

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

BC/43098

IB/81584

INSTITUTO DE BIOLOGIA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Regina Celia Freitas D'Arce*



**ESTUDO DAS DIFERENÇAS GENÔMICAS ENTRE
AMOSTRAS DE HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 1 E
TIPO 5 ISOLADAS NO BRASIL ATRAVÉS DA
ANÁLISE COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato(a)
Regina Celia Freitas D'Arce
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia
para obtenção do título de Mestre em
Genética e Biologia Molecular na Área de
Microbiologia

Orientadora: Prof. Dra. Clarice Weis Arns
Co-Orientador: Prof. Dr. Paulo Michel Roehe

2000

* Médica Veterinária



UNIDADE IB/85584

N.º CHAMADA: 71 UNICAMP

D243 e

V. _____ Ex. _____

TOMBO BC/ 43093

PROC. 96-278100

C ☐ D ☒

PREÇO R\$ 22,00

DATA 24/09/00

N.º CPD _____

CM-00153365-5

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

D'Arce, Regina Celia Freitas

D243e

Estudo das diferenças genômicas entre amostras de herpesvírus bovino tipo 1 e tipo 5 isoladas no Brasil através da análise com enzimas de restrição/Regina Celia Freitas D'Arce. --- Campinas, SP. [s.n.], 2000.

69f. illus.

Orientadora: Clarice Weis Arns

Co-Orientador: Paulo Michel Roehe

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

1. Virologia. 2. Biologia molecular. 3.

I. Arns, Clarice Weis. II. Roehe, Paulo Michel. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título

Data da Defesa: 02/10/2000

Banca Examinadora



Prof. Dra. Clarice Weis Arns



Prof. Dr. Aramis Augusto Pinto



Prof. Dra. Edviges Maristela Pituco

Suplente

Prof. Dr. Domingos da Silva Leite

"Não basta ter belos sonhos para realizá-los. Mas ninguém realiza grandes obras se não for capaz de sonhar grande. Podemos mudar o nosso destino, se nos dedicarmos à luta pela realização de nossos ideais.

É preciso sonhar, mas com a condição de crer em nosso sonho; de examinar com atenção a vida real; de confrontar nossa observação com o nosso sonho; de realizar escrupulosamente nossa fantasia.

Sonhos, acredite neles!" (Lenin)

Aos
meus queridos pais e irmãos,
Belmiro e Celia, Zé, Bia e Beto,
dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado força, saúde e perseverança para concluir este trabalho.

À Profª. Dra. Clarice Weis Arns, pela oportunidade, confiança, orientação, paciência, carinho e amizade, e pela grata convivência no Mestrado, dentro e fora do laboratório.

Ao Prof. Dr. Paulo Michel Roehe, pela orientação no aperfeiçoamento e co-orientação neste trabalho, e também pela amizade, solicitude e ensinamentos a mim dedicados.

Ao Prof. Dr. Hélio Langoni, pelos primeiros ensinamentos em Microbiologia, amizade e incentivo profissional desde minha graduação.

Aos professores: Dr. Paulo Michel Roehe, Dra. Edviges Maristela Pituco, Dr. Rudi Weiblen, Dr. Amauri Alfieri, e Dra. Valéria Moojen, pelas amostras cedidas para este estudo.

Aos colegas e amigos da XXIX turma de Medicina Veterinária, UNESP, Botucatu, e também aos professores e residentes, pela amizade eterna e pelos maravilhosos anos de convivência na graduação, os quais nunca serão esquecidos.

Aos colegas do CPVDF, em especial aos amigos da Equipe de Virologia, pela amizade, paciência e auxílio nos experimentos desenvolvidos em meu aperfeiçoamento e mestrado.

Às "gurias", colegas de trabalho no laboratório e amigas para o que der e vier!

À Lia e Renatinha, pela ajuda imprescindível na confecção desta dissertação.

Aos funcionários da Equipe de Virologia do CPVDF e do Laboratório de Virologia Animal, DMI, IB, UNICAMP, pelo enorme auxílio na realização deste trabalho.

Aos colegas de pós-graduação e professores do Departamento de Microbiologia e Imunologia, IB, UNICAMP, que pela amizade e ensinamentos contribuíram para o nascimento desta tese.

Às colegas de casa Renata, Sílvia, Guta e Simone e posteriormente Patrícia e Suelen em Porto Alegre, e Rosiani e Juceley em Campinas, pela paciência, amizade e agradável convivência.

Á Elizabeth Wanderico e Devanir Merengué, pelo apoio e incentivo nos momentos difíceis.

A D. Fanny e família, por se tornarem minha família botucatuense!

À minha prima Vilma e família, pela dedicação, compreensão e acolhimento em Porto Alegre.

Aos parentes "campineiros" Zé, Rose, Tia Marina, Tio Milton, Renato e Cristina, pelo total apoio e ajuda em tudo que precisei.

Aos meus pais e irmãos, pela confiança e apoio a mim dedicados, e por serem as pessoas que mais amo nesta vida!

A todos meus amigos, estejam em Prudente, Botucatu, Campinas, Porto Alegre ou onde estiverem: vocês moram no meu coração!

Enfim, a todos que direta ou indiretamente participaram desta conquista:

MUITO OBRIGADA!!!!

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Virologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da UNICAMP, Campinas, São Paulo, em colaboração com o Laboratório de Virologia do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde - UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, e a Equipe de Virologia do Centro de Pesquisa Veterinária "Desidério Finamor", Eldorado do Sul, Rio Grande do Sul.

SUMÁRIO

1. Revisão Bibliográfica	
1.1. Introdução	14
1.2. Patogenia e sinais clínicos	15
1.3. Latência	17
1.4. Epidemiologia	18
1.5. Análise do genoma viral com enzimas de restrição (REA)	21
1.6. Subtipos do BHV-1 e BHV-5	22
2. Objetivos	26
3. Material e Métodos	
3.1. Cultivo Celular	27
3.2. Amostras virais	27
3.3. Estoque viral	30
3.4. Determinação do título infectante viral	30
3.5. Propagação e concentração viral	30
3.6. Extração do DNA viral	31
3.7. Visualização do DNA viral	33
3.8. Análise do DNA viral com enzimas de restrição	33
3.9. Visualização dos resultados de REA	34
4. Resultados	
4.1. Obtenção e titulação das amostras virais	35
4.2. Concentração viral	35
4.3. Extração e visualização do DNA viral	36
4.4. Análise do DNA viral com enzimas de restrição	36
5. Discussão	47
6. Conclusões	55
7. Referências	56

LISTA DE TABELAS E ESQUEMAS

Tabela 1: Amostras de BHV-1 e BHV-5 utilizadas nos experimentos	29
Tabela 2: Classificação das amostras de BHV-1 e BHV-5, segundo os perfis de restrição enzimática apresentado	46
Esquema 1: Diferenças entre os perfis de restrição enzimática obtidos com as enzimas <i>Hind</i> III e <i>Bst</i> EII, para os subtipos de BHV-1 e BHV-5	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Comparação de dos protocolos 1 e 2 de extração do DNA viral, visualizados após corrida em gel de agarose 0,6%	38
Figura 2 : Comparação dos protocolos de separação de proteínas e DNA viral, visualizados após corrida em gel de agarose 0,6%	38
Figura 3 : Comparação dos protocolos ID-DLO e kit comercial Qiagen® de extração do DNA viral, visualizados após corrida em gel de agarose 0,6%	39
Figura 4: Determinação do tempo de incubação da reação de REA	39
Figura 5: Perfis de restrição enzimática de amostras de BHV-1 e BHV-5 analisadas após eletroforese em gel de agarose 0,6%	41
Figura 6: Perfis de restrição enzimática de amostras BHV-5 analisadas após eletroforese em gel de agarose 0,6%	41
Figura 7: Diferenças encontradas nos perfis de restrição enzimática das amostras de BHV-1 clivadas com <i>HindIII</i> analisadas após eletroforese em gel de agarose 0,6%	43
Figura 8: Diferenças encontradas nos perfis de restrição enzimática entre os subtipos de BHV-5b e BHV-5a	43
Figura 9: Perfis de restrição enzimática de amostras de BHV-5 analisadas após eletroforese em gel de agarose 0,6%	45
Figura 10: Perfis de restrição enzimática de amostras de BHV-5 quando clivadas com a enzima <i>BstEII</i> , analisadas após eletroforese em gel de agarose 0,6%	45

ABSTRACT

D'Arce, R.C.F. (2000) Estudo das diferenças genômicas entre amostras de Herpesvírus Bovino tipo 1 e tipo 5 isoladas no Brasil pela análise enzimas de restrição. Tese de Mestrado, Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biologia, UNICAMP, República Federativa do Brasil.

Keywords: virology, bovine herpesvirus, restriction analysis, subtypes, molecular biology.

Ten Brazilian isolates and two standard strains of bovine herpesviruses (BHV) were examined by restriction endonuclease analysis (REA). Isolates were multiplied in MDBK cells and viral DNA was extracted and cleaved with the enzymes *Bam*HI, *Bst*EII, *Eco*RI, *Hind*III and *Pst*I. DNA fragments were examined in agarose gels and visualized by ethidium bromide staining. One isolate from a case of rhinotracheitis could be assigned to type 1.2a, usually associated to cases of pustular vulvovaginitis. Another Brazilian respiratory isolate could be assigned to type 1.1, like *Los Angeles* standard strain. An isolate from semen of a clinically healthy bull displayed a 1.2b profile. Preliminary results suggest that the relationship between REA profiles and clinical picture be not clear-cut. On the other hand, all isolates obtained from cases of encephalitis displayed REA profiles similar to BHV-5 patterns described previously. However, BHV-5 isolates differed in their *Bst*EII profile, where five out seven Brazilian samples were similar to the Australian BHV-5 strain (BHV-5a) than to the Argentinean A663 (BHV-5b). Curiously, two encephalitogenic autochthonous samples showed a *Bst*EII profile different of both standards strains of BHV-5. Restriction enzyme profiles obtained with the enzymes *Bst*EII and *Hind*III were sufficient for the differentiation between BHV-1 and BHV-5 subtypes.

