

RAPIDA DETECÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DOS HERPESVÍRUS BOVINO 1 E 5

RAPID DETECTION AND DIFFERENTIATION OF BOVINE HERPESVIRUS 1 AND 5

MARIA EMÍLIA DE OLIVEIRA^{1*}, FABÍOLA DE ANDRADE CAXITO², FABIANA MAGALHÃES COELHO³, BETÂNIA PAIVA DRUMOND⁴, MAURÍCIO RESENDE⁵

1. Doutora em Microbiologia pelo Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, docente do curso de Medicina do Instituto Metropolitano de Ensino Superior/ IMES – Univaço, Ipatinga, Minas Gerais, Brasil; 2. Doutora em Microbiologia pelo Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Gerente de exames especializados da empresa Hermes Pardini; 3. Doutora em Microbiologia pelo Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais; 4. Doutora em Microbiologia pelo Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, docente do Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia da Universidade Federal de Juiz de Fora; 5. Doutor em Medicina Veterinária pela Universidade de Wisconsin (EUA), docente da Universidade Federal de Minas Gerais

* Rua João Patrício Araújo, 179, Veneza, Ipatinga, Minas Gerais, Brasil, CEP: 35164- 251. oliveirame@gmail.com

Recebido em 23/04/2015. Aceito para publicação em 06/05/2015

RESUMO

Neste trabalho foi descrito um protocolo simples, rápido e barato para detecção e diferenciação do herpesvírus bovino -1 (BoHV-1) e do herpesvírus bovino -5 (BoHV-5). Os DNAs foram extraídos de sobrenadantes de cultura de células infectadas pelo vírus e diretamente de amostras clínicas. Para a extração destes DNAs foi otimizado um protocolo em que se utiliza o NaOH e os DNAs extraídos foram amplificados utilizando-se a reação em cadeia pela polimerase. O fragmento obtido foi então submetido a digestão com enzima de restrição e posterior observação em gel de agarose. Através deste procedimento foi possível diferenciar BoHV-1 de BoHV-5. Estes resultados foram confirmados por sequenciamento. Esta metodologia poderá ser útil em laboratórios de diagnósticos de rotina para detectar e diferenciar estas amostras virais tanto de cultura de tecidos quanto de amostras clínicas.

PALAVRAS-CHAVE: BoHV-1, BoHV-5, extração de DNA, PCR-RFLP, glicoproteína B, diagnóstico diferencial.

ABSTRACT

A simple, rapid and specific protocol for detection and differentiation of bovine herpesvirus -1 (BoHV-1) and bovine herpesvirus -5 (BoHV-5) is described. The NaOH extraction protocol was optimized and amplification by polymerase chain reaction (PCR) was achieved for BoHV-1 and BoHV-5 DNAs prepared from infected supernatant tissue culture and from clinical samples. The established PCR followed by restriction fragment length polymorphism assay was able to detect and differentiate BoHV-1 from BoHV-5 and those results were confirmed by sequencing. This methodology could be useful in routine diagnostic laboratory to detect and differentiate BoHV-1 from BoHV-5 in tissue culture and clinical samples.

KEYWORDS: BoHV-1, BoHV-5, DNA extraction, PCR-RFLP, glycoprotein B gene, differential diagnosis.

1. INTRODUÇÃO

O herpesvírus bovino 1 (BoHV-1) e o herpesvírus bovino 5 (BoHV-5) são membros da família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*¹ e causam doença tanto no gado leiteiro quanto no de corte, causando significativa perda econômica em todo o mundo². BoHV-1 infecta os tratos genital e respiratório podendo causar nos bovinos rinotraqueíte e vulvovaginite/balanopostite pustular infecciosa. Este vírus pode também causar conjuntivite e está relacionado com problemas reprodutivos caracterizados por morte embrionária, fetal ou neonatal³. Os diferentes isolados de BoHV-1 podem ser divididos em subtipos 1.1 e 1.2 através da análise do DNA por digestão com enzimas de restrição. O desenvolvimento destas doenças está mais relacionado com a rota da infecção do que com o subtipo do vírus⁴. O BoHV-5, antes classificado como BoHV-1.3, é um agente neuropatogênico, descrito como agente causal de meningoencefalite não supurativa e afeta principalmente gado jovem^{5,6}. As infecções causadas pelo BoHV-5 têm sido descritas na América do Sul principalmente no centro-sul do Brasil^{7,8} e na Argentina^{9,10,11}.

