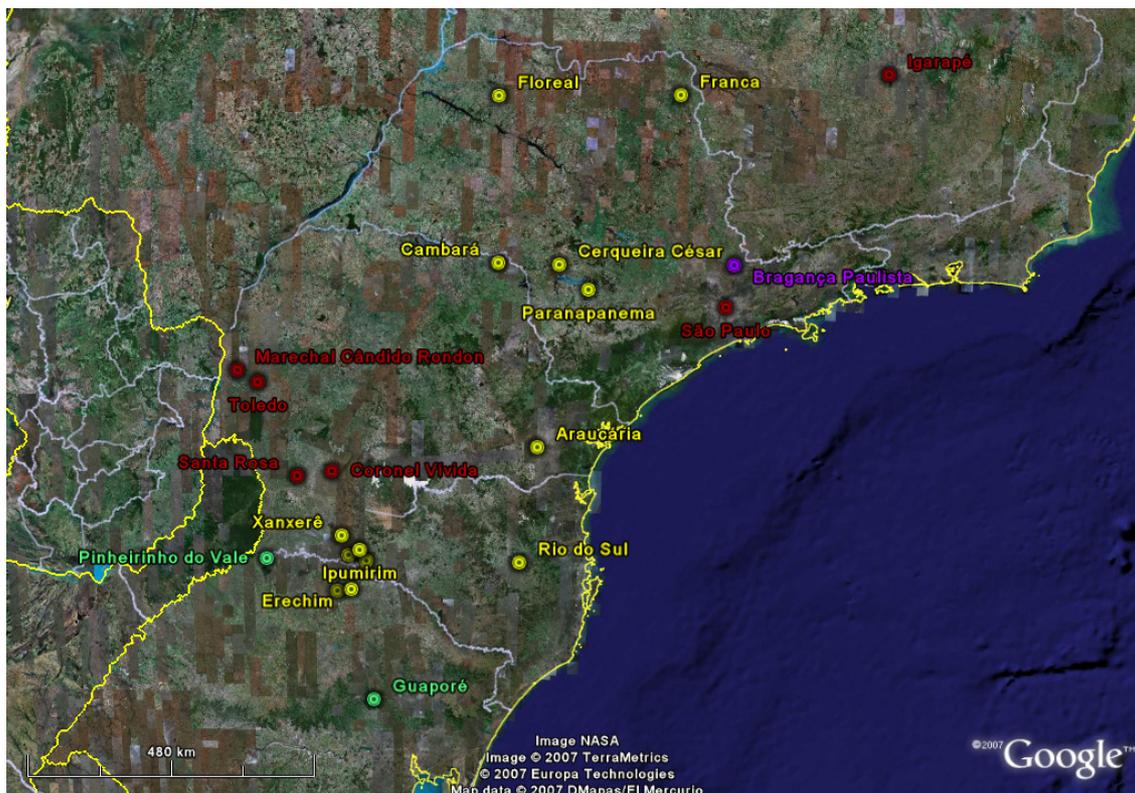


Figura 6: Mapa com distribuição das amostras feito a partir do programa Google Earth (disponível em www.earth.google.com). As amostras do grupo A são representadas em vermelho, grupo B1 em amarelo e grupo B2 em verde. A amostra IB314/86, por sua posição diferenciada na árvore filogenética, foi representada em roxo.

A reconstrução das árvores filogenéticas das amostras brasileiras do SHV-1 colaborou para melhor entendimento dos padrões de distribuição do vírus e sua evolução dentro do território brasileiro. A resolução dos cladogramas não se demonstrou alta devido ao baixo número de sítios informativos em ambas as seqüências. Apesar do sítio quente em gC, ainda houve pouca variação entre as amostras.

Observou-se uma divergência mais relativa ao tempo do que ao espaço. A distribuição geográfica pode ser percebida, mas foi pouco definida, justamente como já fora descrito em um trabalho anterior (Goldberg et al., 2001). As amostras se agruparam de acordo

com as áreas, porém essas mesmas não se mostraram suficientemente definidas para serem distinguidas em um padrão. A percepção mais clara é a de que existe um grupo restrito de amostras no Brasil com uma certa tendência a se diferenciar, como se percebe pela divisão do grupo B em 1 e 2 (Fig. 6).

O agrupamento das amostras do grupo A no PR se deve principalmente à proximidade dos focos em uma extensa área de criação de suínos ocorridos em um intervalo curto (2 anos) e não há uma propensão de localização geográfica. Salienta-se que esses, no entanto, não estão relacionados com os focos de SC ocorridos na mesma época, mas que podem ser fruto de

contato de amostras internacionais vindas da Argentina, onde se encontra o mesmo tipo genômico (Echeverria et al., 1994).

A diferença entre B1 e B2 se deve principalmente a duas mutações não sinônimas, tanto em gE quanto gC. A princípio, pode parecer apenas uma mudança pouco significativa, porém deve-se salientar o fato de serem duas mutações não sinônimas em um vírus de baixo índice de erros de replicação, já relatado como 10^{-8} por sítio por ano no caso de nucleotídeos (Sakaoka et al., 1994) e 10^{-9} por aminoácido por ano (McGeoch et al., 2000). Uma delas altera levemente a hidrofília em um ponto de gE e a segunda situa-se em um sítio sob pressão seletiva positiva.

É curiosa a ausência de amostras do grupo A em anos posteriores a 1990. Mesmo IB373/90 em São Paulo já demonstra alguma mutação e diferenciação desse grupo, o que abre a possibilidade que as amostras de A já estejam extintas no Brasil. Amostras relativas a esse clado são inexistentes em anos posteriores mesmo em outros pontos do Paraná. Os municípios de Araucária e Cambará podem estar geograficamente distantes daqueles relativos aos focos gerados pelas amostras do grupo A, mas demonstra-se que tais cepas foram provavelmente eliminadas, talvez pela contenção dos focos, hipótese mais provável, ou pela própria seleção de cepas mais aptas, o que implicaria na presença de vírus descendentes de focos de Santa Catarina hoje colonizando tanto o Rio Grande do Sul, quanto Paraná e São Paulo. Esses resultados corroboram as afirmações de Groff et al. (2005) de que os focos de 2003 no estado do RS seriam derivados de SC.

A hipótese da extinção de A poderia ser corroborada com o seqüenciamento de outras amostras do estado de Minas Gerais para se verificar se o grupo A se manteve no estado ou, ainda, se focos mais recentes ocorreram devido a entrada de amostras de B. A permanência de A poderia ocorrer com mutações como as verificadas em IB373/90, o que marca a contínua diferenciação das amostras brasileiras das internacionais.

A prevalência das amostras do grupo B não demonstra, no entanto, perda da diversidade genética. É bastante possível que a presença da seleção positiva em pontos do genoma como os definidos em gC impliquem na diferenciação e formação de outros clados, ainda que esses sejam claramente derivados de B e exibam pouca diferença como ocorre entre B1 e B2. É natural que a perda da diversidade biológica do vírus, notada pela possível extinção de A, venha a ser recuperada em decorrência da adaptação às variações ambientais (Randman, 1999).

Trabalhos de epidemiologia molecular anteriores já haviam sido feitos utilizando RFLP como método (Piatti et al., 2001; Silva et al., 2005). A árvore filogenética construída nesse trabalho confirma os resultados anteriores. As amostras 3303 e IB373/90 demonstraram pertencer ao genótipo Ii e as posteriores já são descritas como tipo II. Os resultados da restrição enzimática apresentam-se, portanto, bastante similares aos do seqüenciamento. Os cladogramas tanto de gE quanto gC apresentam inclusive semelhança à árvore evolutiva proposta por Christensen (1995). O autor apresenta o tipo genômico II do SHV-1 como descendente direto de Ii. Não pretende-se, no entanto, postular aqui

que o grupo B seria uma evolução direta de A, já que se percebe claramente a presença de exemplares de B antes de 1984. Salienta-se sim, a substituição do tipo I pelo II.