RESUMO

Através da análise genômica com endonucleases de restrição objetivou-se a comparação de amostras brasileiras de Herpesvírus Bovino tipo 1 (BHV-1), vírus da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR)/ Vulvovaginite Pustular Infecciosa (IPV), e de Herpesvírus Bovino tipo 5 (BHV-5), causador da Encefalite Herpética em bovinos, frente às cepas de referência encontradas na literatura. Todas as amostras virais foram multiplicadas em células da linhagem MDBK (Madin-Darby bovine kidney). O DNA genômico viral de cada cepa foi extraído e clivado pelas endonucleases de restrição *Bam*HI, *Bst*EII, *Eco*RI, *Hind*III e *Pst*I. Os fragmentos obtidos foram visualizados após eletroforese em gel de agarose e coloração por brometo de etídio, sob transiluminação ultravioleta. O perfil genômico da amostra de BHV-1, isolada de um caso de IBR, obtido com a enzima *Hind*III indicou a similaridade dessa amostra com o subtipo 1.2a, comumente relacionado a casos de IPV. Já a amostra isolada de sêmen apresentou um perfil compatível ao subtipo 1.2b, quando clivada com essa mesma enzima. A amostra respiratória de BHV-1 teve seu perfil similar ao subtipo 1.1, como da amostra de referência *Los Angeles*. Para as cepas encefalitogênicas, todos os perfis de restrição enzimática encontrados se mostraram compatíveis com os perfis de BHV-5 descritos na literatura, exceto os obtidos com a enzima *Bst*EII. Cinco amostras encefalitogênicas, quando clivadas com a enzima *Bst*EII apresentaram perfil similar à cepa australiana *N569*, tida como referência de BHV-5a, diferindo da amostra padrão argentina *A663*, considerada BHV-5b. Entretanto, duas amostras de BHV-5 apresentaram um perfil que difere desses dois subtipos. Os perfis de restrição enzimática obtidos com as enzimas *Bst*EII e *Hind*III foram suficientes para a diferenciação entre os tipos e subtipos de BHV-1 e BHV-5.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHV-1 - Herpesvírus Bovino tipo 1

BHV-5 - Herpesvírus Bovino tipo 5

CPVDF- Centro de Pesquisa Veterinária "Desidério Finamor", Eldorado do Sul, RS

CVA- Central Veterinary Agency, Weybridge, Reino Unido

DNA - Ácido desoxiribonucleico

DICC_{50%} - doses infectantes para 50% dos cultivos celulares

ECP - Efeito citopatogênico

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

IB-SP - Instituto Biológico de São Paulo, SP

IBR - Rinotraqueíte Infecciosa Bovina

ID-DLO - Institute for Animal Science and Health, Lelystad, Holanda

IPV - Vulvovaginite Pustular Infecciosa

INTA - Instituto de Tecnología Agropecuaria, Castelar, Argentina

Kb - pares de bases x 10³

MDBK - Madin-Darby bovine kidney

REA - análise com enzimas de restrição

RFLP - restriction fragment length polymorphism

SFB - soro fetal bovino

TE - Tampão Tris-EDTA

UEL - Universidade Estadual de Londrina, PR

UFMS - Universidade Federal de Santa Maria, RS

UFRGS - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS

UNICAMP - Universidade Estadual de Campinas, SP

1. INTRODUÇÃO

Os Herpesvírus Bovino tipo 1 (BHV-1) e Herpesvírus Bovino tipo 5 (BHV-5), pertencem à família *Herpesviridae*, sub-família *Alphaherpesvirinae*, gênero *Varicellovirus* (Fenner *et al.*, 1993). O BHV-1 é o agente etiológico da rinotraqueíte infecciosa bovina e vulvovaginite pustular infecciosa (IBR /IPV), enquanto que o BHV-5 é responsável pela encefalite herpética dos bovinos (Studdert, 1990; Roizman *et al.*, 1992).

Os herpesvírus apresentam seus vírions envelopados, com capsídeo icosaédrico, com 130 a 200 nm de diâmetro. São sensíveis ao éter e outros solventes lipídicos, devido à composição lipoproteica de seu envelope, como também a extremos de pH (Porterfield, 1989). Seu genoma corresponde a uma única molécula linear em dupla fita de DNA de cerca de 140 Kb, com uma composição de G+C de 72%, confirmando sua estabilidade. Este DNA pode ser dividido em um segmento único longo (UL) de 102 a 104 Kb, e um segmento único curto (US) de aproximadamente 11 Kb. O segmento US possui duas regiões repetidas em suas extremidades, de cerca de 24 Kb, denominadas região repetida interna (IR) e região repetida terminal (TR). Essa estrutura genômica é comum aos integrantes do grupo D dos herpesvírus, entre eles o BHV-1 e BHV-5 (Roizman *et al.*, 1992).

1.1. Patogenia e sinais clínicos

A infecção natural pelo BHV-1 ocorre através da entrada do vírus na mucosa do trato respiratório, geralmente por aerossóis ou por contato direto com as secreções nasais infectadas. Já a infecção genital invariavelmente ocorre pelo contato direto ou através do sêmen contaminado. A transmissão indireta pode ocorrer via fômites contaminados, como equipamentos de ordenha mecânica, água e alimentos (Tikoo *et al.*, 1995; Engels & Ackermann, 1996).

As infecções pelos herpesvírus bovinos podem se apresentar desde formas subclínicas até severas, culminando no óbito do animal. A infecção pode se restringir a áreas do trato genital ou respiratório superior, bem como se disseminar por viremia (Engels & Ackermann, 1996).

Os membros da sub-família *Alphaherpesvirinae* caracterizam-se pela rápida replicação nos sítios de entrada, levando à lise das células infectadas. Após 2-3 dias de exposição ao agente, os animais desenvolvem febre com subsequente taquipnéia, inapetência e queda na produção leiteira (Kahrs, 1977; Tikoo *et al.*, 1995). Altos títulos virais são produzidos e excretados nesse estágio inicial da infecção. Observa-se evidentes placas de necrose focal na mucosa nasal, geralmente acompanhadas de corrimento seroso nasal e ocular, e frequentemente conjuntivite (Gibbs & Rweyemamu, 1977). A severidade da doença clínica parece estar associada com a cepa viral, estado imunológico e idade do animal e fatores de stress ambiental. Esses fatores podem culminar em complicações por infecção bacteriana secundária, levando à pneumonia (Babiuk *et al.*, 1988). O BHV-1 é considerado um dos mais importantes agentes iniciadores do complexo respiratório bovino, também chamado de "febre dos transportes" (Yates, 1982).

O BHV-1 tem a capacidade de infectar monócitos e se adsorver a linfócitos, assim como outros alfa herpesvírus, o que corresponde a um valioso mecanismo na disseminação

sistêmica (Forman & Babiuk, 1982; Nyaga & MacKecher, 1979). Essa disseminação pode levar ao aborto, que aparece tanto em infecções clínicas como subclínicas, bem como o aparecimento de quadros digestivos, como enterite (Engels & Ackermann, 1996; Tikoo *et al.*, 1995).

O BHV-1 é considerado a causa mais importante de abortos a vírus nos bovinos, comumente ocorrendo sob a forma epidêmica (Ackermann *et al.*, 1990). Em condições naturais a campo, a taxa de abortos situa-se em cerca de 25% (Kahrs, 1977; Weiblen, 1992). Quando as fêmeas bovinas são infectadas no início da gestação, o vírus pode levar à morte embrionária, aumentando o intervalo entre partos nos rebanhos bovinos, o que reflete em prejuízos econômicos (Miller, 1991).

Nos machos, as infecções pelo BHV-1 podem acarretar o aparecimento de balanopostite pustular, sendo o vírus eliminado pelo sêmen, fator esse de suma importância na disseminação da enfermidade (Ackermann *et al.*, 1990; Gibbs & Rweyemamu, 1977). No entanto, o vírus é frequentemente encontrado em sêmen de touros clinicamente normais, podendo ser transmitido por monta natural ou inseminação artificial (Ackermann *et al.*, 1990; Chung *et al.*, 1993; Masri *et al.*, 1996; Van Oirschot *et al.*, 1993; Wagter *et al.*, 1996; Xia *et al.*, 1995; Yason *et al.*, 1995).

Quanto à patogenia do BHV-5 muitos pontos permanecem não esclarecidos, uma vez que o esse tipo viral deixou de ser considerado um subtipo do BHV-1 a relativamente pouco tempo (Roizman *et al.*, 1992). Sabe-se que o BHV-5 é capaz de replicar-se em neurônios e células da glia, invadindo o sistema nervoso central e causando meningoencefalites e/ou desordens neurológicas (Engels & Ackermann, 1996).

O BHV-5 é responsável por meningoencefalites fatais em bovinos de até 8 meses de idade (Bulach & Studdert, 1990; French, 1962b) e, ocasionalmente, até 60 meses de idade (Salvador *et al.*, 1998). Os sinais clínicos da enfermidade incluem febre, depressão, tremores, bruxismo, nistagmo, andar em círculos, opistótono, incoordenação, perda do equilíbrio,

convulsões e movimentos de pedalagem (Bagust & Clark, 1972; Carrillo *et al.*, 1983; Eugster *et al.*, 1974; Johnston & McGavin, 1962; Schudel *et al.*, 1986). A mortalidade ocorre potencialmente em 100% dos casos (Eugster *et al.*, 1974, Carrillo *et al.*, 1983).

A neuropatogenicidade do BHV-5 tem sido estudada utilizando como modelos experimentais coelhos (Chowdhury *et al.*, 2000; Meyer *et al.*, 1996; Silva *et al.*, 1999), e ovinos (Silva *et al.*, 1998). Estes modelos experimentais mostraram a reprodutibilidade da doença clínica dos bovinos, desenvolvendo meningoencefalite após inoculação do BHV-5 por via intranasal. Os animais também eliminaram o vírus através de secreções nasais, sendo fonte de contaminação para animais sentinela (Silva *et al.*, 1998). Recentemente, infecções experimentais têm confirmado a susceptibilidade de ovinos à infecção aguda e latente pelo BHV-1 (Guliani & Sharma, 1995; Hage *et al.*, 1997; Shankar & Yadav, 1987). Este fato chama a atenção para a possível participação dos ovinos como reservatórios das enfermidades a campo (Silva *et al.*, 1998).

O BHV-1 também já foi isolado de casos de encefalite em bovinos (d'Offay *et al.*, 1993; Horiuchi *et al.*, 1995). Contudo, em um estudo comparativo de inoculação do BHV-1 e BHV-5 em coelhos, somente obteve-se reprodutibilidade da doença nervosa nos animais inoculados com BHV-5 (Meyer *et al.*, 1996).