Embora o BoHV-5 seja classicamente associado com doença neurológica no gado, o BoHV-1 também tem sido descrito como agente causal de desordens no sistema nervoso central^{11,12}. Do mesmo modo, apesar do BoHV-1 estar relacionado a problemas reprodutivos no gado o BoHV-5 tem sido isolado de vacas abortadas^{10,13}. Estes fatos demonstram a importância de se realizar um diagnóstico diferencial para a distinção destas viroses. BoHV-1 e BoHV-5 são geneticamente e antigenicamente relacionadas e sua diferenciação nos testes de diagnósticos de rotina é difícil^{12,14,15}.

O diagnóstico da infecção causada pelo BoHV é

normalmente realizado através do isolamento do vírus, mas esta técnica é demorada e pode não ser sensível o suficiente para detectar o baixo nível de partículas virais comum em infecções causadas por herpesvírus^{16,17}. Além disto, a distinção entre BoHV-1 e 5 é difícil porque estes vírus possuem amplas reações cruzadas detectadas em testes sorológicos, por exemplo, nos testes de soroneutralização. A diferenciação do BoHV-1 e do BoHV-5 é baseada em características clínicas e análise do perfil do genoma destes vírus após digestão com enzimas de restrição^{18, 19,20,21}.

Alguns métodos para detecção do DNA viral têm sido descritos, e a reação em cadeia pela polimerase (PCR) é uma das técnicas mais utilizadas em diagnósticos de rotina sendo mais sensível do que a o isolamento do vírus. Diferentes testes de PCR têm sido desenvolvidos para diferenciação entre BoHV-1 e BoHV-5^{8,14,19,22}.

Uma limitação para o uso diário da PCR, são as ferramentas necessárias para a extração do DNA, que requerem vários passos nos processos de purificação para remover substâncias que podem inibir a reação de amplificação²³. Protocolos de extração que utilizam fenol clorofórmio tem sido bastante usados para se obter ácido nucleico de células e de microrganismos, entretanto além deste método ser demorado ele é caro e envolve o uso de reagentes químicos tóxicos e perigosos²⁴. Neste trabalho foi otimizada uma metodologia rápida, simples e menos dispendiosa para extração do DNA do herpesvírus bovino bem como de cultura de células infectadas quanto de amostras clínicas. Além disto foi desenvolvida uma PCR seguida de digestão com enzima de restrição (RFLP) para a diferenciação entre o BoHV-1 e o BoHV-5.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A amostra Cooper (padrão de BoHV-1 - ATCC VR864) e os isolados de BoHV-1 e BoHV-5 descritos na TABELA 1 foram propagados em células MDBK (Madin Darby bovine kidney – ATCC número CCL-22) cultivadas em garrafas de 75 cm². Monocamadas completas de células MDBK foram inoculadas com 100 TCID₅₀ do vírus em 3 mL de meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 300 mg/L-glutamina e 40 mg/L gentamicina. As garrafas foram incubadas a 37°C, em estufa úmida, com atmosfera de 5% de CO₂ e após a observação de 90% de efeito citopático o sobrenadante celular foi coletado, centrifugado a 2,000 x g por 20 minutos e congelado a -80°C até a extração do DNA para seu uso na PCR.

Onze amostras clínicas provenientes de fetos abortados, nomeadas de A1 a A11 (TABELA 1), foram recebidas de rebanhos leiteiros de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. De cada feto, foram agrupados duas gramas de tecido provenientes do rim, fígado, pulmão, baço e coração. Estas amostras foram homogeneizadas em 20

mL de TNE (0,1 M Tris pH 8,0; 0,15 M NaCl; 0,005 M EDTA) utilizando-se o vórtex e em seguida foram centrifugadas a 2.000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi utilizado para o isolamento viral e extração do DNA para PCR. O sobrenadante foi inoculado em monocamadas completas de células MDBK (10 % do homogeneizado clínico). Após incubação por cinco dias, o sobrenadante celular foi coletado e inoculado em novas monocamadas de células MDBK. Este procedimento foi repetido pelo menos três vezes até as células infectadas apresentarem efeito citopático. O teste de soroneutralização foi realizado usando soro contra a amostra padrão Cooper (BoHV-1) em condições previamente descritas^{4,25}.

A otimização tanto da extração do DNA quanto da PCR foi realizada utilizando-se as amostras de BoHV-1 Cooper e BH54 e amostra de BoHV-5 EVI-88.

Para se obter um melhor método de extração de DNA, que pudesse ser mais rápido e barato, utilizou-se o protocolo de extração descrito por Richards et al (1993)²⁶ com modificações. Brevemente, 1 mL do sobrenadante da cultura do vírus ou 1 mL do sobrenadante obtido dos agrupamentos das amostras clínicas foram centrifugados a 14.000 x g por 1 hora a 4°C. O pellet foi ressuspensão em 40 µL de 50 mM NaOH e aquecido a 95°C por 5 minutos. Em seguida 10 µL of 0.5 M Tris-HCl pH 8.0 foi adicionado a mistura que foi mantida a 4°C.