Piatti et al. (2001) ainda descrevem uma amostra de 1988 de RS que pertenceria ao grupo genômico I. Groff et al. (2005) salientara a ausência de evidências sorológicas para a presença do SHV-1 e que a OIE declarara o estado provisoriamente livre da enfermidade até 1996. Os focos que surgiram posteriormente foram causados por amostras do tipo II e que se encaixaram nos grupos B1 e B2. O mesmo autor afirma que entre 1996 e 2003 já havia circulação viral na região que daria origem aos focos do início do século XXI. Provavelmente essas amostras já pertenciam ao grupo B ou tipo genômico II. Se havia vírus circulante do grupo genômico I anteriormente, esse deve ter sido substituído pelo tipo II, tendo em vista a tendência para a fixação desse último.

As diferenças entre o RFLP e o seqüenciamento poderão ser sentidas a um prazo mais longo. A árvore filogenética poderá mostrar outras diferenciações menores dentro das amostras, permitindo uma melhor definição das mutações. A diferenciação por RFLP dependeria de criação ou perda sítios restritivos e não permite perceber o diferente posicionamento de grupos como B2 ou, ainda, demonstrar o quanto as amostras brasileiras diferem das internacionais mesmo em seqüências altamente conservadas e sujeitas à pressão purificadora como acontece em gE.

A relação com os exemplares de SHV-1 internacionais revelam a clara divergência das amostras brasileiras, principalmente às do grupo B, em que

as mudanças foram não apenas de mutações sinônimas ou não-sinônimas, mas de um ponto importante da cadeia de aminoácidos onde pode haver um epítopo em uma das glicoproteínas mais antigênicas do vírus.

Essa distinção só não foi encontrada com a amostra IB341/86. A seqüência de gE mostrou-se idêntica a da amostra norte-americana Becker e a seqüência de gC demonstrou um alto grau de semelhança com Indiana S, do mesmo país. O comércio de suínos com a Europa é proibido pelo MAPA, mas com os Estados Unidos é permitido e ainda ocorre, o que poderia indicar que esse foco específico poderia ter ocorrido devido a disseminação por um animal importado. Outra possibilidade seria a recombinação de IB341/86 tendo como amostra parental algum vírus similar a IB373/90, a qual será discutida no tópico relativo à recombinação.

Os resultados da filogenia levam a acreditar que a DA foi introduzida no Brasil a partir da Europa Central. Novas cepas surgiram na década de oitenta provavelmente devido a introdução de agentes vindos dos Estados Unidos, como no caso de IB341/86. Amostras como F3303, 673 e 936 teriam outra origem. Ambas apresentam o mesmo tipo genômico I que amostras argentinas (Echeverria et al., 1994), o que, aliado à proximidade com da fronteira, pode implicar uma origem a partir dali.

4.3 ANÁLISE DE RECOMBINAÇÃO

A probabilidade de recombinação entre as seqüências foi relatada entre IB373/90 e as amostras internacionais que se agruparam com IB341/86 na árvore filogenética. O valor estimado do χ^2 foi de 1,7 e 1,0 para a recombinação da mesma com Bartha e Shope,

respectivamente, tomando-se como amostra derivada IB341/86, considerados, portanto, abaixo do suficiente para se afirmar a recombinação. Não se encontrou resultado relevante quanto à amostra Indiana S ou IB113/91. Os resultados foram confirmados no START2. Esse segundo programa demonstrou, no entanto um resultado conflitante, colocando Indiana S e IB373/90 e IB113/91 e IB373/90 como passíveis de recombinação. No teste sem inserção de uma amostra derivada, apresentou-se um χ^2 de 26,4841e um P de 0,079 (Tab. 3).

Não se pode afirmar pelos resultados que realmente houve a recombinação entre essas amostras, mas estimar-se que a divergência de IB341/86 deve-se a esse fator, o que explicaria sua tendência em divergir de todas as amostras brasileiras em ambas as árvores. Os resultados diferentes nos programas já eram esperados. Segundo Posada (2002), os atuais métodos de detecção de recombinação não devem ser utilizados separada ou unicamente, mais em conjunto, podendo fornecer resultados diferentes e sendo os resultados falso-negativos mais freqüentes e problemáticos do que os falsos positivos.

O posicionamento distinto de IB341/86 levou a duas hipóteses, a primeira, citada no tópico anterior, leva em consideração que o isolado teria origem internacional e a segunda seria a possibilidade de recombinação entre IB373/90 e uma amostra estrangeira. Um pensamento parcimonioso leva logicamente a imaginar que o foco teria sido gerado pela importação de animais

contaminados, porém Christensen (1995) afirmou que gC foi um dos pontos de recombinação do SHV-1. Thiry et al. (2005) descreveram que devido às baixas taxas de substituição de nucleotídeos nos herpesvírus, a recombinação se torna a principal força evolutiva para aumentar a probabilidade de uma mutação não-sinônima rara se disseminar e se tornar fixa na espécie. Dadas as informações, cogitou-se o fato de que IB341/86 fosse o produto de recombinação com algum vírus, talvez uma amostra vacinal.

Os resultados revelaram a possibilidade de que o isolado paulista realmente fosse derivado da recombinação com alguma amostra internacional, tendo sido testadas as amostras Shope, Bartha e Indiana S, todas agrupadas com IB341/86. Todos os resultados demonstraram a probabilidade de recombinação, apesar de apresentarem pontos diferentes. A possibilidade mais clara seria a da recombinação entre uma amostra do grupo A e do grupo B, ambas existentes em SP. Não descarta-se, porém, a evidência de uma das amostras parentais ser uma internacional. Se esta for a vacina, já se atesta um alerta de Christensen (1995) sobre a possibilidade de recombinação entre a vacina viva e uma amostra selvagem. Maes et al. (1997) afirmaram, no entanto, que a recombinação depende de altas concentrações de ambas as amostras no mesmo sítio anatômico. É, de certo, mais provável que o foco de 1986 em SP seja proveniente de infecção por uma amostra internacional, porém os testes para recombinação foram válidos para se testar os métodos preditivos para o SHV-1.

Tabela 3: Resultado da Análise de Recombinação no programa START2

Amostras	χ^2	P	Possível recombinação
IB373/90 + Bartha	3,9583	0,105	a partir do nucleotídeo 177
IB373/90 + Shope	5,5525	0,055	a partir do nucleotídeo 207
IB373/90 + Indiana S	5,7287	0,028	a partir do nucleotídeo 538
IB373/90 + IB113/90	7,4413	0,004	a partir do nucleotídeo 558

4.4 ANÁLISE PREDITIVA DA RESTRIÇÃO ENZIMÁTICA

A análise das amostras brasileiras não revelou um perfil de restrição que pudesse gerar uma diferenciação em mais de dois grupos. As mutações que influenciaram a disposição na árvore não incorreram na geração de sítios de restrição específicos. O máximo que se pôde diferenciar foram dois grupos, A e B, tanto para gC quanto para gE. A opção de indicar gE para a utilização de restrição se deve à melhor amplificação gerada pela PCR, podendo se aliar a capacidade de diagnóstico da reação à diferenciação enzimática. A enzima BtgI foi escolhida por gerar um perfil mais simples que corta o grupo A em três fragmentos (corte nas posições 167 e 387) e o grupo B em dois (corte na posição 387).

As seqüências de gC, mesmo não possuindo mutações para diferenciar os grupos, podem ser utilizadas para se diferenciar amostras vacinais utilizando-se a enzima BsiEI. Bartha apresenta uma mutação que acrescenta um sítio de restrição ao amplicon. Enquanto os isolados brasileiros apresentam dois fragmentos após digestão enzimática (corte na posição 563), a amostra vacinal demonstra três fragmentos no gel (cortes nas posições 466 e 569).

Outras opções de corte para gC foram apresentadas, mas nenhuma com resolução satisfatória. Em média, havia uma diferença de 3 a 6 nucleotídeos entre os fragmentos, o que levou ao descarte dessas opções.

A utilização de um PCR-RFLP para diferenciação do SHV-1 é mais barata do que o seqüenciamento, apesar da menor resolução e da impossibilidade de se criar uma árvore filogenética. A utilização das enzimas de restrição confinaria a análise apenas aos pontos mutantes que diferenciam os grupos. Outras mutações, inclusive no ponto quente, não seriam detectáveis.