1.2. Latência

Todos os alfa herpesvírus são capazes de se manter latentes em gânglios nervosos, sendo reativados principalmente em situações de estresse (Engels *et al.*, 1986; Fenner *et al.*, 1993). Durante sua replicação inicial na porta de entrada, os herpesvírus podem penetrar nos axônios das células nervosas locais. Então, através do transporte intra-axonal, os vírus alcançam o corpo celular dos neurônios nos gânglios regionais, onde a latência é estabelecida

(Engels & Ackermann, 1996). Podem ser detectadas cerca de 20 a 100 cópias do genoma viral nos núcleos neuronais, onde permanecem de forma episomal (Fenner *et al.*, 1993).

O mecanismo de latência do BHV-1 foi confirmado por Ackermann *et al.* (1982), através da detecção do DNA viral por hibridização *in situ* no gânglio trigêmeo, em bovinos infectados por via respiratória. A reativação da infecção foi obtida com a indução de imunossupressão após a administração de dexametazona aos animais. Em um estudo realizado por Ackermann & Wyler (1984), a partir de animais infectados por via intravaginal com uma cepa de BHV-1 isolada de um caso de IPV, foi possível a detecção do DNA viral no gânglio sacral, bem como a recrudescência da disseminação viral após o tratamento com dexametazona.

A capacidade do BHV-5 de estabelecer latência e reativação foi demonstrada por Silva *et al.* (1998), através da inoculação em ovinos, e detecção do vírus em secreções nasais após tratamento com dexametazona. Ashbaugh *et al.* (1997) detectaram BHV-1 e BHV-5 no gânglio trigêmeo de bovinos inoculados experimentalmente, em estudos paralelos, através da técnica de nested PCR.

Esse mecanismo de latência e reativação do vírus se torna, em grande parte, responsável pela perpetuação e transmissão do agente na população bovina (Tikoo *et al.*, 1995).

1.3. Epidemiologia

O BHV-1 encontra-se difundido em praticamente todo o mundo (Kahrs, 1977; Weiblen *et al.*, 1992b). A IPV foi pela primeira vez descrita na Europa em 1841, em um caso de

exantema coital (Greig *et al.*, 1958). Já a IBR teve seu primeiro relato nos EUA em 1950 (Miller, 1955).

O primeiro caso de IBR na Europa foi descrito em 1960, sendo provavelmente originado nos EUA (Rijsewijk *et al.*, 1999). Na Holanda e na Bélgica, 60-90% das propriedades acusam pelo menos um animal soropositivo (Boelaert *et al.*, 2000). Já na França, detectou-se uma prevalência de 20%, variando entre 30-50% na Alemanha, e 50% na Inglaterra. Países como Suíça, Áustria, Dinamarca, Noruega, Suécia e Finlândia são considerados livres ou potencialmente livres do agente. As perdas econômicas associadas com infecções pelo BHV-1 foram estimadas em 27 milhões de dólares por ano na Holanda (Van Oirschot, 1998).

Na África, mais especificamente na Argélia, encontrou-se uma prevalência para o BHV-1 de 39,8% (Achour, 1996). Quanto aos países da América do Sul, na Argentina os inquéritos sorológicos tiveram uma positividade variando de 15-75% (Galarza & Periolo, 1983), sendo de 41% no Chile (Riedmann *et al.*, 1996), 14% na Venezuela (Obando *et al.*, 1999), 13-50% na Colômbia (Griffiths *et al.*, 1982) e entre 45-48% no Uruguai (Maisonave, 1998).

No Brasil, a prevalência da infecção pelo BHV-1 nos rebanhos bovinos encontra-se em torno de 30% e estima-se que 50 a 70% das propriedades apresentam animais sorologicamente positivos (Anunciação *et al.*, 1989; Ravazzolo *et al.*, 1989; Rosa *et al.*, 1992; Pituco *et al.*, 1993; De Stefano *et al.*, 1993; Lovato *et al.*, 1995; Vidor *et al.*, 1995).

O BHV-1 foi isolado pela primeira vez no Brasil em 1978, na Bahia (Alice, 1978) e também no Estado de São Paulo (Mueller *et al.*, 1978). Posteriormente também foi obtido o isolamento de amostras em Minas Gerais (Galvão *et al.*, 1986), Rio de Janeiro (Nogueira *et*

al., 1986), Rio Grande do Sul (Weiblen *et al.*, 1996) e Mato Grosso do Sul (Salvador *et al.*, 1998).

Quanto ao BHV-5, sua prevalência na Europa ainda não está bem definida, visto que a enfermidade neurológica severa não é frequentemente relatada (Van Oirschot, 1998). O mesmo ocorre nos EUA, onde uma possível explicação para esse fato seriam os programas de vacinação rotineiros contra o BHV-1 aplicados nesses países, o que poderia mascarar a expressão clínica das infecções pelo BHV-5 (Osório, 1998). Essa proteção cruzada provavelmente ocorre devido à grande proporção de epítomos comuns (soroneutralização cruzada) que pode ser observada entre esses dois tipos virais (Bratanich *et al.*, 1991).

Apesar disso, casos de encefalite pelo BHV já foram observados em bovinos nos EUA (Eugster *et al.*, 1974; d'Offay *et al.*, 1993), Argentina (Carrillo *et al.*, 1983; Pidone *et al.*, 1999), Austrália (French, 1962a; Studdert, 1990), Itália (Moreti *et al.*, 1964), Hungria (Bartha *et al.*, 1969; Magyar *et al.*, 1993) e Japão (Horiuchi *et al.*, 1995), confirmado pelo isolamento viral e análise com enzimas de restrição, na maioria desses países.

A prevalência das infecções pelo BHV-5 no Brasil ainda é uma incógnita, uma vez que não existem testes sorológicos capazes de diferenciar entre infecções por BHV-5 ou BHV-1, e não é possível chegar a um diagnóstico conclusivo baseado apenas na sintomatologia clínica. É bastante provável que uma proporção ainda desconhecida dos animais positivos para BHV-5, tenham seu diagnóstico clínico confundido com outras enfermidades de acometimento neurológico, como raiva, botulismo, polioencefalomalácia ou intoxicação por NaCl (Salvador *et al.*, 1998). Foram observados casos de encefalite herpética em bovinos no Brasil, nos Estados de São Paulo, Pará, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro e Mato Grosso do Sul, com isolamento do BHV-5 a partir do cérebro, após necrópsia dos animais acometidos (Pituco, comunicação pessoal, 1998; Salvador *et al.*, 1998; Roehe *et al.*, 1997; Weiblen *et al.*, 1989, 1996).

1.4. Análise do genoma viral com enzimas de restrição (REA)

As enzimas de restrição correspondem a ferramentas essenciais utilizadas na biologia molecular para a manipulação do DNA (Sambrook *et al.*, 1989). Essas enzimas são produzidas por procariotos e atuam reconhecendo e clivando destruindo moléculas de DNA em sítios com sequências específicas, gerando fragmentos de DNA dupla fita de diferentes tamanhos (Madigan *et al.*, 2000). Esses fragmentos podem ser separados através de eletroforese horizontal em gel de agarose, obtendo-se um perfil de restrição enzimática, com bandas em diferentes posições, de acordo com o tamanho dos fragmentos gerados (Sambrook *et al.*, 1989; Zaha, 2000). Como essas enzimas reconhecem sequências específicas de 4 a 8 nucleotídeos, variações na sequência do DNA analisado podem ser posteriormente detectadas, com a obtenção de diferenças nos perfis de restrição enzimática, como ganho ou perda de sítios de restrição, ou ainda diferenças no tamanho dos fragmentos gerados (Madigan *et al.*, 2000).

Em vista disso, embora os isolados de BHV-1 e BHV-5 sejam indistinguíveis por análises sorológicas convencionais, variações significativas em seus perfis genômicos têm sido detectadas pela técnica denominada polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP) ou simplesmente análise com enzimas de restrição (REA) (Crandell *et al.*, 1988; Kataria & Rai, 1992; Mayfield *et al.*, 1983; Osorio *et al.*, 1985; Rimstad *et al.*, 1992; Seal *et al.*, 1985; Smith *et al.*, 1995; Studdert *et al.*, 1987; Varady *et al.*, 1994). Essa técnica têm sido amplamente utilizada no estudo dos herpesvírus, possibilitando sua identificação e classificação em tipos e subtipos (Pignatti *et al.*, 1979; Engels *et al.*, 1986; Burlach & Studdert, 1990; Bratanich *et al.*, 1991; Edwards *et al.*, 1991; d'Offay *et al.*, 1993; Magyar *et al.*, 1993; Whetstone *et al.*, 1993).

A REA dos genomas do BHV-1 e do BHV-5 têm sido utilizada como uma técnica diagnóstica para a identificação e classificação de isolados de campo em tipos e subtipos virais. Apesar da importância epidemiológica das diferenças genômicas das amostras de BHV-

1 ser ainda um tanto quanto questionada, a REA corresponde a um método seguro para a caracterização das cepas isoladas, bem como para a detecção de cepas vacinais do BHV-1, especialmente quando estas podem estar associadas com a enfermidade (Horiuchi *et al.*, 1995; Kennedy *et al.*, 1986; d'Offay *et al.*, 1993; Whetstone *et al.*, 1986).

1.5. Subtipos do BHV-1 e BHV-5

Devido à associação das diferentes amostras de BHV a quadros clínicos específicos, vários autores propuseram sua divisão em tipos e subtipos (Quadro 1). Originalmente, esses vírus eram divididos levando-se em conta apenas critérios clínicos e sorológicos (Engels *et al.*, 1981; Straub, 1978). A primeira subdivisão proposta foi embasada nas diferenças clínicas existentes, permitindo a distinção das amostras associadas à IBR, como “IBR-like” e as associadas à IPV, como “IPV-like” (Ludwig, 1983, 1984).

Com a adoção da REA, a caracterização dos isolados de BHV-1 se tornou mais precisa, e alguns autores sugeriram que certos padrões de migração dos fragmentos de restrição do DNA viral poderiam estar associados a algumas síndromes clínicas em particular, como IBR, IPV e abortos (Engels *et al.*, 1981; Ludwig, 1983, 1984; Misra *et al.*, 1983; Nettleton *et al.*, 1984; Pauli *et al.*, 1984). As primeiras amostras isoladas, tidas hoje como referência, foram associadas à sintomatologia clínica, de acordo com o perfil de restrição enzimática apresentado. Em vista disso, criou-se o termo “Cooper-type” para designar as amostras respiratórias de BHV-1 que tinham o perfil de restrição semelhante ao da amostra *Cooper*, isolada por York *et al.*, 1957, e “K22-type” para designar as amostras genitais de BHV-1, com perfil correspondente ao da amostra *K22*, isolada por Kendrik *et al.*, 1958 (Nettleton *et al.*, 1984).