Tabela 1. Isolados de herpesvírus bovino 1 e 5 e amostras clínicas usadas neste estudo.

| Amostra | Origem/Eepécime | Ano de isolamento | Genoma RFLP-HindIII * |
|----------------------------|--|-------------------|-----------------------|
| IBR 2113 | Vaca/ Swab vaginal | 1974 | BHV-1* |
| IBR 6813 | Bezerro/ Swab nasal | 1974 | BHV-1* |
| LD 15 | Bezerro/ Sêmen | 1975 | BHV-1* |
| LD 19 | Vaca/ Vaginal swab | 1975 | BHV-1* |
| LD 30/2 | Bezerro/ Swab nasal | 1981 | BHV-1* |
| LD 40/1 | Vaca/ Swab vaginal | 1981 | BHV-1* |
| LD 50/2 | Bezerro/ Swab nasal | 1981 | BHV-1* |
| BH 53 | Feto abortado/ Estômago e baço | 1982 | BHV-1* |
| BH 54 | Feto abortado/ Estômago e baço | 1982 | BHV-1* |
| BH 80 | Bezerro/ Swab nasal | 1982 | BHV-1* |
| BH 81 | Bezerro/ Swab nasal | 1982 | BHV-1* |
| BH83 | Bezerro/ Swab nasal | 1983 | BHV-1 [#] |
| EVI-190 | Bezerro/ Cérebro | 1993 | BHV-5 [#] |
| EVI-88 | Bezerro/ Cérebro | 1995 | BHV-5* |
| Amostras clínicas: A1- A11 | Fetos abortados/ Fígado, rim, pulmão, coração e baço | 2004 | ND |

*Genoma caracterizado após RFLP, usando-se a endonuclease HindIII (^{#20}; *Oliveira, dados não publicados). ND: não disponível.

Para realização da PCR foram determinados um par de oligonucleotídeos iniciadores (OI) construídos a partir da análise da sequência do gene que codifica para a glicoproteína B do BHV-1, depositada no GenBank (amostra padrão Cooper, número de acesso: NC_001847). Os OI senso e antisense com suas respectivas localizações no genoma da amostra Cooper são: LVC 120: 5' GAACTACACGGAGGGCAT 3' (posição: 55.849 – 55.867) e LVC 121: 5' AGGTGTGGCTGTCGCTCA 3' (posição: 56.630 – 56.613). A especificidade dos OI foi checada após comparação com sequências depositadas no GenBank, e o fragmento esperado era de aproximadamente 780 pb. Os DNAs foram utilizados como molde na PCR em uma mistura de reação de 25 µL, contendo 200 ng do DNA viral, 2,5 µL de tampão de PCR 10 X (50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl pH 8.3), 200 µM de cada dNTP, 30 mM tetramethylammonium chloride (TMAC) e 25 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador. Após um aquecimento de 95°C foi adicionada a mistura 1,5 unidades de Taq polimerase (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA). Juntamente a todos os conjuntos de reação foram feitas reações sem presença de qualquer DNA, como controle negativo. Como controles positivos foram utilizados os DNAs das amostras Cooper, BH54 e EVI-88. A PCR seguiu o seguinte protocolo: 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 50°C e 1 minuto a 72°C, seguido de uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Uma alíquota de 10 µL de cada amplificação foi separada em 1.5% (w/v) de gel agarose e após a eletroforese o gel foi corado com brometo de etídio (1 µg/mL) e visualizado em transiluminador ultravioleta.

Para a obtenção de enzimas de restrição que pudessem diferenciar os fragmentos obtidos na PCR em BoHV-1 e BoHV-5, foram realizadas análises *in silico* no Webcutter 2.0 (<http://www.firstmarket.com/cutter/cut2.html>). Após esta análise observou-se que a sequência de BoHV-1 (correspondente ao fragmento de PCR esperado) apresentava um sítio de restrição para a enzima *Sma*I na posição 304 que após digestão geraria fragmentos de aproximadamente 304 e 377 pb. Para o BoHV-5 foi observado que a sequência de PCR obtida não apresentava sítio de restrição para a enzima *Sma*I. Com estes experimentos teríamos a identificação e diferenciação entre BoHV-1 e BoHV-5. Todos os produtos de PCR obtidos sofreram digestão com enzima de restrição *Sma*I para a diferenciação das amostras de BHV-1 e BHV-5. Para a digestão foi utilizado 500 ng do produto amplificado e foi realizada de acordo com as instruções do fabricante (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA) para um volume final de 20 µL. Os produtos da digestão foram separados por eletroforese em gel de agarose 2% (w/v) que em seguida foi corado em brometo de etídeo (1 µg/ml).