O PCR-RFLP seria uma alternativa mais barata e mais rápida do que a restrição típica feita por BamHI, por não necessitar de métodos trabalhosos como a purificação dos vírus por ultracentrifugação e longos tempos de eletroforese. Devido ao baixo índice de mutações do SHV-1 é pouco provável que os pontos escolhidos sejam modificados, o que garantiria certa robustez à técnica. Obviamente, uma análise experimental ainda deve ser feita, visto que nesse trabalho foram realizados apenas experimentos preditivos com relação à restrição. O seqüenciamento completo de gC poderia fornecer outros pontos a serem abordados no RFLP.

4.5 ANÁLISE PREDITIVA DAS SEQÜÊNCIAS TRADUZIDAS

4.5.1 ANÁLISE DAS ESTRUTURAS SECUNDÁRIAS E HOMOLOGIA

As seqüências protéicas de gE não apresentaram diferenças estruturais, exceto por verificar-se que todas as mutações geraram substituições na cadeia de aminoácidos (nenhuma delas intolerante segundo SIFT). A análise no

EML confirmou os sítios de glicosilação, porém apresentou um dado a mais. As amostras do grupo B2 apresentaram uma extensão na região de desordem. Tais pontos podem abrigar segmentos funcionalmente importantes da proteína, carecem de uma estrutura secundária e apresentam um alto grau de flexibilidade na cadeia polipeptídica (Linding et al., 2003). Todas as amostras apresentaram um perfil de hidrofilia semelhante, exceto pelas do grupo B2, em que houve uma leve diminuição do mesmo devido à mutação no resíduo 40 (arginina para serina) (Fig. 7).

A mutação no resíduo 32 (V para L nas amostras do grupo B) ocorreu em um ponto de baixa acessibilidade a solvente em uma fita beta pregueada (Fig. 8). Aminoácidos ali localizados não tendem a ser polimórficos e suas mudanças tendem a ser deletérias (Bustamante et al., 2000). Já a mutação única de Shope levou à troca de códon no aminoácido

83 (alanina para treonina) e ocorreu em um ponto exposto da glicoproteína, sendo uma região predisposta a mutações, apesar de as mesmas não serem necessariamente neutras, mas apenas acontecerem em um local com maior frequência de polimorfismos (Fig. 9).

A região seqüenciada foi identificada como uma região de baixa complexidade no programa ProDom. Considerando-se os dados de Tirabassi et al. (1998), ela representa parte do domínio extra-celular de gE. Os epítomos da glicoproteína homóloga do herpesvírus bovino tipo 1 foram considerados altamente conservados (Rijsewijk et al., 2000). Tal informação, aliada ao grau de conservação encontrado nesse trabalho, permite teorizar que o restante da glicoproteína mantém-se igualmente conservado, seguindo o padrão de sua homóloga.

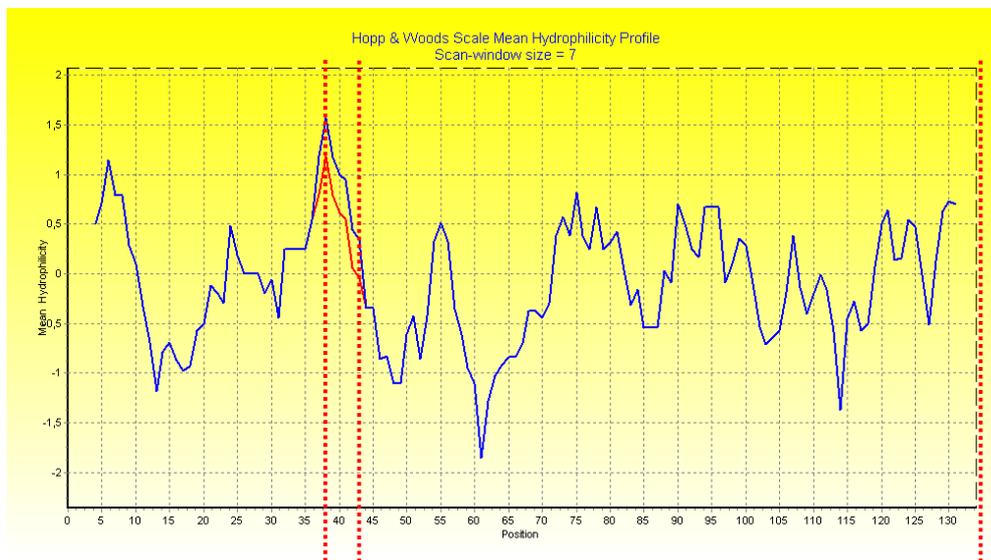


Figura 7: Gráfico com o perfil da escala da média de hidrofilia de Hopp & Woods: com intervalo de análise de 7 aminoácidos. Amostra NOVA PRATA (em vermelho), amostra 3319 em (em azul). As linhas tracejadas vermelhas marcam os sítios de glicosilação. A única mudança no perfil ocorre entre os resíduos 35 e 44, coincidindo, em parte, com a região de desordem expandida. A análise computacional das mudanças em NOVA PRATA prediz uma menor exposição antigênica e flexibilidade na região.

Outro dado relativo ao sítio quente foi a mudança no perfil hidrofóbico da região (Fig. 10). As amostras dos grupos B1 e B2 apresentaram uma sensível redução no nível de hidrofobia. Quando a

mesma região é visualizada no gráfico do perfil de hidrofilia, pode-se prever que estaria mais exposta antígenicamente (Fig. 11 e 12).

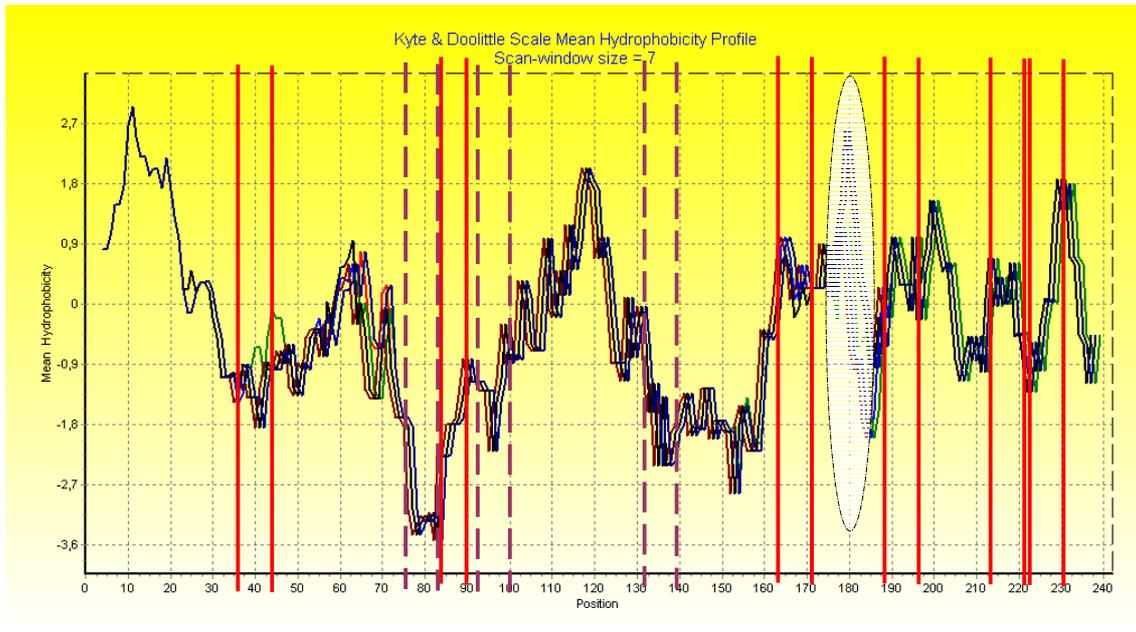


Figura 10: Gráfico com o perfil da escala da média de hidrofobia de Kyte & Doolittle com intervalo de análise de 7 aminoácidos. Amostras 3303 (grupo A, em vermelho), 3293 (grupo B1, em azul), NOVA PRATA (grupo B2, em marrom), Bartha (em verde), 113 (em preto), NIA-3 (azul escuro). As linhas tracejadas vermelhas marcam os sítios de glicosilação. As linhas de tracejados maiores roxas marcam os domínios de ligação à heparina. Todos esses sítios apresentam um perfil idêntico em todas as amostras, exceto pela amostra Bartha com uma variação no primeiro sítio de glicosilação. O círculo tracejado negro evidencia o sítio quente em que nota-se a redução no índice de hidrofobia entre as amostras dos grupos B1 e B2.