Posteriormente, através de análises dos mapas genômicos por meio de enzimas de restrição, Misra *et al.* (1983) denominaram as amostras de BHV-1 como subtipo I (associadas

à IBR ou abortos), subtipo II (associadas à IBR, abortos e IPV) e subtipo III (associadas à IPV). Subsequentemente, Metzler *et al.* (1985) propuseram a denominação de Herpesvírus Bovino tipo 1 subtipos 1, 2a e 2b para os subtipos I, II e III respectivamente, através dos mapas genômicos analisados com o uso de enzimas de restrição e anticorpos monoclonais (AcMs) e as denominações "IBR-like" e "IPV-like" correspondem aos subtipos BHV-1.1 e BHV-1.2, respectivamente. Seguindo a denominação de Metzler, a amostra de referência *Los Angeles (LA)*, isolada por Madin *et al.* (1956) em um surto de IBR, teve o perfil de restrição enzimática classificado como BHV-1.1 (Engels *et al.*, 1986).

Ainda através da análise genômica, glicoproteica e polipeptídica de amostras encefalitogênicas, classificou-se o Herpesvírus Bovino tipo 1 subtipo 3 (BHV-1.3), distinto dos demais subtipos (Metzler *et al.*, 1986). Através da análise do perfil de proteínas e de restrição enzimática do DNA de duas amostras isoladas de casos de encefalite, a australiana *N569* (French, 1962ab) e a argentina *A663* (Carrillo *et al.*, 1983), Metzler *et al.* (1986) propuseram uma subdivisão dessas amostras em BHV-1.3a e BHV-1.3b, respectivamente.

No entanto, as amostras encefalitogênicas foram ainda consideradas como um subtipo do BHV-1 (Metzler *et al.*, 1985, 1986). Devido a características genômicas únicas, aliado aos comportamentos clínico-epidemiológicos distintos apresentados, Studdert (1990) sugeriu que as amostras neurovirulentas fossem denominadas Herpesvírus da Encefalite Bovina (BEHV). Atualmente, o Grupo de Estudos dos Herpesvírus no Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus (ICTV) classifica o BEHV como um novo tipo, denominando-o Herpesvírus Bovino tipo 5 ou BHV-5 (Roizman *et al.*, 1992). As classificações propostas para o BHV-1 e BHV-5 estão resumidas no quadro 1.

QUADRO 1: Classificações propostas na literatura para o BHV-1 e BHV-5 e os sinais clínicos a elas relacionados.

Ludwig (1983)	Nettleton <i>et al.</i> (1984)	Misra <i>et al.</i> (1983)	Metzler <i>et al.</i> (1985, 1986)	Roizman <i>et al.</i> (1992)	Sinais clínicos
IBR-like	Cooper-type	BHV-1 I	BHV-1.1	BHV-1	IBR e abortos
IPV-like	K22-type	BHV-1 II	BHV-1.2a		IBR, abortos e IPV
		BHV-1 III	BHV-1.2b		IPV
-	-	-	BHV-1.3a	BHV-5	encefalite
-	-	-	BHV-1.3b		

Engels *et al.* (1987) encontraram uma similaridade de aproximadamente 95% nas seqüências genômicas do BHV-1.1 e BHV-1.2, pelo mapeamento dos sítios de restrição e hibridização cruzada. Esses dados condizem com os achados de Mayfield *et al.* (1983) e Seal *et al.* (1985), que encontraram o mesmo grau de similaridade entre esses dois subtipos. Entre os genomas do BHV-1 e BHV-5, o grau de similaridade encontrado foi de 85% (Engels *et al.*, 1987). As diferenças entre os subtipos BHV-1.1 e 1.2, caracterizadas por perda ou ganho de sítios de restrição, são restritas a duas regiões internas do genoma (Engels *et al.*, 1987), a região interna repetida e a porção terminal esquerda da região única longa (Whetstone *et al.*, 1993). Já entre o BHV-1 e BHV-5, as alterações nos sítios de restrição estão distribuídas por todo o genoma (Engels *et al.*, 1987), sendo determinadas por Whetstone *et al.* (1993) sua maior variação nas regiões repetidas interna e terminal direita.

Utilizando metodologia tradicional, como testes de soroneutralização frente a amostras de BHV-1, a resposta sorológica induzida pelo BHV-5 em animais infectados não pode ser diferenciada daquela induzida pelo BHV-1. No entanto, as diferenças antigênicas entre ambos

vírus podem ser detectadas com relativa facilidade quando se utilizam anticorpos monoclonais. Neste caso, painéis de AcMs são colocados a reagir frente a diferentes amostras de vírus e seu perfil de reatividade determinado por testes imunoquímicos ou por radioimunoprecipitação (Friedli & Metzler, 1987; Collins *et al.*, 1993; Silva, 1995; Almeida, 1997).

Os dados obtidos na literatura parecem ser ainda contraditórios no que se refere à existência ou não de correlação entre perfil de restrição enzimática das amostras de BHV-1 e BHV-5, assim como o quadro clínico por elas induzido. Dada a carência de informações sobre as amostras isoladas no Brasil, é de suma importância estudos comparativos dos genomas virais de amostras brasileiras de BHV-1 e BHV-5, para sua correlação com a sintomatologia clínica apresentada pelos animais acometidos, bem como sua comparação com os perfis de restrição enzimática obtidos de amostras isoladas em todo o mundo.

2. OBJETIVOS

Dada a problemática já exposta, no que se refere a ausência de informações com relação a classificação das amostras de BHV-1 e BHV-5 isoladas no Brasil, bem como os dados contraditórios na correlação de sintomatologia clínica e perfil genômico das cepas destes vírus, o presente estudo teve como objetivo:

- A avaliação das diferenças genômicas pela análise com enzimas de restrição (REA) das amostras de BHV-1 e BHV-5, isoladas de bovinos de diversos Estados brasileiros, tanto de casos de IBR, como também de IPV e encefalite;
- A determinação dos tipos e subtipos virais aos quais pertencem estas amostras, fornecendo assim informações a respeito das cepas que circulam em nosso país.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Cultivo celular

As células utilizadas para a multiplicação e titulação viral foram da linhagem MDBK*, provenientes do Central Veterinary Agency (Weybridge, UK), cultivadas em meio mínimo essencial de Eagle (MEM), acrescido de 6% de soro fetal bovino (SFB), e 1% de antibióticos, Penicilina (1×10^6 UI/ml) e Estreptomicina (2mg/ml). O soro fetal bovino utilizado (Cultilab®), inativado a 56°C/ 30 minutos, foi testado comercialmente para garantir a ausência de anticorpos específicos contra o BHV, ou ainda contaminações por bactérias, fungos, micoplasmas e pestivírus. Os cultivos celulares foram mantidos em garrafas de poliestireno de 75 cm² (Costar®), com uma concentração inicial de 2×10^5 células/ml, seguindo metodologia usual (Paul, 1970).

3.2. Amostras virais

A procedência das amostras virais obtidas e o caso clínico a elas relacionadas são mostrados na tabela 1. A amostra *Los Angeles* (LA)* (Madin *et al.*, 1956) é considerada amostra respiratória de referência para o BHV-1, sendo obtida do Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Castelar, Argentina.

* gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Paulo Roehle, do Centro de Pesquisas Veterinárias "Desidério Finamor"-RS (CPVDF).

Do mesmo instituto foi obtida a amostra de referência para BHV-5 A663*, isolada por Carrillo *et al.*, (1983), de um caso de encefalite bovina ocorrido na região central da Argentina.

As amostras de campo SV 265/96 e SV 136/88 foram isoladas no Laboratório de Virologia Animal da Universidade Federal de Santa Maria-RS (UFSM-RS)**. A primeira foi isolada de um caso de IBR ocorrido em São Borja-RS, enquanto que a segunda de um caso de meningoencefalite em Ijuí-RS. As amostras ISO 97/87, ISO 97/45, ISO 99/292 e P96/169 foram isoladas de casos de encefalite bovina no Instituto Biológico-SP (IB-SP)***. A amostra ISO 97/87 foi isolada no município de Ibiraci - SP, a amostra ISO 99/292 no município de Curionópolis - PA, e as amostras ISO 97/45 e P 96/169 do Estado do Rio de Janeiro.

As amostras de campo EVI 88/95 e EVI 123/98 foram obtidas do Centro de Pesquisas Veterinárias “Desidério Finamor”-Eldorado do Sul-RS (CPVDF-RS)*; a primeira isolada de um quadro de meningoencefalite bovina e a segunda de um caso de IBR, ambos ocorridos no Estado do Mato Grosso do Sul. A amostra AA 05 foi isolada no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, na Universidade Estadual de Londrina-PR (UEL-PR)****, de um quadro clínico suspeito de raiva bovina. A amostra 009 foi isolada de sêmen de um touro clinicamente normal do Estado do Rio Grande do Sul, no Laboratório de Virologia da Faculdade de Veterinária da UFRGS*****.

Todas as amostras foram selecionadas a partir de 20 amostras de BHV-1 e BHV-5 estudadas.

*gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Paulo Roehe.

**gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Rudi Weiblen.

***gentilmente cedidas pela Profª Drª Edviges Maristela Pituco.

****gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Amauri Alfieri.

*****gentilmente cedida pela Profª Drª Valéria Moojen.

Todas as amostras utilizadas foram caracterizadas frente a um painel de anticorpos monoclonais, em estudos prévios realizados no CPVDF-RS (Silva, 1995; Almeida, 1997), apresentando perfis compatíveis com o BHV-1 ou BHV-5, como indicado na tabela 1.