Os fragmentos da amplificação da gB obtidos de al-

guns isolados foram purificados e clonados em vetor pGEM-T (Promega) e três clones de cada isolado foram sequenciados em ambas as direções pelo menos três vezes, utilizando-se o ET Dynamic Terminator for MegabACE (GE Healthcare). As sequências obtidas foram editadas e montadas automaticamente utilizando-se o programa CAP3²⁷. As sequências foram alinhadas com base na posição dos códons utilizando-se o CLUSTALW implementado no software Mega 3.1 e os alinhamentos foram checados e editados manualmente. A análise filogenética foi realizada utilizando-se o método Neighbor-joining (NJ) implementado no Mega 3.1 e as árvores foram enraizadas no ponto central, sendo feitas 1000 análises de bootstrap^{28,29}.

3. RESULTADOS

Quando as células MDBK foram inoculadas com os isolados e com o sobrenadante obtido de dois fetos abortados (amostras A2 e A7), foi observado efeito citopático caracterizado por células refringentes e arredondadas, formação de sincício e, por fim, a lise das células (FIGURA 1). Algumas das amostras clínicas não foram isoladas em cultura de célula (amostras A1, A3 –A6 e A8-A11) mesmo após três passagens. Depois disto as amostras A2 e A7 foram submetidas ao teste de neutralização, que se apresentou similar àquela apresentada pela amostra padrão Cooper, com títulos de 1:32 e 1:64, respectivamente.

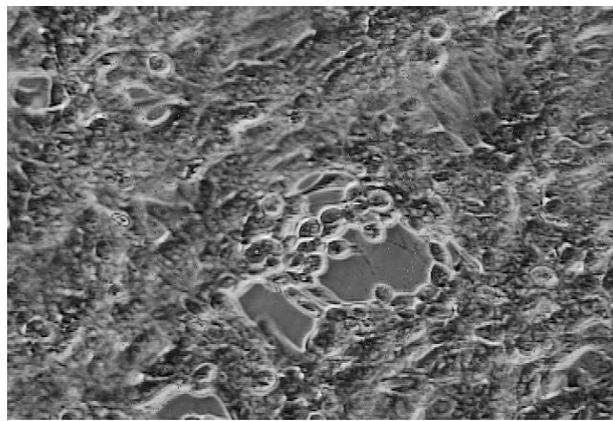


Figura 1. Efeito citopático observado após inoculação da amostra clínica A7 em células MDBK.

O protocolo de extração de DNA utilizando-se o método do NaOH deu bons resultados quando testados com as amostras usadas como referência: Cooper, BH54 e EVI-88. Estes resultados puderam ser observados tanto pela quantificação do DNA obtido quanto pelos resultados satisfatórios obtidos pela amplificação destes DNAs através da PCR, onde obteve-se o fragmento esperado de 780 pb. Devido a satisfatória padronização da extração de DNA, o mesmo método foi utilizado tanto para o restante dos isolados quanto para as amostras clínicas. Após

a extração estes DNAs foram utilizados para a realização da PCR que também foi padronizada utilizando-se as amostras de referências citadas acima.