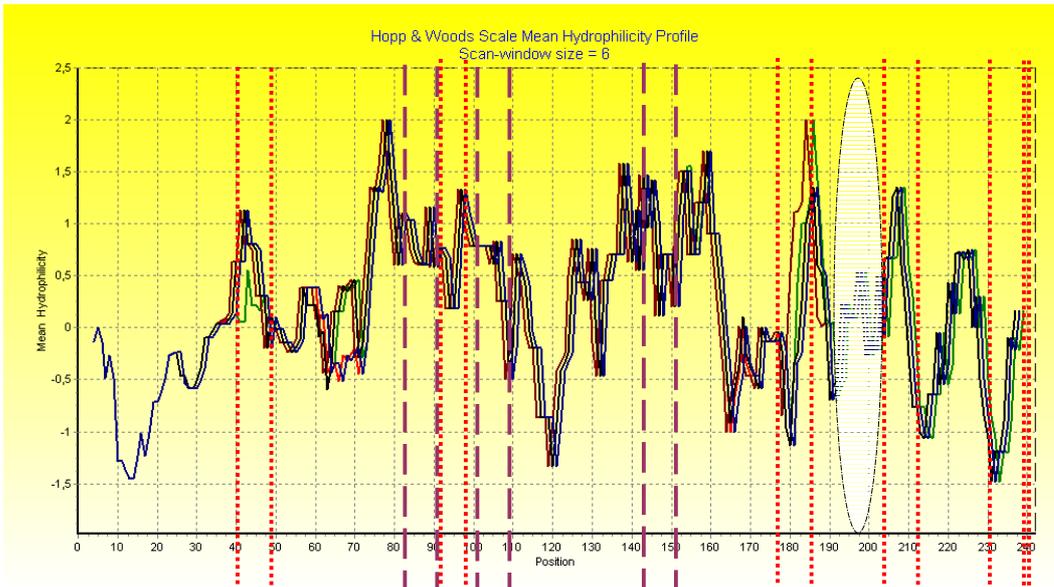


Figura 11: Gráfico com o perfil da escala da média de hidrofilia de Hoops & Woods com intervalo de análise de 7 resíduos. Amostras 3303 (grupo A, em vermelho), 3293 (grupo B1, em azul), NOVA PRATA (grupo B2, em marrom), Bartha (em verde), 113 (em preto), NIA-3 (azul escuro). As linhas tracejadas vermelhas marcam os sítios de glicosilação. As linhas de tracejados maiores roxas marcam os domínios de ligação a heparina. O círculo tracejado negro evidencia o sítio quente. A mudança no perfil entre os resíduos 62 e 70 e no sítio quente poderiam tornar tais regiões mais expostas nas amostras Bartha, 3293 e NOVA PRATA.

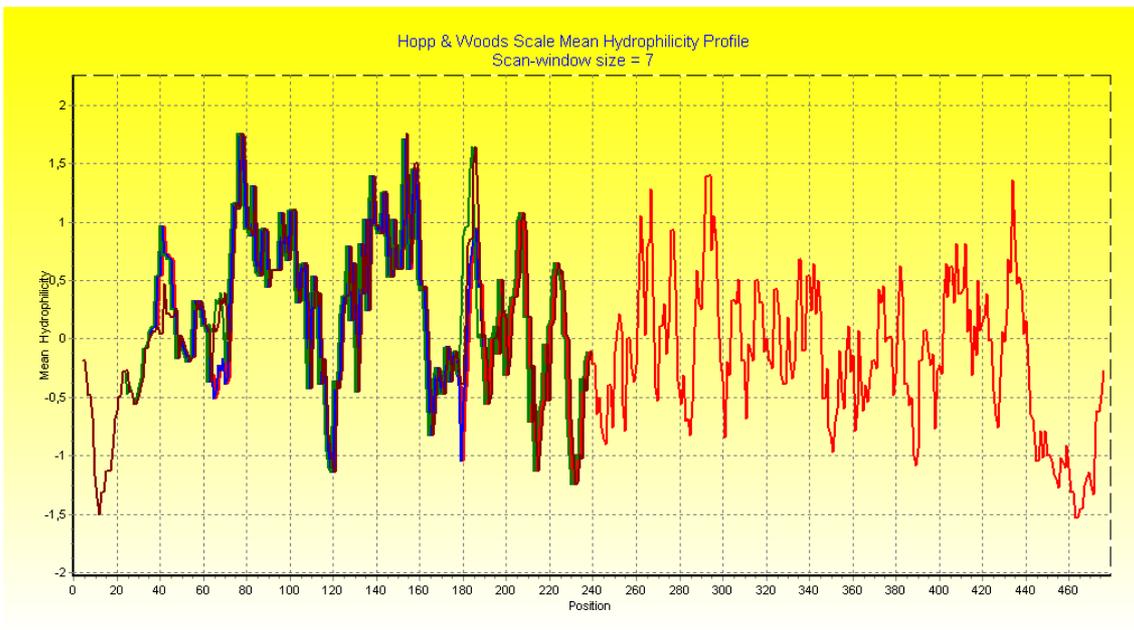


Figura 12: Gráfico com o perfil da escala da média de hidrofilia de Hoops & Woods com intervalo de análise de 7 resíduos. Amostras 3303 (grupo A, em azul), 3293 (grupo B1, em verde), Bartha (em marrom), NIA-3 (vermelho).

A busca por domínios em ProDom revelou homologia com dois domínios da glicoproteína homóloga do herpesvírus da doença de Marek. O primeiro seria um sinal membrana transmembrana (número de acesso PD018038) e o segundo um epítipo reconhecido pelo MHC II (número de acesso PD002483) (Fig. 13). A amostra 3338 foi inserida devido a uma mutação

no ponto quente que a difere de outras amostras do grupo B. A área homóloga reconhecida pelo MHCII é menor em cerca de 20 resíduos para ambas as amostras do grupo B (a mutação de 3338 modificou a posição em relação a 3319 por apenas 3 aminoácidos).

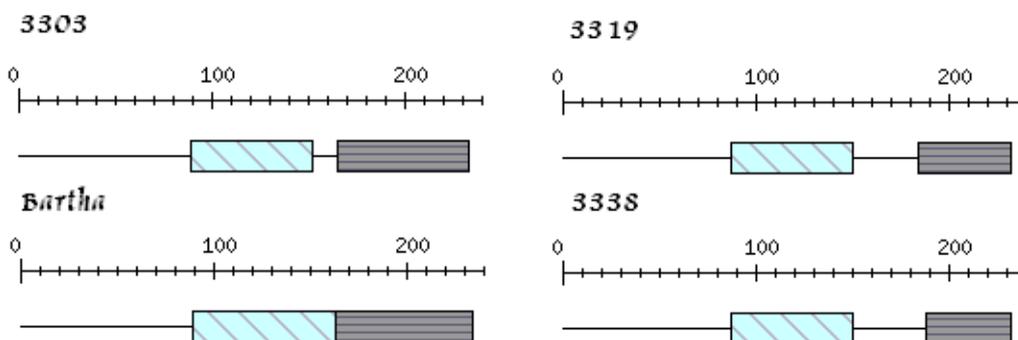


Figura 13: Resultado da procura por domínios em Prodom para amostras 3303 (grupo A), 3319 (grupo B), Bartha e 3338. A região em azul representa o sinal transmembrana e a região em cinza a área reconhecida pelo MHC II.