TABELA 1: Amostras de BHV-1 e BHV-5 utilizadas nos experimentos

Amostra Viral	Caso Clínico	Procedência (isolamento)	Perfil Compatível**
<i>Los Angeles*</i>	IBR	INTA-ARG	BHV-1
<i>SV 265/96</i>	IBR	UFSM-RS	BHV-1
<i>EVI 123/98</i>	IBR	CPVDF-RS	BHV-1
<i>OO9</i>	***	UFRGS-RS	BHV-1
<i>A663*</i>	Encefalite	INTA-ARG	BHV-5
<i>ISO 97/87</i>	Encefalite	IB-SP	BHV-5
<i>ISO 97/45</i>	Encefalite	IB-SP	BHV-5
<i>ISO 99/292</i>	Encefalite	IB-SP	BHV-5
<i>P 96/169</i>	Encefalite	IB-SP	BHV-5
<i>EVI 88/95</i>	Encefalite	CPVDF-RS	BHV-5
<i>AA 05</i>	Encefalite	UEL-PR	BHV-5
<i>SV 136/88</i>	Encefalite	UFSM-RS	BHV-5

*Amostras de referência

**Teste com anticorpos monoclonais (Silva, 1995; Almeida, 1997)

***Sem sinais clínicos

3.3. Estoque viral

Os estoques de vírus foram obtidos pela inoculação em cultivos celulares, com uma multiplicidade de infecção entre 0,1 e 1,0 doses infectantes para 50% dos cultivos celulares (DICC_{50%}). O inóculo viral foi congelado a -70°C quando do aparecimento de efeito citopatogênico (ECP) em aproximadamente 90% da monocamada. A suspensão foi então aliquoteada, titulada e estocada a -70°C até o momento do uso.

3.4. Determinação do título infectante viral

As titulações dos vírus foram feitas de acordo com metodologias usuais. Diluições na base 10 do vírus foram colocadas em volumes de 50 µl/ cavidade, em quadruplicata, em microplacas de cultivos celulares (Costar[®]). Foi então adicionado 50 µl de células MDBK com uma concentração de 1,5 a 3,0 x 10⁴ células/ cavidade. As microplacas foram incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO₂. As leituras foram feitas 24, 48 e 72 horas após a inoculação, em busca do ECP característico. Os títulos foram calculados com base no método de Spearman & Karber (Lorenz & Bögel, 1973), e utilizados para o cálculo da multiplicidade de infecção.

3.5. Propagação e concentração viral

Os vírus foram propagados em garrafas tipo "roller" de 850 cm² (Costar[®]) segundo o procedimento descrito no item 3.4. A suspensão obtida foi centrifugada a 3.000 x g por 10 minutos para a separação dos debris celulares. Nesta etapa, foram testados dois protocolos, a saber:

1. ultracentrifugação (L8-80M, Beckman®) do sobrenadante a 100.000 x g (rotor SW 28, Beckman®), por 1 hora em colchão de sacarose a 40%;
2. ultracentrifugação do sobrenadante a 100.000 x g por 1 hora sem colchão de sacarose.

Em ambos os casos, o sedimento foi posteriormente ressuspensão em tampão TE (0,01 M de Tris e 0,01 M de EDTA, pH 7,6) e estocado a -70°C.

3.6. Extração do DNA viral

O DNA viral foi extraído segundo Sambrook *et al.*, 1989. Foram testadas variações da técnica, na tentativa de aumentar o rendimento nas extrações, e de evitar o aparecimento de degradações no DNA viral obtido. No que diz respeito à incubação da amostra para a lise proteica, foram testados dois protocolos, com duas amostras virais, segundo orientações de Corção* (comunicação pessoal, 1999).

3.6.1. Protocolos 1 e 2

À suspensão de cada amostra adicionou-se 100µg/ ml de proteinase K e 0,5% de sódio dodecil sulfato, para a digestão das proteínas, com incubação a 37° C por 1 hora no protocolo 1, e a 56° C por 15 minutos no protocolo 2. Posteriormente, o DNA foi separado das proteínas pela adição de igual volume de fenol/ clorofórmio/ álcool isoamílico, seguido de leve agitação e centrifugação a 12.000 x g por 3 minutos. O sobrenadante foi cuidadosamente coletado e repetiu-se o procedimento anterior, seguido da adição de igual volume de clorofórmio/ álcool isoamílico para a extração da proteína residual da amostra.

* Depto. de Microbiologia - ICBS - UFRGS.

Em seguida o DNA foi precipitado adicionando-se 2 vezes do volume de etanol absoluto e 0,1 volume de acetato de sódio 0,3 M, deixando por 4 horas a -20° C. A solução foi então centrifugada, e o sedimento obtido ressuspensão em TE e estocado a -20° C.

3.6.2. Separação de proteínas e DNA viral

Segundo orientações de Silveira* (1999, comunicação pessoal), foram testadas variações nos protocolos para a separação de proteínas e DNA viral, na tentativa de selecionar o melhor método de obtenção de DNA em quantidade e qualidade satisfatórias para posterior clivagem. Com o objetivo de avaliar a influência do fenol como agente degradante do DNA viral, foram testadas soluções contendo fenol destilado e não destilado, juntamente com clorofórmio e álcool isoamílico, na proporção 25:24:1, conforme já descrito nos protocolos 1 e 2. Testou-se também a extração utilizando apenas clorofórmio/ álcool isoamílico na proporção 24:1.

3.6.3. Protocolo ID-DLO

Foram testadas as variações propostas por Van Oirschot** (1995), consistindo essencialmente na adição de cloreto de sódio, até a concentração final de 0,3 M, após incubação com o tampão de lise por 1 hora a 37°C, seguido da adição de solução de fenol/ clorofórmio/ álcool isoamílico (25:24:1), sob leve agitação por 30 minutos. Em seguida procedeu-se como já descrito nos protocolos 1 e 2.

*Depto. de Microbiologia e Imunologia - IB - UNICAMP.

**ID-DLO - Institute for Animal Science and Health, Lelystad, Holanda

3.6.4. Kits comerciais de extração

Segundo orientações de Maia* (1999, comunicação pessoal), foram testados kits comerciais de extração, na tentativa de minimização de erros ocorridos durante a padronização das técnicas, como no preparo de soluções, temperatura e tempo de incubação.

O kit QIAamp DNA Mini Kit® e o protocolo de extração de DNA viral utilizando-se DNAzol® foram utilizados segundo as instruções do fabricante (Qiagen® e Gibco BRL®, respectivamente).

3.7. Visualização do DNA viral

O DNA foi visualizado após eletroforese horizontal em gel de agarose 0,6%, a 80 V por cerca de 30 minutos. A amostra foi preparada com 3 µl de DNA, 5 µl de tampão da amostra (40% de sacarose e 0,25% de azul de bromofenol) e 6 µl de água destilada. Igual procedimento foi realizado com o controle de células negativo, o qual foi submetido aos mesmos protocolos de extração que as amostras virais. O gel foi posteriormente corado com brometo de etídio (0,5 µg/ ml) por 30 minutos, visualizado e fotografado sob transiluminação ultravioleta (MacroVue UV-20, Hoefer®).

3.8. Análise do DNA viral com enzimas de restrição (REA)

Os DNAs obtidos foram clivados pelas enzimas de restrição *Bam*HI, *Bst*EII, *Eco*RI, *Hind*III e *Pst*I conforme Sambrook *et al.* (1989), e instruções do fabricante (Gibco BRL®). Em linhas gerais, a solução de reação foi preparada em tubos de microcentrífuga

*Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética - UNICAMP.

(Eppendorf®), cada um contendo 3µl de DNA da amostra, 1µl da enzima (10U/µl), 1µl de tampão de reação (50mM Tris-HCl, 10mM MgCl₂, 50mM NaCl) e água ultrapura (miliQ®) autoclavada qsp. 10µl. Cada amostra foi incubada com cada enzima nas temperaturas requeridas, ou seja, 37° C para *Bam* HI, *Eco*RI, *Hind*III e *Pst*I, e 60° C para *Bst*EII.

Com o objetivo de otimizar a reação, foram testados os tempos de incubação de 2, 4 e 6 horas nas temperaturas requeridas para a clivagem do DNA.

3.9. Visualização dos resultados de REA

Os fragmentos obtidos na REA foram visualizados e fotografados após eletroforese em gel de agarose 0,6% a 30V por 12-24 horas, coloração pelo brometo de etídio sob transiluminação ultravioleta. Em seguida, os perfis de restrição enzimática obtidos de cada amostra foi analisado e comparado com os perfis descritos na literatura.

4. RESULTADOS

4.1. Obtenção e titulação das amostras virais

Em virtude das dificuldades em se obter DNA viral em quantidade e qualidade suficientes para a clivagem com enzimas de restrição, de apenas 12 amostras das 20 adquiridas e analisadas de BHV-1 e BHV-5, foi possível obter resultados satisfatórios em relação a REA, as quais são listadas na tabela 1.

As amostras necessitaram de relativamente poucas passagens *in vitro*, entre 2 a 4 passagens, para aumentar seus títulos, que variaram entre $10^{6,8}$ a $10^{7,8}$.

4.2. Concentração viral

Obteve-se resultados satisfatórios na extração e clivagem dos produtos resultantes tanto da ultracentrifugação em colchão de sacarose 40%, como daqueles que sofreram apenas ultracentrifugação. Os resultados no que diz respeito ao rendimento e a qualidade dos DNAs obtidos por ambos os protocolos foram semelhantes, visto que as bandas se mostraram visivelmente nítidas no gel, sem sinais de degradação do ácido nucleico viral. Portanto podemos inferir que as duas técnicas utilizadas são apropriadas para a concentração viral, sem interferir na qualidade do DNA extraído.

4.3. Extração e visualização do DNA viral

As variações na temperatura e tempo de incubação com o tampão de lise foram testadas com as amostras *Los Angeles* e *SV 265/96*. Os DNAs virais extraídos são demonstrados na Figura 1. Ambos os protocolos testados apresentaram resultados que tornaram possível a utilização do DNA viral obtido para posterior clivagem.

Quanto à separação de proteínas e DNA viral, os protocolos em que se utilizou fenol destilado e não destilado apresentaram melhores resultados, com a obtenção de DNA íntegro suficiente para a realização das clivagens, não se observando diferença no que diz respeito à destilação do reagente. Em contrapartida, a utilização de apenas clorofórmio e álcool isoamílico na extração gerou produtos altamente degradados, os quais não puderam ser aproveitados para a REA (figura 2).