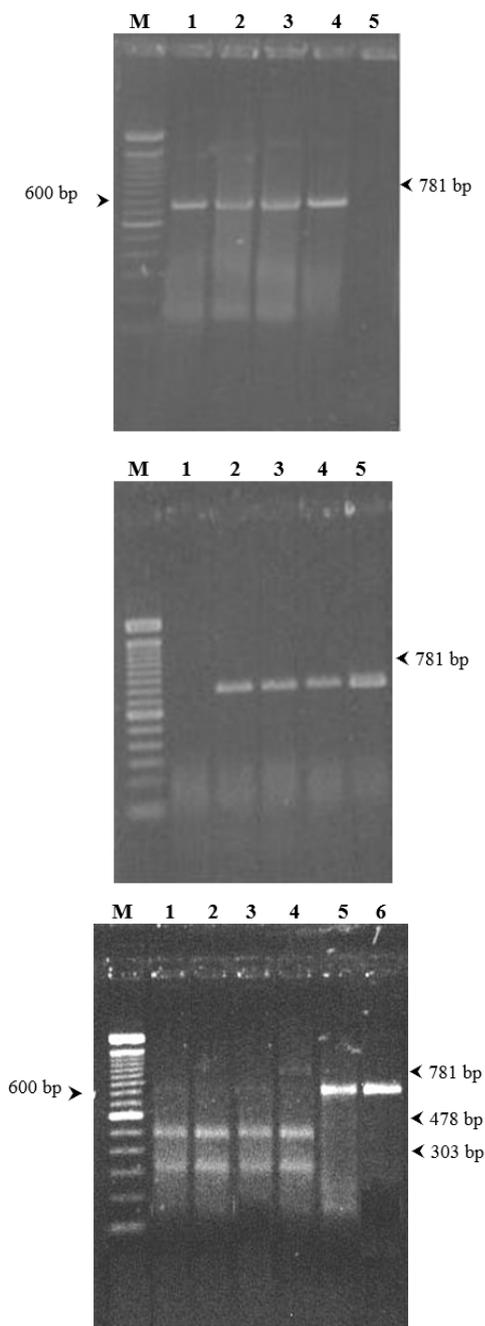


Figura 2. Teste PCR-RFLP para detecção e diferenciação do herpesvírus bovino -1 e-5. (A e B) Amplificação de PCR utilizando-se DNA de isolados e amostras clínicas de BoHV-1 originou um fragmento de aproximadamente 780 pb: A: M, padrão de peso molecular Ladder 100 pb; 1, amostra IBR 2113; 2, amostra LD 15; 3, amostra A2; 4, amostra A7; 5, controle negativo. B: M, padrão de peso molecular Ladder 100 pb; 1, controle negativo; 2, amostra LD30/2; 3, amostra BH 83; 4, amostra EVI 190; 5, amostra EVI 88. (C) Fragmentos da digestão com a enzima *Sma*I: padrão de peso molecular Ladder 100 pb; 1, amostra IBR 2113; 2, amostra LD 15; 3, amostra A2; 4, amostra A7; 5, amostra EVI 190; 6, amostra EVI 88.

A PCR utilizando-se os isolados descritos na tabela 1 e as amostras clínicas A2 e A7 (Figura 2a, 2b) originou um fragmento de aproximadamente 780 pb. Todas as PCRs negativas (sem amplificação) das amostras clínicas A1, A3-A6 e A8-A11 também foram negativas na detecção do viral em cultura de células. Quando os fragmentos dos isolados previamente caracterizados como BoHV-1 e das amostras clínicas A2 e A7 foram submetidos a digestão com a enzima *Sma*I, eles renderam os fragmentos de 304 e 477 pb (Figura 2c). Por outro lado, os fragmentos dos isolados previamente caracterizadas como BoHV-5 (EVI-190 e EVI-88) não apresentaram sítios de restrição para esta enzima (Figura 2c).

As sequências de nucleotídeos (nt) de algumas das amostras Brasileiras de BoHV estudados neste trabalho foram obtidas e depositadas no GenBank com os seguintes números de acesso: IBR 2113 (DQ006850), IBR 6813 (DQ006851), LD 15 (AY758382), LD, 19 (AY745875), LD 30/2 (DQ006856), LD 40/1 (JQ437896), LD 50/2 (DQ006857), BH 53 (DQ006853), BH 54 (AY330349), BH 80 (AY745877), BH 81 (DQ006854), EVI-190 (AY745876), EVI-88 (AY330350) e A7 (DQ006852).

As sequências de nt das amostras de BoHV-1 obtidas neste estudo foram comparadas uma com as outras e apresentaram similaridade entre 98 e 100%. Quando tais sequências foram comparadas com outras sequências de BoHV-1 depositadas no GenBank como Cooper (acesso GenBank: NC_001847), K22 (acesso GenBank:AF078725) e P8-2 (acesso GenBank:M23257), os valores de similaridade de nt variaram de 91 a 99%. Quando as sequências e nt das duas amostras de BoHV-5 obtidas neste estudo foram comparadas entre si observou-se uma similaridade de 99%. Quando a sequência de nt de tais amostras foram comparadas com outras amostras de nt de BoHV-5 depositadas no GenBank como N569 (acesso GenBank: AF078726) e SV507/99 (acesso GenBank: AY261359) a similaridade observada variou de 99 a 100%. Após a realização da árvore filogenética observou-se que todos os isolados de BoHV-1 incluindo a amostra clínica A7 foram agrupados num grande "cluster" formado apenas por amostras de BHV-1 enquanto as amostras de BoHV-5 foram agrupadas em outro cluster (dado não mostrado).