A análise dos graus de tolerância das substituições dos aminoácidos pelo programa SIFT predisse como toleráveis todas as mutações em grande parte das seqüências de gC, exceto por algumas presentes em Bartha e em IB341/86 (Fig. 14). O resíduo 43 da

amostra vacinal é predito como tolerável, porém não aparece em mais nenhuma seqüência dos bancos de dados. A amostra paulista, por sua vez, apresenta uma substituição de A para V no resíduo 60 também listado como intolerante.

	w	174H	1.00	m	f	y	i	c	H	q	l	r	e	n	v	k	d	t	p	s	g	A						
	w	m	f	i	175A	1.00	y	c	h	l	r	v	q	k	t	p	n	s	g	e	D	A						
	w	m	f	176D	1.00	i	y	h	c	r	l	v	q	k	t	p	n	D	e	s	g	A						
	h	w	d	n	y	r	e	c	q	k	p	177A	1.00	t	s	g	f	m	v	i	A	L						
	w	h	y	178L	1.00	d	n	r	q	e	c	k	f	m	p	g	s	T	i	L	v	A						
w	h	y	f	m	i	n	q	r	d	c	e	k	l	v	t	s	179A	1.00	g	A	P							
	w	h	y	f	n	d	180P	1.00	r	q	m	e	k	c	l	i	t	g	s	P	V	A						
h	d	w	g	n	r	e	y	c	s	q	k	p	t	a	f	m	181V	1.00	i	L	V							
	c	w	f	m	y	i	h	182V	1.00	r	l	V	g	t	n	s	p	k	a	q	D	E						
	c	w	f	m	y	i	h	183V	1.00	r	g	n	t	V	s	p	k	a	q	D	E							
	w	m	f	i	c	y	184E	1.00	l	h	v	r	t	p	q	k	n	s	a	d	E	G						
							185-	0.96	c	w	m	p	d	q	n	k	r	i	t	s	E	v	h	A	G	l	f	y
							186G	1.00	w	m	f	i	c	y	h	v	l	t	e	q	d	p	n	s	a	G	k	R
	w	f	y	m	c	i	h	187E	1.00	r	l	n	v	t	p	k	q	g	s	d	E	A						
	w	f	188R	1.00	c	m	y	i	h	d	l	v	p	g	e	n	q	a	s	k	R	T						

Figura 14: Predição do efeito das mudanças de aminoácidos na função protéica pelo programa SIFT. Aminoácidos apolares (preto), polares sem carga (verde), básicos (vermelho), ácidos (azul). Letras maiúsculas representam aminoácidos existentes nas seqüências alinhadas e minúsculas aminoácidos que não estão presentes. A figura apresenta apenas os dados relativos ao sítio quente, em que se percebe que todas as mutações são toleráveis na estrutura protéica.

A estrutura secundária da glicoproteína foi alterada pelas mutações, principalmente no ponto quente e regiões adjacentes (Fig. 15). A estrutura secundária da maioria das amostras internacionais e do grupo A é marcada pela presença de uma fita beta no ponto quente. A mesma é diminuída pelas mutações em Shope e Bartha e desaparece no grupo B. As estruturas adjacentes também são afetadas com diminuição da alfa-hélice anterior ao ponto quente nas amostras padrão e vacinal e um aumento no grupo B. A análise de acessibilidade ao solvente foi realizada pelo programa Scratch (Fig. 16).

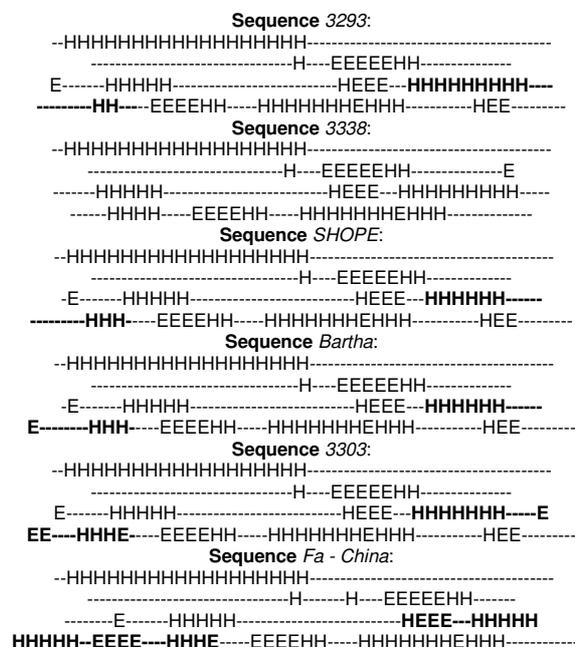


Figura 15: Predição da estrutura secundária resultante da análise no programa nnPredict. As regiões mutadas estão marcadas em negrito.

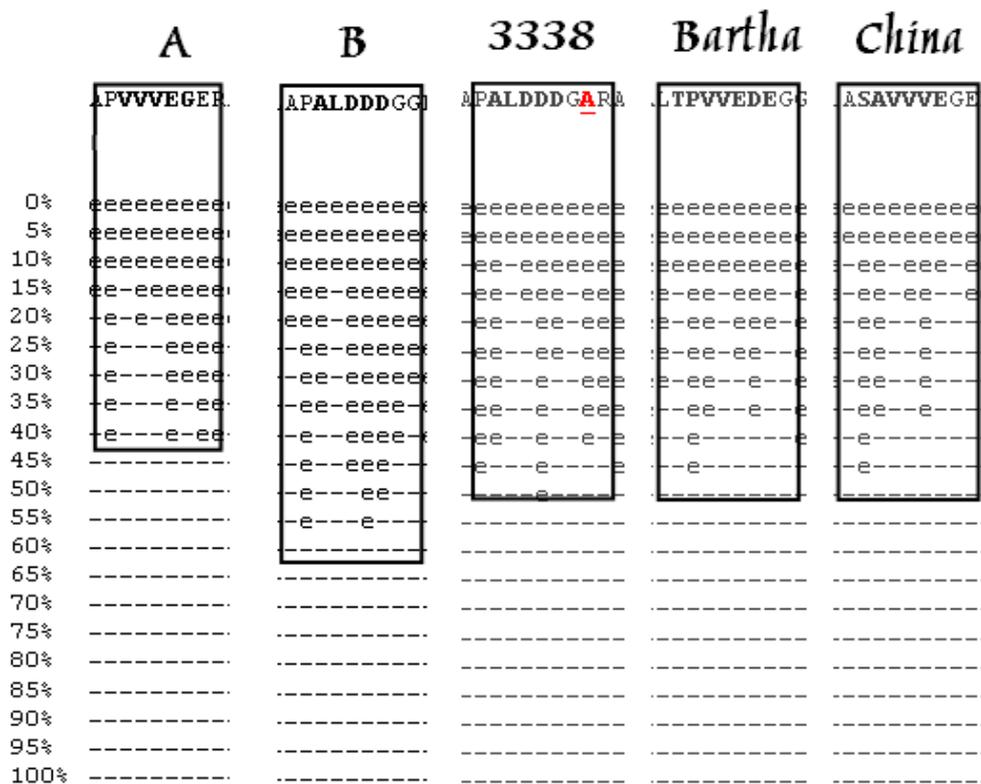


Figura 16: Resultado da análise de acessibilidade a solvente pelo programa Scratch com os pontos quentes apresentados pelo grupo A, B, amostra 3338, amostra Bartha e grupo China. A amostra 3338 foi incluída devido à substituição de glicina por alanina que alterou a acessibilidade. O ponto quente de A representa a maior parte das amostras internacionais com exceção das chinesas.

As glicoproteínas E e C não são essenciais para o crescimento do SHV-1 em cultivos celulares, porém são fatores fundamentais para a virulência. A perda de gE reduz drasticamente a capacidade infectante e de disseminar via neurônio-neurônio (Christensen, 1995). A deleção de gC reduz a eficiência na penetração além da perda da função de escape do sistema imune ao se ligar ao complemento. Dada a importância das duas glicoproteínas na virulência, é natural que tenham alto grau de conservação, o que se soma ao baixo índice de mutações do SHV-1. A diferença entre o número de mutações nas duas está ligada diretamente à

característica de gC de gerar uma resposta imunológica protetora.

As mutações detectadas em gE, apesar de todas serem não sinônimas, mostraram-se neutras e não alteraram o perfil de hidrofília daquela região, exceto pelo grupo B2. Ohta (1995) propõe, entretanto, que nenhuma mutação não sinônima é perfeitamente neutra, mas todas são levemente deletérias. A fixação desse gene poderia ocorrer por duas maneiras, a primeira por seleção negativa em grandes populações e a segunda por deriva genética em pequenas populações. Essa pressão foi confirmada pelo programa Selecton,

revelando as áreas de pressão neutra e negativa. Soma-se a esses, resultados de SIFT que autenticam essas informações confirmando que as substituições dos aminoácidos são toleráveis. A possibilidade de uma mutação ser levemente deletéria na posição 32 (valina por leucina no grupo B) pode ser corroborada pelo fato de a amostra estar em um ponto de baixa acessibilidade a solvente (Bustamante et al., 2000).