Dentre os kits comerciais de extração testados, a utilização do DNazol[®] não resultou em DNA de boa qualidade, apresentando um baixo rendimento e alta degradação do produto, o que se observa na figura 2. Já no caso da utilização do protocolo ID-DLO e do kit Qiagen[®], ambos apresentaram resultados satisfatórios, sendo que o primeiro apresentou um melhor rendimento (figura 3). Apesar dessa diferença de rendimento, foi possível utilizar o DNA viral obtido de ambos protocolos para as clivagens com enzimas de restrição.

4.4. Análise do DNA viral com enzimas de restrição (REA)

O tempo de incubação do DNA viral com enzimas de restrição foi testado com a amostra *SV 136/88* frente a diferentes enzimas e diferentes tempos (Figura 4). Não houve

diferença visual das clivagens em relação às incubações realizadas, sendo que 2 horas foram suficientes para a clivagem completa do DNA.

Os perfis de restrição enzimática obtidos permitiram a seleção das enzimas necessárias para a classificação das amostras virais deste experimento. Todas as enzimas utilizadas geraram perfis que possibilitaram a diferenciação entre as amostras de BHV-1 e BHV-5 (figuras 5 e 6). Contudo, a diferenciação dos subtipos virais só foi obtida de forma nítida com a utilização das enzimas *HindIII* e *BstEII*, como demonstrado no Esquema 1.

As variações entre os perfis genômicos dos subtipos de BHV-1 mostraram-se muito discretas com a utilização da enzima *EcoRI*, e por isso esta foi descartada. Segundo a literatura, a enzima *PstI* permite diferenciar os perfis dos subtipos de BHV-1 e 5. Porém os fragmentos gerados com a clivagem por esta enzima são muitos pequenos e de difícil resolução no gel de agarose, e por isso não foi possível utilizá-la (figura 5).

A enzima *BstEII* foi a única capaz de demonstrar nitidamente as diferenças entre os perfis de restrição dos subtipos de BHV-5 (figuras 5, 6, 8, 9 e 10). Os subtipos de BHV-1 foram então classificados de acordo com as variações nos perfis obtidos com a enzima *HindIII* (figuras 5 e 7), enquanto que os perfis observados com as clivagens utilizando a enzima *BstEII* possibilitaram a classificação dos subtipos de BHV-5 (Esquema 1).

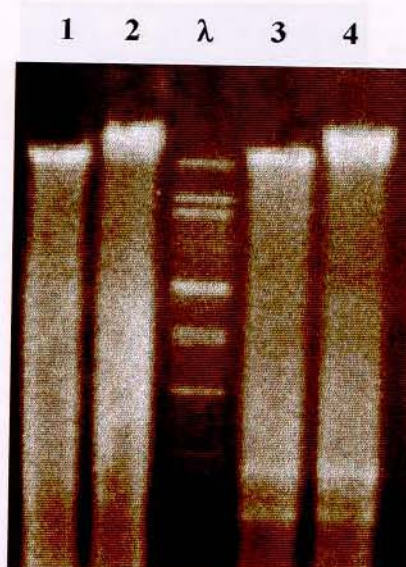


Figura 1: Comparação de dos protocolos 1 e 2 de extração do DNA viral, visualizados após corrida em gel de agarose 0,6%. **1:** amostra *LA* extraída pelo protocolo 1; **2:** amostra *LA* extraída pelo protocolo 2; **λ:** marcador de peso molecular *λ HindIII*; **3:** amostra *SV 265/96* extraída pelo protocolo 1; **4:** amostra *SV 265/96* extraída pelo protocolo 2.

λ 1 2 3 4 λ

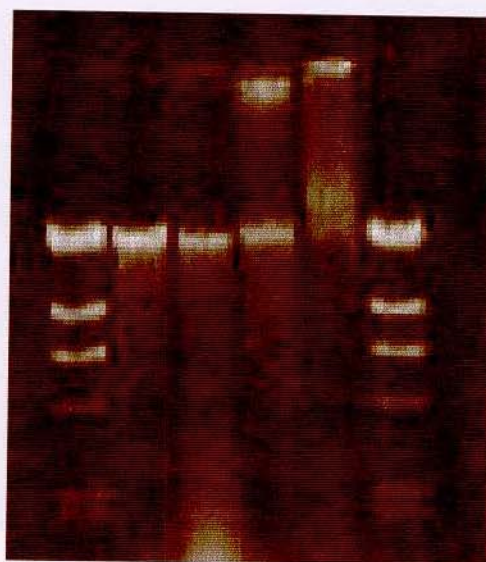


Figura 2 : Comparação dos protocolos de separação de proteínas e DNA viral, visualizados após corrida em gel de agarose 0,6%. **λ:** marcador de peso molecular *λ HindIII*; **1:** fenol destilado/ clorofórmio/ álcool isoamílico (25:24:1); **2:** fenol/ clorofórmio/ álcool isoamílico (25:24:1); **3:** clorofórmio/ álcool isoamílico (24:1); **4:** DNAzol (Gibco BRL®).

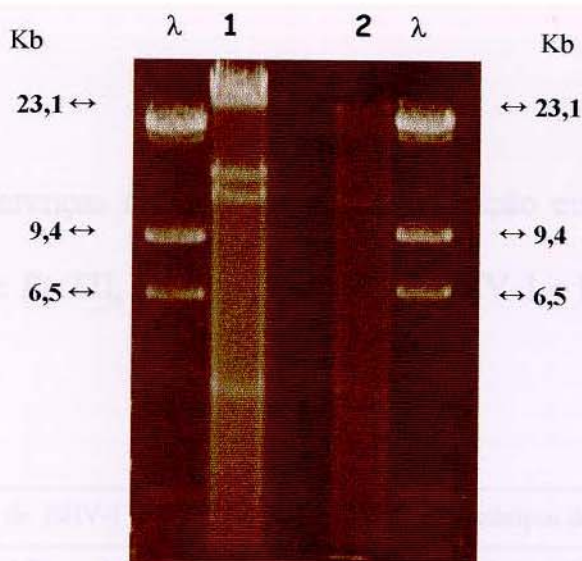


Figura 3 : Comparação dos protocolos ID-DLO e kit comercial Qiagen® de extração do DNA viral, visualizados após corrida em gel de agarose 0,6%. λ: marcador de peso molecular λ *Hind*III; 1: amostra P 96/169 cortada com *Hind*III e extraída segundo protocolo ID-DLO; 2: amostra P 96/169 cortada com *Hind*III e extraída segundo kit comercial Qiagen®.

1 2 3 λ 4 5 6 7 8 9

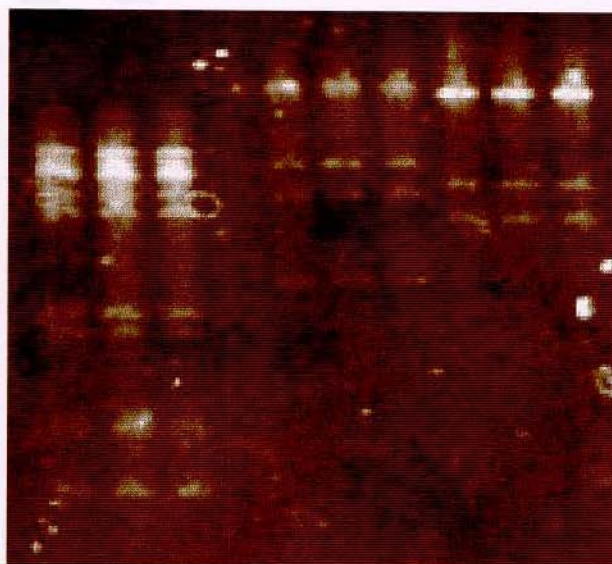
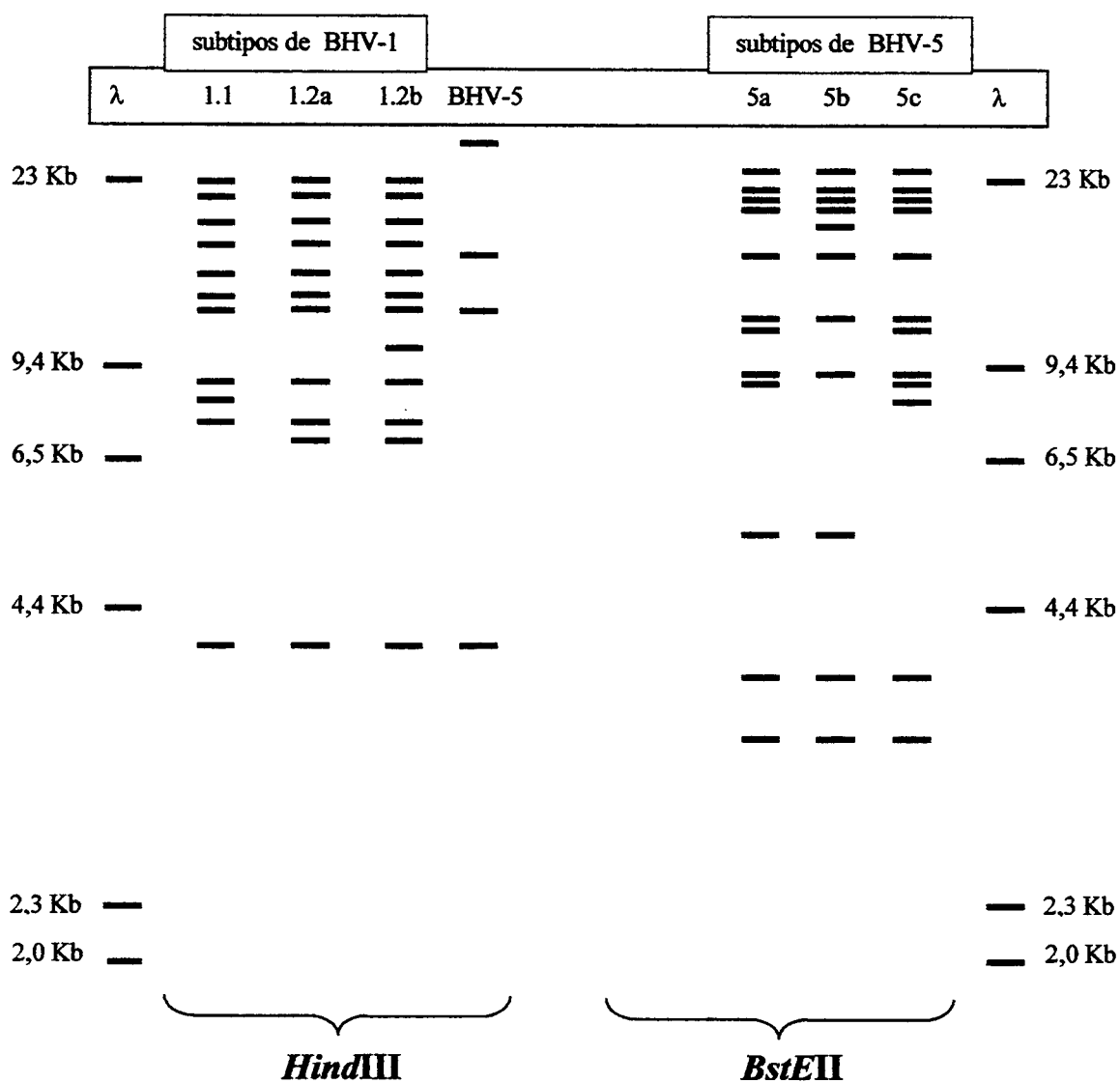