4. DISCUSSÃO

O BHV-1 está amplamente disseminado em todo Brasil^{30, 31}, contudo dados sobre a distribuição geográfica do BHV-5 são raros³². Isto provavelmente se deve à indisponibilidade de métodos de diagnóstico capazes de diferenciar as infecções causadas por BHV-1 e BHV-5 com rapidez necessária para a execução de estudos epidemiológicos³³. O diagnóstico das infecções causadas por herpesvírus é feito pelo isolamento do vírus em cultivo, no entanto esta técnica é trabalhosa e pode não ser

sensível para detectar um pequeno número de partículas virais¹⁶. A alternativa tem sido a amplificação do DNA do herpesvírus bovino através da PCR tanto de amostras isoladas em cultivo celular quanto de amostras clínicas^{34,35,36,37}.

Vários protocolos têm sido desenvolvidos para a extração de DNA como, por exemplo, a extração com fenol:clorofórmio²⁶ e aquela em que se utiliza Chelex-100³⁸. A primeira leva um período de tempo relativamente longo e envolve o uso de reagentes químicos tóxicos, mas produz um resultado consistente^{23,39}. A extração com Chelex-100 é uma técnica simples, rápida, não envolve o uso de solventes orgânicos tóxicos e é realizada em poucas etapas quando comparada com a extração de fenol:clorofórmio³⁸. Neste trabalho procurou-se estabelecer uma metodologia que além de ser simples, rápida e não tóxica fosse também financeiramente mais viável. A extração do DNA utilizando-se a metodologia do NaOH foi primeiramente descrita para a obtenção do DNA a partir de amostras clínicas obtidas através de swab bucal e como resultado os pesquisadores obtiveram uma alta taxa de sucesso para os testes de PCR e PCR multiplex^{26,40}. Por isto neste trabalho foi utilizado o método de extração com NaOH e como resultado obtivemos um DNA viável e em quantidade suficiente para realização da PCR. Nesse experimento a extração com NaOH foi utilizada tanto em amostras clínicas provenientes de feto como em isolados de cultivo celular obtendo-se um bom resultado em ambas extrações.

Um dos problemas dos estudos epidemiológicos dos herpesvírus bovinos 1 e 5 diz respeito ao a ausência de uma metodologia que permita o diagnóstico e a diferenciação destes vírus com a rapidez necessária para tais estudos. A PCR vem sendo proposta como ferramenta para tal, contudo, uma das desvantagens do uso da PCR para a diferenciação dos herpesvírus é o fato destes vírus poderem gerar fragmentos de mesmo tamanho devido a sua similaridade genética⁴¹. Este problema pode ser resolvido com a associação da PCR com outras técnicas, como a digestão dos fragmentos amplificados com enzimas de restrição. Alguns pesquisadores compararam a sensibilidade e especificidade do PCR com o isolamento viral, ambas em conjunto com a digestão com enzimas de restrição e afirmaram que o PCR em conjunto com a digestão pode ser uma prática alternativa para uma rápida identificação e diferenciação e pode ser tornar a primeira escolha de diagnóstico de rotina para os herpesvírus relacionados^{37,41,42}. Neste trabalho buscamos a padronização de uma PCR-RFLP para a detecção e diferenciação entre BHV 1 e 5. O par de OI usados na PCR, embora baseados na sequência do BHV-1, provaram ser igualmente eficientes para amplificação do DNA do BHV-5 e o fragmento gerado foi de mesmo tamanho para os dois vírus, não permitindo a diferenciação entre

estas amostras. Para diferenciar as amostras de BHV-1 e 5, os fragmentos amplificados foram digeridos com a enzima de restrição *Sma* I que foi escolhida com base na sequência das amostras Cooper (padrão de BHV-1) e N569 (padrão de BHV-5). Utilizando-se esta enzima os isolados de BHV-1 e 5 puderam ser diferenciados provando que a PCR – RFLP foi eficiente. Os sequenciamentos dos produtos de amplificação da PCR demonstraram a especificidade da amplificação de BoHV - 1 e BoHV – 5.

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

5. CONCLUSÃO

Um protocolo simples, confiável e barato, foi desenvolvido utilizando a extração do DNA com NaOH e PCR – RFLP. Este protocolo foi utilizado com sucesso para detectar e diferenciar o BHV - 1 do BHV - 5. Este protocolo pode ser usado para estudos de epidemiologia molecular e também como uma ferramenta de diagnóstico laboratorial promissória principalmente em laboratórios clínicos veterinários de rotina, especialmente em casos suspeitos de BoHV- 1, em casos de distúrbios neurológicos em bovinos.

6. FINANCIAMENTO

Maria E. Oliveira foi beneficiária de uma bolsa de doutorado da CAPES. Este trabalho foi financiado pelo CNPq concessão (474015 / 01-7).