As variações encontradas em gC foram mais complexas, envolvendo desde aminoácidos considerados intoleráveis por SIFT à mudanças no perfil de hidrofilia. Nenhum dos HBD foram afetados pelas mutações. As mutações em sítios de N-glicosilação não incorreram na perda ou mudança de posição nos mesmos, implicando apenas em áreas de fraca pressão positiva. A maioria está localizada em áreas de forte pressão negativa, o que salienta sua conservação.

O maior perfil de mudanças está localizado justamente no sítio quente. Aqui ocorre uma mudança nos perfis do grupo B, com a substituição completa da região e uma inserção (VVVE para ALDDD). Essa troca muda o perfil de hidrofilia, o que tornaria a região mais exposta antígenicamente (Hoop et al., 1981).

Outra informação marcante obtida desse trabalho foi o fato de as amostras do grupo B possuírem a mesma mutação que a amostra norte-americana PRV8044 e a japonesa Yamagata S 81. PRV8044 foi derivada de bovinos e foi a única das amostras com a mutação ALDDD encontrada nos focos ocorridos durante o ano de 1989 em Illinois (Goldberg et al., 2001). É interessante o dado de que entre 15 amostras norte-americanas de um

mesmo estado, apenas uma apresentou essa mutação. O autor argumenta que a mesma poderia ter origem internacional, por se agrupar com Yamagata S 81, ou vacinal. Infelizmente sabe-se pouco da amostra japonesa, além da especulação de Christensen (1995) que a mesma seja resultado de uma recombinação. Carece-se de mais amostras para se argumentar que essa mudança seria uma adaptação ao hospedeiro que teria prevalecido no Brasil. Um ponto de desordem com maior flexibilidade permitiria que o vírus se adaptasse melhor ao novo hospedeiro (alía-se a isso a presença de mutações em outra amostra derivada de bovinos como Shope). O problema é que a infecção por SHV-1 tende a ser altamente fatal em espécies que não os suínos, o que gera pouca oportunidade para que vírus ali mutados sejam transmitidos para outros hospedeiros. O histórico do Brasil é claro quanto ao fato de a doença ter sido detectada amplamente em bovinos no início do século XX, tendo o primeiro isolamento em suínos ocorrido apenas na década de trinta desse mesmo século (MAPA, 2007), mas a percepção de que os suínos eram a principal fonte de disseminação do vírus se deu tardiamente também em outros países (Köhler et al., 2003), portanto esse argumento explica pouco a possibilidade de uma expansão do grupo B a partir de uma amostra mutada em bovinos.

O seqüenciamento da amostra Bartha descrito nesse trabalho tem resultados diferentes da referência anterior (Robbins et al., 1989). Klupp et al. (2004) afirmaram, no entanto, ao publicar a seqüência completa do genoma do SHV-1 que as seqüências publicadas na década de oitenta do século passado são pouco confiáveis devido ao alto grau de guanina e citosina que dificultava o

seqüenciamento. Nesse trabalho, Bartha foi seqüenciada quatro vezes para verificação de toda a seqüência de DNA. Encontrou-se outras mutações como no ponto quente e uma maior diferença entre todas as outras amostras seqüenciadas. Há, ainda, a possibilidade de se encontrar outras mutações deletérias no restante da glicoproteína.

4.5.2 IDENTIFICAÇÃO DE SÍTIOS ESPECÍFICOS DE SELEÇÃO POSITIVA E SELEÇÃO NEGATIVA

A análise do programa Selecton encontrou sítios de pressão seletiva positiva em gC. Ocorre pressão positiva sobre a glicoproteína, determinando-se como principal ponto o sítio quente. Percebe-se nesse mesmo local que a inserção de um códon para ácido aspártico nos grupos B1 e B2 tende a se estabilizar. A glicoproteína sofre os efeitos da pressão seletiva de modo a modificar sua estrutura, principalmente no sítio quente (Fig. 17).

O fato de essa porção estar diretamente sobre pressão positiva e de gC ser uma das glicoproteínas que gera maior resposta imune (Nauwyck, 1997), gera a suspeita de esse ser um dos epítomos apesar de análise das seqüências no Immune Epitope Database and Analysis Resource (disponível em <http://www.immuneepitope.org>) não ter encontrado nenhum epítomo equivalente. Além da informação óbvia da homologia com a área reconhecida pelo MHC II, outra evidência encontrada nesse trabalho é o perfil hidrofílico do ponto quente altamente semelhante ao dos HBD, já descritos como alvos específicos da resposta imune (Ober et al., 2000). A hipótese foi corroborada pelo fato de a deleção da região entre 157 e 290 gera a perda da interação com anticorpos monoclonais

neutralizantes (Zsak et al., 1991) e que nenhum HBD está localizado nessa área.

A junção dessas informações leva a questionar qual seria a vantagem da manutenção desse alelo. O perfil hidrofílico de ALDDD indica que a exposição da região permitiria maior acesso do sistema imune no caso de um epítomo, mas essa não seria necessariamente a função dessa região. O ponto quente do grupo B determina uma região de desordem na glicoproteína que determina a perda da homologia com parte da região reconhecida pelo MHC II. A característica da desordem protéica seria uma vantagem por formarem epítomos pobres para células B e preditas como pouco apresentadas para epítomos de células T (Carl et al., 2005). Entre outras vantagens menos óbvias, nessa situação, de uma região em desordem está a possibilidade de mudar sua conformação no ambiente, permitindo que se ligue a mais de um alvo (Hansen et al., 2006). Regiões mais expostas e flexíveis como a de ALDDD estariam mais propensas a mutações por afetarem menos a estrutura protéica (Bustamante et al., 2000). A seleção negativa nesse ponto quente mutado seria fraca, o que confere com os resultados encontrados no programa Selecton. Outra evidência da possibilidade de que ALDDD implicar em alguma vantagem para o vírus é a mutação presente na amostra 3338, não mais encontrada. Ela permanece no mesmo grupo, mas separa-se levemente e apresenta menor acessibilidade a solvente, a perda da região de desordem. Tal perfil não foi mais encontrado na árvore filogenética.

É importante realçar que um epítomo de umas das glicoproteínas mais importantes imunologicamente está

mutado e difere radicalmente das amostras vacinais quando comparado com a maior parte dos vírus circulantes no Brasil. A resposta imunológica a gC é tão importante que foi utilizada como adjuvante para aumentar a eficiência de vacinas ou expressa nos plasmídeos de vacinas de DNA (Gerdtts et al., 1999).

A glicoproteína E manteve apenas sítios de pressão negativa ou estabilizadora. Percebe-se a tendência para estabilização da glicoproteína, o que impede a divergência de função e forma. Todos as susbtituições em gE apresentaram-se neutras (Fig. 18).



Esca de seleção:



Seleção positiva

Seleção negativa

Figura 17: Resultado do teste para pressão seletiva em gC, utilizando a amostra 3256 como questão.

1 11 21 31 41
 V G P A R H E P R F H A L G F H S Q L F S P G D T F D L M P R L V S D M G D S R E N F T A T L D W Y

 51 61 71 81 91
 Y A R A P T R C L L Y Y V Y E P C I Y H P R A P E C L R P V D P A C S F T S P A R A R L V A R R A Y

 101 111 121 131
 A S C S P L L G D R W L T A C P F D A F G E E V H T N A T A D E S G

Escala de seleção:

1 2 3 4 5 6 7

Seleção positiva

Seleção negativa

Figura 18: Resultado do teste para pressão seletiva em gE, utilizando a amostra 3256 como questão.

5 CONCLUSÃO

Os estudos das amostras brasileiras do SHV-1 demonstraram o baixo grau de variabilidade entre as seqüências, mas suficiente para dividir as amostras nos grupos A, B1 e B2. As cepas de SHV-1 presentes no Brasil são provavelmente derivadas da Europa. Os genes para gE e gC demonstraram taxas de evolução diferentes.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BANG, F. B. Experimental infection of the chick embryo with the virus of pseudorabies. **The Journal of Experimental Medicine**. V. 76, pp. 263-270, 1942.

BASCUÑANA, C. R., BJÖRNEROT, L., BALLAGI-PORDÁNY, A., ROBERTSSON, J. A., BÉLAK, S. Detection of pseudorabies virus genomic sequences in apparently uninfected "single reactor" pigs. **Veterinary Microbiology**. v. 55, pp 37-47, 1997.