Figura 4: Determinação do tempo de incubação da reação de REA. A figura mostra a cepa SV 136/88 clivada com diferentes enzimas em diferentes tempos de incubação. 1: clivagem com *Bam*HI por 2 horas; 2: clivagem com *Bam*HI por 4 horas; 3: clivagem com *Bam*HI por 6 horas; λ: marcador de peso molecular λ *Hind*III; 4: clivagem com *Eco*RI por 2 horas; 5: clivagem com *Eco*RI por 4 horas; 6: clivagem com *Eco*RI por 6 horas; 7: clivagem com *Hind*III por 2 horas; 8: clivagem com *Hind*III por 4 horas; 9: clivagem com *Hind*III por 6 horas.

Esquema 1: Diferenças entre os perfis de restrição enzimática obtidos com as enzimas *Hind*III e *Bst*II, para os subtipos de BHV-1 e BHV-5



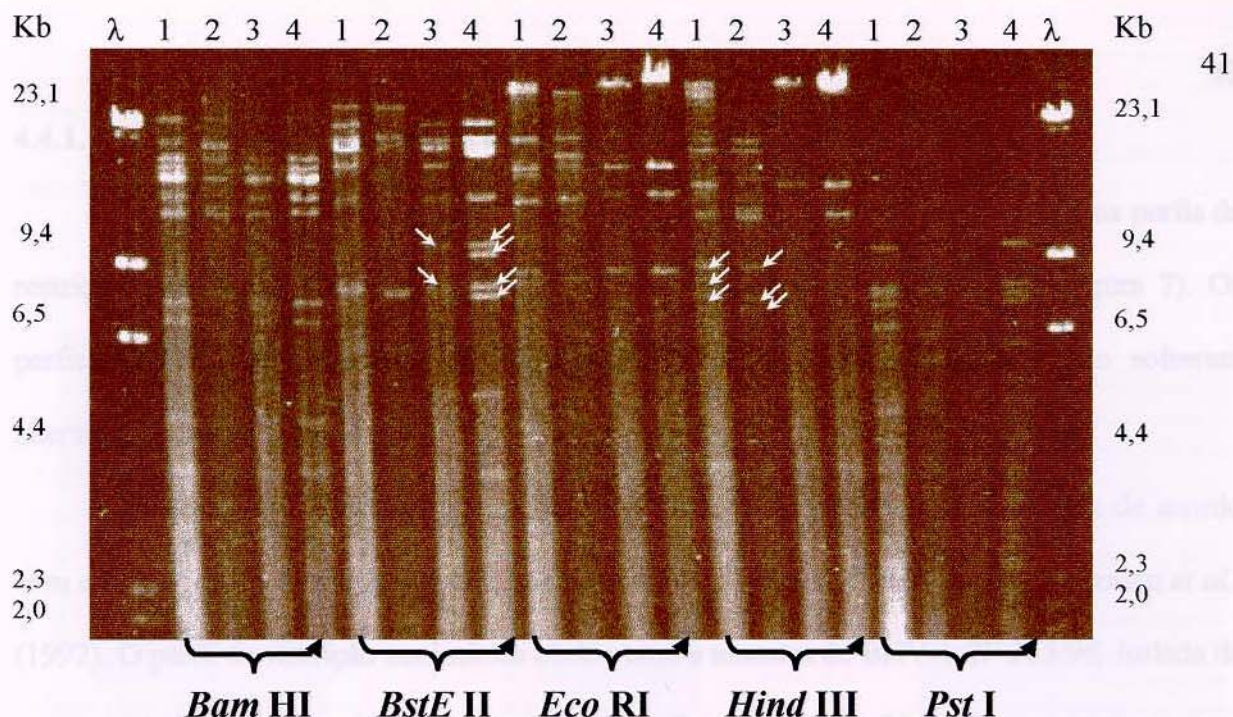


Figura 5: Perfis de restrição enzimática de amostras de BHV-1 e BHV-5 analisadas após eletroforese em gel de agarose 0,6%. λ : marcador de peso molecular λ *Hind*III; 1: amostra padrão de BHV-1 *Los Angeles*; 2: amostra de campo de BHV-1 *SV265/96*; 3: amostra padrão de BHV-5 *A663*; 4: Amostra de campo de BHV-5 *SV136/88*. As enzimas utilizadas são indicadas pelas chaves, em grupos de quatro amostras, nomeadas acima. As diferenças entre os subtipos são destacadas pelas setas.

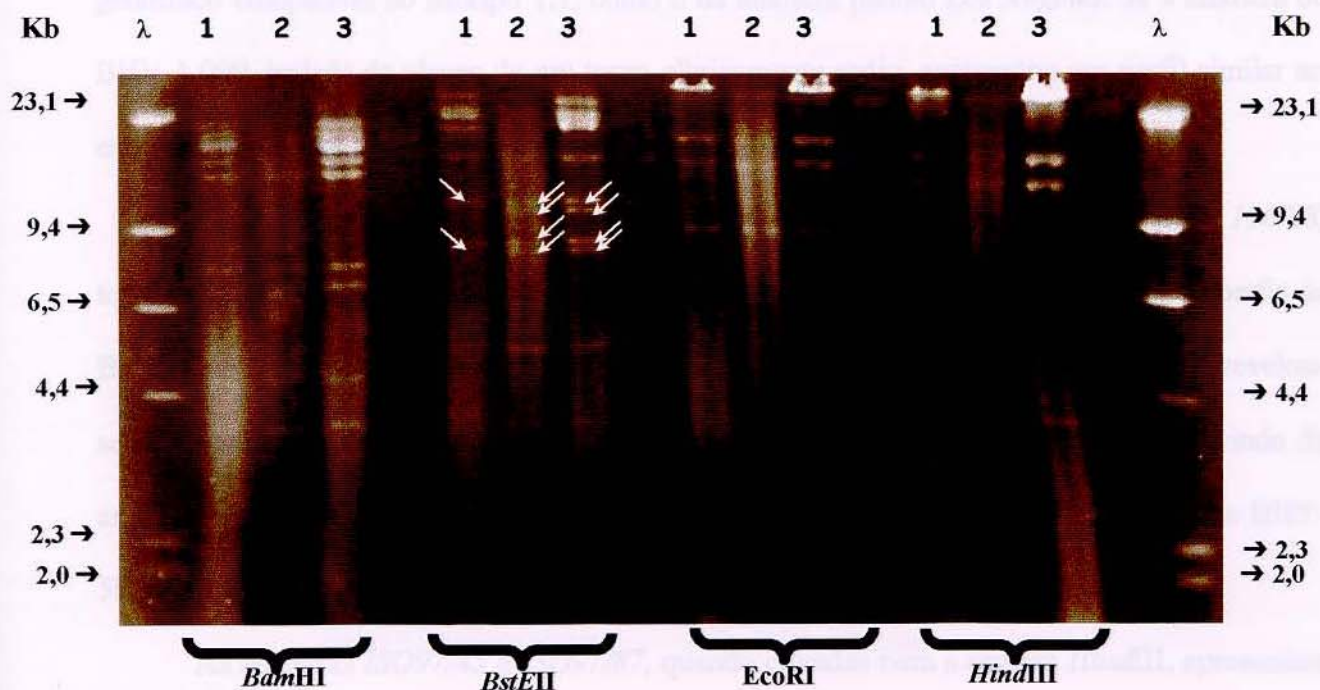


Figura 6: Perfis de restrição enzimática de amostras de BHV-5 analisadas após eletroforese em gel de agarose 0,6%. λ : marcador de peso molecular λ *Hind*III; 1: amostra padrão de BHV-5b *A663*; 2: amostra de campo *EVI 88/95* (BHV-5a); 3: amostra de campo *AA 05* (BHV-5a). As enzimas utilizadas são indicadas pelas chaves, em grupos de quatro amostras, nomeadas acima. As diferenças entre os subtipos são destacadas pelas setas.

4.4.1. Análise das amostras virais utilizadas no presente estudo

A amostra de referência para o BHV-1 *Los Angeles* (LA) manteve os mesmos perfis de restrição enzimática, típicos de BHV-1.1, que os demonstrados na literatura (figura 7). Os perfis obtidos para a amostra de referência *A663* para o BHV-5 também não sofreram alteração alguma (figura 8).

Na tabela 2 estão listadas as amostras analisadas neste estudo, distribuídas de acordo com a classificação proposta por Metzler *et al.*, (1985, 1986) e modificada por Roizman *et al.*, (1992). O perfil de restrição enzimática obtido com a amostra de BHV-1 *SV 265/96*, isolada de um caso de IBR, utilizando a enzima *HindIII*, indica uma similaridade dessa amostra com o subtipo 1.2a, segundo a classificação proposta por Metzler *et al.* (1985, 1986). De acordo com essa mesma classificação, a amostra respiratória de BHV-1 *EVI 123/98* apresentou um perfil genômico compatível ao subtipo 1.1, como o da amostra padrão *Los Angeles*. Já a amostra de BHV-1 009, isolada de sêmen de um touro clinicamente sadio, apresentou um perfil similar ao encontrado em amostras do subtipo 1.2b (figura 7, tabela 2).

Para as cepas encefalitogênicas *AA 05*, *EVI 88/95*, *ISO 99/292*, *P 96/169* e *SV 136/88*, todos os perfis de restrição enzimática encontrados se mostraram compatíveis com os perfis de BHV-5 descritos na literatura. O perfil dessas amostras, obtido com a enzima *BstEII* revelou-se compatível ao perfil da cepa australiana de referência *N569* (French, 1962ab), diferindo da amostra argentina *A663* (figuras 5, 6, 8, 9 e 10, tabela 2), classificadas como BHV-5a e BHV-5b, respectivamente.