REFERÊNCIAS

- [1] Roizman B, Desrosiers RC, Fleckenstein B, Lopez C, Minson AC, Studdert MJ. The family *Herpesviridae*: An update. Arch Virol 1992; 123(3-4):425-49.
- [2] Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA. Virus Taxonomy, Eighth Report of The International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier/Academic Press, London. Jun 2005.
- [3] Takiuchi E, Médici KC, Alfieri AA. Bovine herpesvirus type 1 abortions detected by a semi-nested PCR in Brazilian cattle herds. Res Vet Sci. 2005; 79(1): 85-88.
- [4] OIE. Manual of standards for diagnostic tests and vaccines. Chapter 2.4.13. Access September 2014 at http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.13_IBR_IPV.pdf
- [5] Murphy FA. The family Herperviridae: an update. Arch Virol, 1992; 123:425-99.

- [6] Studdert MJ. Bovine encephalitis herpesvirus. *Vet Rec.* 1989; 125(23):584.
- [7] Salvador SC, Lemos RAA, Riet-Correa F, Roehe PM, Osório AL. Meningoencefalite em bovinos causada por herpesvirus bovino-5 no Mato Grosso do Sul e São Paulo. *Pesq Bras.* 1998; 18(2):76-83.
- [8] Pedraza FJ, Alessi AC, Stancioli, EFB. Detection of bovine herpesvirus 5 (BoHV-5) in formalin-fixed, paraffin-embedded bovine brain by nested PCR in Colombian cattle. *Re Colom Cienc Pecu.* 2010; 23 (3).
- [9] Carrillo BJ, Ambrogi A, Schudel AA, Vazquez M, Dahme E, Pospischil A. Meningoencephalitis caused by IBR virus in calves in Argentina. *Zen Vet Med B.* 1983; 30(1-10):327-32.
- [10] Schudel AA, Carrillo BJ, Wyler R, Metzler AE. Infection of calves with antigenic variants of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) and neurological disease. *J Vet Med B.* 1986; 33(4):303-10.
- [11] Favier PA, Marin MS, Pérez SE. Role of bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) in diseases of cattle. Recent findings on BoHV-5 association with genital disease. *Open Vet J.* 2012; 2:46-53.
- [12] Silva MS, Brum MCS, Loreto ELS, Weiblen R, Flores EF. Molecular and antigenic characterization of Brazilian bovine herpesvirus type 1 isolates recovered from the brain of cattle with neurological disease. *V Res.* 2007; 129(2): 191-9.
- [13] Oliveira ME, Castro RT, Leite RC, Resende M. A natural case of bovine abortion caused by bovine herpesvirus 5. *Virus Rev Res.* 2001; 6:119.
- [14] Afonso DAF, Ortega LS, Redondo RAF, Trindade GS, Barbosa-Stancioli EF. Characterization of a field bovine herpesvirus samples using random amplified polymorphic DNA (RAPD). *J. Virol. Meth.* 2007; 140(1-2):200-5.
- [15] Maidana SS, Ladelfa MF, Pérez SE, Lomónaco PM, Médico MPD, Odeón A, et al. Characterization of BoHV-5 field strains circulation and report of transient specific subtype of bovine herpesvirus 5 in Argentina. *BMC Vet Res.* 2011; 7: 1-8.
- [16] Bielanski A, Loewen K.G, Hare WCD. Inactivation of bovine herpesvirus-1 form *in vitro* infected bovine semen. *Theriogenol.* 1988; 30:649-57.
- [17] Varela APM, Holz CL, Cibulski SP, Teixeira TF, Antunes DA, Franco AC, *et al.* Neutralizing antibodies to bovine herpesvirus types 1 (BoHV-1) and 5 (BoHV-5) and its subtypes. *Vet Microbiol.* 2010; 142(3-4):254-60.
- [18] Oliveira MT, Campos FS, Dias MM, Velho, FA, Freneau GE, Brito WMED, et al. Detection of bovine herpesvirus 1 and 5 in semen from Brazilian bulls. *Theriogenol.* 2011; 75: 1139–45.
- [19] Claus MP, Alfieri AF, Folgueras-Flatschart AV, Wosiacki SR, Médici KC, Alfieri AA. Rapid detection and differentiation of bovine herpesvirus 1 and 5 glycoprotein C gene in clinical specimens by multiplex-PCR. *J Virol Meth.* 2005; 128(1-3):183-8.
- [20] Oliveira ME, Resende M, Barros PP, Kalapothakis E. Studies of biological and genomic relationships between two Brazilian isolates of bovine herpesvirus 1 and 5. *Virus Rev Res.* 2003; 8(1-2):16-28.
- [21] D'Arce RCF, Almeida RS, Sliva TC, Franco AC, Spilki F, Roehe PM, et al. Restriction endonucleases and monoclonal antibodies analysis of Brazilian isolates of bovine herpesvirus types 1 and 5. *Vet Microbiol.* 2002; 88:315-24.
- [22] Diallo IS, Corney BG, Rodwell BJ. Detection and differentiation of bovine herpesvirus 1 and 5 using a multiplex real-time polymerase chain reaction. *J Virol Methods.* 2011; 175(1): 46-52.
- [23] Kok T, Wati S, Bayly B, Devonshire-Gill D, Higgins G. Comparison of six nucleic acid extraction methods for detection of viral DNA or RNA sequences in four different non-serum specimen types. *J Clin Virol.* 2000; 16(1):59-63.
- [24] National Research Council (US) Committee on Prudent Practices in the Laboratory. *Prudent Practices in the Laboratory: Handling and Management of Chemical Hazards: Updated Version.* Washington (DC): National Academies Press (US). 2011; 6. Working with Chemicals. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK55872>
- [25] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning. A laboratory manual.* Ed. C. Nolan Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. 1989; 545.
- [26] Richards B, Skoletsy J, Shuber AP, Balfour R, Stern RC, Dorkin HL, Parad RB, Witt D, Klinger KW. Multiplex PCR amplification from the CFTR gene using DNA prepared from buccal brushes/swabs. *Hum Mol Genet.* 1993; 2(2):159-63.
- [27] Huang X, Madan A. CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Res.* 1999; 9(9):868-77.
- [28] Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. Clustal W. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Res.* 1994; 22(22):4673-80.
- [29] Kumar S, Tamura K, Nei M (2004). MEGA3: Integrated software for Molecular. Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform.* 2004; 5(2):150-63.
- [30] Médici KC, Alfieri AA, Alfieri AF. Prevalência de anticorpos neutralizantes contra o herpesvírus bovino tipo 1, decorrentes de infecção natural, em rebanhos com distúrbios reprodutivos. *Ci Rural.* 2000; 30(2):347-50.
- [31] Vieira S, Brito WMED, Souza WJ, Alfaia BT, Linhares DCL. Anticorpos para o herpesvírus bovino 1 (BHV-1) em bovinos do estado de Goiás. *Ci Anim Bras.* 2003; 4(2):131-7.
- [32] Petzhold SA, Rickziegel PE, Prado JAP, Teixeira JC, Wald V., Spilki FR, Roehe PM. Neutralizing antibodies to BHV-1 and 5 induced by an experimental, oil adjuvanted, BHV-1 vaccine. *Braz J Vet Res Anim Sci.* 2001; 38(4):184-7.
- [33] Roehe PM. Atualização no diagnóstico e controle de infecções por herpesvírus bovinos tipos 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5). *Biol.* 1997; 59(1):27-32.
- [34] Maidana SS, Morano CD, Cianfrini D, Campos FS, Roehe PM, Siedler B, et al. Multiplex PCR followed by restriction length polymorphism analysis for the subtyping of bovine herpesvirus 5 isolates. *BMC Vet Res.* 2013; 9:1-7.
- [35] Solana A, Da Silva N, Escarmis C, Castro JMA. Variabilidad genómica entre cepas del herpes bovino tipo I aisladas de casos clínicos de IBR. *Invest. Agron. Prod. Sanid. Anim.* 2000; 15(1-2): 59-67.
- [36] Santurde G, Da Silva N, Villares R, Tabares E, Solana A, Bautista JM, Castro JM. Rapid and high sensitivity test for