BELAK, S. The molecular diagnosis of porcine viral diseases: a review. **Acta Veterinaria Hungarica**. v. 53, n 1, pp. 113-124, 2005.

BRU, C., COURCELLE, E., CARRE`RE, S., BEAUSSE, Y., DALMAR S., KAHN, D. The ProDom database of protein domain families: more emphasis on 3D. **Nucleic Acids Research**, v 33, 2005

BUSTAMANTE, C. D., TOWNSEND, J. P., HARTL, D. L. Solvent Accessibility and Purifying Selection Within Proteins of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. **Molecular Biology and Evolution**, v. 17, n 2, 301-308, 2000.

CARL, P. L., TEMPLE, B. R. S., COHEN, P. L. Most nuclear systemic autoantigens are extremely disordered proteins: implications for the etiology of systemic autoimmunity. **Arthritis Research & Therapy**, v. 7, n 6, R1360-1374, 2005.

CHRISTENSEN, L. S. Comparison by restriction fragment pattern analysis and

molecular characterization of some European isolates of suid herpesvirus 1: a contribution to strain differentiation of European isolates. **Archives of Virology**, v. 102, pp. 39-47, 1988.

CHRISTENSEN, L. S. Population biology of suid herpesvirus 1. **APMIS**, supplementum n. 48, v. 103, 1995.

CHRISTENSEN, L. S; MEDVECZKY, I; STRANDBYGAARD, B. S; PEJSAK, Z. Characterization of field isolates of suid herpesvirus 1 (Aujeszky's disease virus) as derivatives of attenuated vaccine strains. **Archives of Virology**, v. 124, pp. 225-234, 1992;

CUNHA, E. M. S., PEIXOTO, Z. M. P., KOTAIT, I. Efficacy of an inactivated Aujeszky's disease virus vaccine: experimental infection of pigs. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. vol. 35, no. 4, 1998.

DEAN, H. J.; CHEUNG, A. K. A deletion at the U_L/I_R junction reduces pseudorabies virus neurovirulence. **Journal of Virology**, v. 69, n 2, pp. 1334-1338, 1995.

ECHEVERRIA, M.G.; NORIMINE, J.; GALOSI, C.M.; OLIVA, G.A.; ETCHEVERRIGARAY, M.E.; NOSETTO, E.O.; TOHYA, Y.; MIKAMI, T. The genotype of Aujeszky's disease viruses isolated in Argentina. **Journal of Veterinary Medical Science**, 56, 985-987, 1994.

FELSENTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, v. 39, n4, pp. 783-791, 1985.

GERDTS, V., JÖNS, A., METTENLEITER, T.C. Potency of an experimental DNA vaccine against

Aujeszky's disease in pigs. **Veterinary Microbiology**, v. 66, n 1, 1-13, 1999.

GIELKENS A. L. J; BERNIS A. J. M. Genome differences among field isolates and vaccine strains of pseudorabies virus. **Journal of General Virology**, v. 66, pp. 69-82, 1985.

GOLDBERG, T. L. Application of phylogeny reconstruction and character-evolution analysis to inferring patterns of directional microbial transmission. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 61, pp. 59-70, 2003.

GOLDBERG, T. L; WEIGEL, R. M; HAHN, E. C; SCHERBA, G. Comparative utility of restriction fragment length polymorphism analysis and gene sequencing to molecular epidemiological investigation of a viral outbreak. **Epidemiology and Infection**, v. 126, pp. 415-424, 2001.

GROFF, F. H. S.; MERLO, M. A.; STOLL, P. A., STEPAN, A. L.; WEIBLEN, R., FLORES, E. F. Epidemiologia e controle dos focos da doença de Aujeszky no Rio Grande do Sul, em 2003. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, n. 1, pp. 25-30, 2005.

GRANZOW, H.; KLUPP, B. G., FUCHS, W., VEITS, J.; OSTERRIEDER, N.; METTENLEITER, T. C. Egress of alphaherpesviruses: comparative ultrastructural study. **Journal of Virology**, v. 75, n. 8, pp. 3675-3684, 2001.

HALL, T. Bioedit v. 7.0.5.3. Disponível em <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/page2.html>.

HANSEN, J. C., LU, X., ROSS, E. D., WOODY, R. W. Intrinsic Protein Disorder, Aminoacid composition, and

histone terminal domains. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n 4, 1853-1856, 2006.

HOOP, T. P., AND WOODS K. R. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v 78, n 6, 3824, 1981.

HUANG, C, HUNG, J. J., WU, C. Y., CHIEN, M.S. Multiplex PCR for rapid detection of pseudorabies virus, porcine parvovirus and porcine circoviruses. **Veterinary Microbiology**, v. 101, 209-214, 2004.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Disponível para consulta em www.ibge.gov.br.

ISHKAWA, K.; TSUTSUI M., TAGUCHI, K.; SAITOH, A.; MURAMATSU, M. Sequence variation of the gC gene among pseudorabies virus strains. **Veterinary Microbiology**, v. 49, n. 3-4, pp. 267-272, 1996.

JIN, S; ZHANG, B; WEISZ, O. A; MONTELARO, R. C. Receptor mediated entry by equine infectious anemia virus utilizes a pH dependent endocytic pathway. **Journal of Virology**, v. 79, n 3, 14489-14497, 2005.

JOLLEY, K. A., FEIL, E. J., CHAN, M. S., MAIDEN, M. C. Sequence type analysis and recombinational tests (START). **Bioinformatics**, v. 17, n 12, 1230-1231, 2001.

LOLE KS, BOLLINGER RC, PARANJAPE RS, GADKARI D, KULKARNI SS, NOVAK NG, INGERSOLL R, SHEPPARD HW, RAY SC. Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters

in India, with evidence of intersubtype recombination. **Journal of Virology**, v. 73, n. 1, 152-60, 1999.

KÖHLER, M., KÖHLER, W. Zentralblatt für bakteriologi – 100 years ago Alçádar Aujeszky detects a “new” disease – or: it was the cow and not the sow. **Journal of Medical Microbiology**, v. 292, 423-427, 2003.

KLUGE, J.P., BERAN, G.W., HILL, H.T., PLATT K.B. 1999. Pseudorabies (Aujeszky's Disease), p.233-146. In: Straw B.E, D'Allaire S., Mengeling W.L., Taylor D.J. (ed.) **Diseases of Swine**. Iowa State University Press, Ames.

KLUPP, B. G.; HENGARTNER, C. J.; METTENLEITER, T. C.; ENQUIST, L. W. Complete, annotated sequence of the pseudorabies virus genome. **Journal of Virology**, v. 78, n 1, pp 424-440, 2004.

Levin, B. R.; Lipsitch, M.; Bonhoeffer, S. Population biology, evolution, and infectious disease convergence and synthesis. **Science** 283 (5403), 806-809, 1999.

Linding, R., Russell, R. B., Neduva, V., Gibson, T. J. GlobPlot: exploring protein sequences for globularity and disorder. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n 13, 3701-3708, 2003.

MAES, R. K; SUSSMAN, M. D; VILNIS, A; THACKER, B. J. Recent developments in latency and recombination of Aujeszky's disease (pseudorabies) virus. **Veterinary Microbiology**, v. 55, pp. 13-27, 1997.

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), Instrução Normativa nº 8 de três de abril de 2007. Disponível para consulta em

<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=17719>.

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

McGEOCH, D. J.; DOLAN, A.; RALPH, A. C. Toward a comprehensive phylogeny for mammalian and avian herpesviruses. **Journal of Virology**, v. 74, n. 22, pp. 10401-10406, 2000.

MENGELING, W. L.; BROCKMEIER, S. L., LAGER, K. M., VORWALD, A. C. The role of biotechnologically engineered vaccines and diagnostics in pseudorabies (Aujeszky's disease) eradication strategies. **Veterinary Microbiology**, v. 55, pp. 49-60, 1997

METTENLEITER, T. C. Aujeszky's disease (pseudorabies) virus: the virus and molecular pathogenesis – state of the art, june 1999. **Veterinary Research**, v. 31, pp. 99-115, 2000.

METTENLEITER, T. C. Herpesvirus assembly and egress. **Journal of Virology**, v. 76, pp. 1537-1547, 2002.

METTENLEITER, T. C. Immunology of pseudorabies (Aujeszky's disease). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 54, pp. 221-229, 1996.

MILLER, G. Y.; TSAI, J. S.; FORESTER, L. Benefit-cost analysis of the national pseudorabies virus eradication program. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. V. 208; n. 2, pp. 208-213, 1996.

MULDER, W. A.; JACOBS, L.; PRIEM, J.; KOK, G. L.; WAGENAAR, F.; KIMMAN, T. G.; POL, J. M. Glycoprotein gE-negative pseudorabies virus has reduced capability to infect second- and third-order neurons of the olfactory and trigeminal in porcine central nervous system. **Journal of General Virology**, v. 75, n. 11, pp. 3095-106.

NAWYNCK, H. J. Functional aspects of Aujeszky's Disease (pseudorabies) viral protein with relation to invasion, virulence and immunogenicity. **Veterinary Microbiology**, v. 55, pp. 3-11, 1997.

NEKRUTENKO, A.; MAKOVA, K. D.; LI, W. H. The KA/KS Ratio Teste for Assessing the Protein-Coding Potential of Genomics Regions: Na Empirical and Simulation Study. **Genome Research**, v. 12, 198-202, 2002.

NG, P. C., HENIKOFF, S. SIFT: predicting amino acid changes that affect protein function. **Nucleic Acid Research**, v. 31, n 13, 3812-3814, 2003.

NISHIMORI, T., IMADA, T., SAKURAI, M., KITABAYASHI, T., KAWAMURA, H., NAKAJIMA, H. Restriction Endonuclease Analysis of Aujeszky's Disease Virues Isolated in Japan. **Japanese Journal of Veterinay Science**, v. 49, n 2, 365-367, 1987.

OBER, B. T., TEUFEL, B., WIESMÜLLER, K. H., JUNG, G., PFAFF, E., SAALMÜLLER, A., RZIHA, H. J. The porcine humoral imune response against pseudorabies virus specifically targets attachment sites on glycoprotein gC. **Journal of Virology**, v. 74, n 4, p. 1752-1760, 200.

Office International des Epizooties (OIE), World Organisation for Animal

Health. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. 5th ed. Paris: OIE, 2004. Disponível em: http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_summry.htm.

OHTA, T. Synonymous and nonsynonymous substitutions in mamalian genes and the nearly neutral theory. **Journal of Molecular Evolution**, v. 40, 56-63, 1995.

PETROVSKIS, E. A.; TIMMINS, J. G.; GIERMAN T. M.; POST, L. E. Deletions in vaccine strains of pseudorabies virus and their effect on synthesis of glycoprotein gp63. **Journal of Virology**, v. 60, pp. 116-1169, 1986.

PETROVSKIS, E. A.; TIMMINS, J. G.; ARMENTROUT, M. A.; MARCHIOLI, C. C.; YANCEY, R. J.; POST, L. E. DNA sequence of the gene for pseudorabies virus gp50, a glycoprotein without N-linked glycosylation. **Journal of Virology**, v. 59, n. 2, pp. 216-223, 1986

PIATTI, R. M.; IKUNO, A. A.; CUNHA, E. S.; D'AMBROS, R.; GREGORI, F.; SOARES, R. M.; CORTEZ, A., RICHTZENHAIN, L. J. Characterization of aujeszky's disease virus isolates from south and southeast Brazil by RFLP analysis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, pp. 144-146, 2001.

POSADA, D. Evaluation of methods for detecting recombination from DNA sequences: empirical data. **Molecular Biology Evolution**, v. 19, p. 708-717, 2002.

RANDMAN, M. Enzymes of evolutionary change. **Nature**, v. 401, 866-869, 1999.

RIRIE, K. M.; RASMUSSEN, R. P.; WITWER, C. T. Product differentiation of DNA melting curves during

polymerase chain reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 245, 154-160, 1997.

RIJSEWIJK, F.A., KAASHOEK, M.J., LANGEVELD, J.P., MARIS-VELDHUIS, M.A., MAGDALENA, J., VERSCHUREN, S.B., MELOEN, R.H., VAN OIRSCHOT, J.T. Epitopes on glycoprotein E and on the glycoprotein E/glycoprotein I complex of bovine herpesvirus 1 are expressed by all of 222 isolates and 11 vaccine strains. *Archives of Virology*. v145, n5, 921-36, 2000.

ROBBINS, A. K.; RYAN, J. P.; WHEALY, M. E.; ENQUIST, L. W. The gene encoding the gIII envelope protein of pseudorabies virus vaccine strain bartha contains a mutation affecting protein localization. *Journal of Virology*, v. 63, n^o 1, pp. 250-258, 1989.

ROBBINS, A. K.; DORNEY, D. J.; WATHEN, M. W.; WHEALY, M. E.; GOLD, C.; WATSON, R. J.; HOLLAND, L. E.; WEED, S. D.; LEVINE, M.; GLORIOSO, J. C.; ENQUIST, L. W. The pseudorabies virus gII gene is closely related to the gB glycoprotein gene of herpes simplex virus. **Journal of Virology**, v. 61, n 9, pp. 2691-2701, 1987.

ROS, C.; BELÁK, S. Studies of genetic relationships between bovine, caprine, corvine, rangferine alphaherpesvirus and improved molecular methods for virus detection and identification. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 5, p. 1247-1253, 1999.

SAKAOKA, H., KURITA, K., IIDA, Y., TAKADA, S., UMENE, K., KIM, Y. T., REN, C. S., NAHMIAS, A. J. Quantitative analysis of genomic polymorphism of herpes simplex type 1 strains from six countries: studies of molecular evolution and molecular

epidemiology of the virus. *Journal of General Virology*, v. 75, p. 513-527, 1994.

SILVA, A. D., SORTICA, V. A., BRAGA, A., C., SPILKI, F., R., FRANCO, ^a C., ESTEVES, P. A., RIJSEWIJKS, F., ROSA, J. A., BATISTA, H. B. C. R., OLIVEIRA, A. P., ROEHE, P. Caracterização antigênica e molecular de oito amostras do vírus da doença de Aujeszky isoladas no estado do Rio Grande do Sul em 20031. **Pesquisa veterinária Brasileira**, v. 25, n 1, p. 21-24, 2005.

STERN, A.; DORON-FAIGENBOIM, A.; EREZ, E.; MARTZ, E.; BACHARACH, E.; PUPKO, T. Selecton 2007: advanced models for detecting positive and purifying selection using Bayesian inference approach. **Nucleic Acids Research**, v. 35, W506-W511, 2007.

Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24: 1596-1599, 2007.

THIRY, E., MEURENS, F., MUYKENS, B., McVOY, m., GOGEV, S., THIRY, J., VANDERPLASSCHEN, A., EPSTEIN, A., KEIL, G., SCHYNTS, F. Recombination in alphaherpesvirus. **Reviews in Medical Virology**, v. 15, n 2, 89-103, 2005.

TIRABASSI, R. S., ENQUIST, L., W. Role of Envelope Protein gE Endocytosis in the Pseudorabies Lyfe

Cycle. **Journal of Virology**, v. 72, n 6, 4571-4579, 1998.

TODD, D; McFERRAN, J. B. Restriction endonuclease analysis of Aujeszky's disease (pseudorabies) virus DNA: comparison of Northern Ireland isolates and isolates from other countries. **Archives of Virology**, v. 86, pp. 167-176, 1985.

WATHEN, M. W., PIRTLE, E. C. Stability of the pseudorabies virus genome after in vivo serial passage. **Journal of General Virology**. V. 65. pt 8, pp. 1401-1404, 1984.

WITTEWER, C. T.; HERMANN, M. G., GUNDRY, C. N., ELENITOBA-JOHNSON, K. S. J. Real-time multiplex PCR assays. **Methods**, v. 25, pp. 430-442, 2001.

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

ZSAK, L., SUGG, N., BEN-PORAT, T., ROBBINS, A. K., WHEALY, M. E., ENQUIST, W. The gIII glycoprotein of pseudorabies virus is involved in two distinct steps of virus attachment. **Journal of Virology**, v. 65, n 8, p 4317-4324, 1991.

ZUCHERMANN, F. A. Aujeszky's disease virus: opportunities and challenges. **Veterinary Research**, v. 31, pp 121-131, 2000.