- direct detection of bovine herpesvirus-1 genome in clinical samples. *Vet Microbiol.* 1996; 49(1-2):81-92.
- [37]Ros C, Belák S. Characterization of the glycoprotein B gene from ruminant alphaherpesviruses. *Virus Gen.* 2002; 24 (2):99-105.
- [38]Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotech.* 1991; 10(4):506-13.
- [39]Budowle B, Baechtel FS. Modifications to improve the effectiveness of restriction fragment length polymorphism typing. *Appl Theor Electrophor.* 1990; 1:181-7.
- [40]Walker AH, Najarian D, White DL, Jaffe JF, Kanetsky PA, Rebbeck TR. Collection of genomic DNA by buccal swabs for polymerase chain reaction-based biomarker assays. *Environ Health Perspect.* 1999; 107(7):517-20.
- [41]Moore S, Gunn M, Walls DA. A rapid and sensitive PCR-based diagnostic assay to detect bovine herpesvirus 1 in routine diagnostic submissions. *Vet Microbiol.* 2000; 75(2):145-53.
- [42]Lyaku JRS, Vilcek S, Nettleton PF, Marsden HS. A comparison of serological relationships among five ruminant alphaherpesviruses by ELISA. *Arch Virol.* 1992; 124(3-4): 333-41.