As amostras *ISO97/45* e *ISO97/87*, quando clivadas com a enzima *HindIII*, apresentam um perfil típico de BHV-5, como as outras amostras encefalitogênicas analisadas (figura 9).

Entretanto, quando clivadas com *BstEII*, revelaram um perfil genômico que difere tanto da amostra de referência australiana como da argentina (figuras 9 e 10, tabela 2).

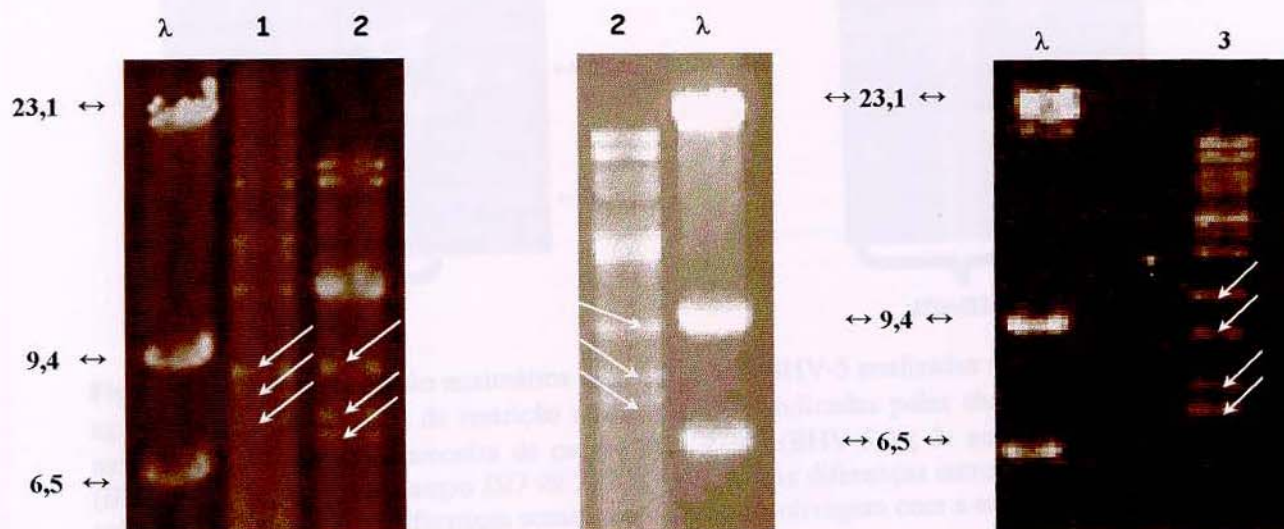


Figura 7: Diferenças encontradas nos perfis de restrição enzimática das amostras de BHV-1 clivadas com *HindIII* analisadas após eletroforese em gel de agarose 0,6%. λ: marcador de peso molecular λ *HindIII*; 1: amostra padrão de BHV-1.1 *Los Angeles*; 2: amostra de campo SV 265/96 (BHV-1.2a); 3: amostra de campo 009 (BHV-1.2b). As diferenças entre os subtipos são destacadas pelas setas.

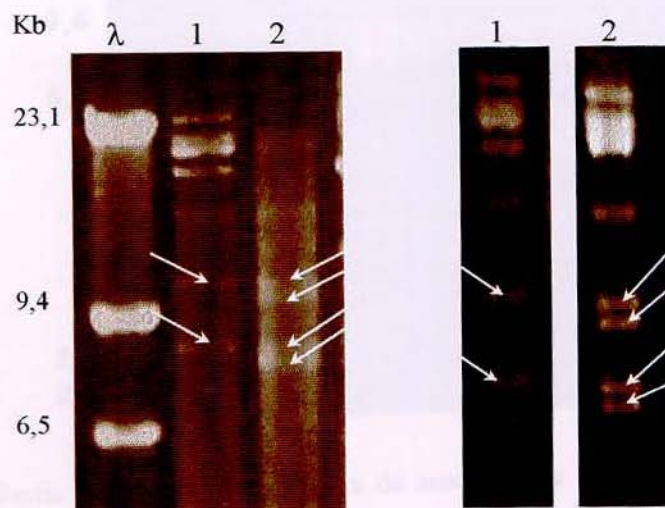


Figura 8: Diferenças encontradas nos perfis de restrição enzimática entre os subtipos de BHV-5b e BHV-5a, respectivamente, quando clivados com a enzima *BstEII*. λ: marcador de peso molecular λ *Hind III*; 1: amostra de referência para o BHV-5 A663; 2: amostra de campo de BHV-5 SV 136/88.

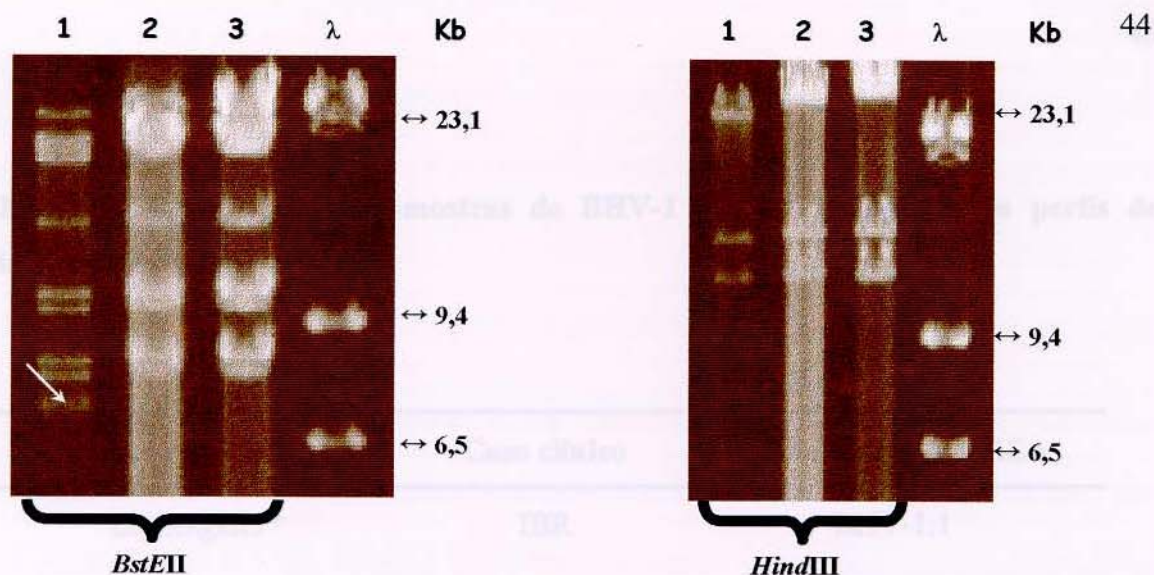


Figura 9: Perfis de restrição enzimática de amostras de BHV-5 analisadas após eletroforese em gel de agarose 0,6%. As enzimas de restrição utilizadas estão indicadas pelas chaves. λ : marcador de peso molecular λ *HindIII*; 1: amostra de campo ISO 97/87 (BHV-5c); 2: amostra de campo P 96/169 (BHV-5a); 3: amostra de campo ISO 99/292 (BHV-5a). As diferenças entre os subtipos são destacadas pelas setas. Notar que as diferenças somente aparecem na clivagem com a enzima *BstEII*.

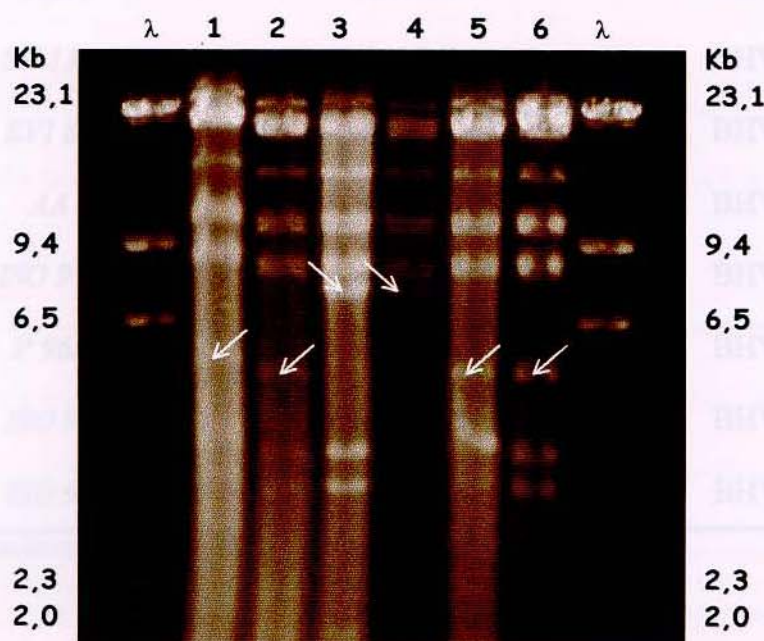


Figura 10: Perfis de restrição enzimática de amostras de BHV-5 quando clivadas com a enzima *BstEII*, analisadas após eletroforese em gel de agarose 0,6%. λ : marcador de peso molecular λ *HindIII*; 1: amostra de campo AA 05 (BHV-5a); 2: amostra de campo SV 136/88 (BHV-5a); 3: amostra de campo ISO 97/45 (BHV-5c); 4: amostra de campo ISO 97/87 (BHV-5c); 5: amostra de campo P96/169 (BHV-5a); 6: amostra de campo ISO 99/292 (BHV-5a). As diferenças entre os subtipos são destacadas pelas setas.

TABELA 2: Classificação das amostras de BHV-1 e BHV-5, segundo os perfis de restrição enzimática apresentado

Amostra viral	Caso clínico	Classificação por REA
<i>Los Angeles*</i>	IBR	BHV-1.1
<i>EVI 123/98</i>	IBR	BHV-1.1
<i>SV 265/96</i>	IBR	BHV-1.2a
<i>009</i>	sem sinais clínicos	BHV-1.2b
<i>A663*</i>	encefalite	BHV-5b
<i>SV 136/88</i>	encefalite	BHV-5a
<i>EVI 88/95</i>	encefalite	BHV-5a
<i>AA 05</i>	encefalite	BHV-5a
<i>ISO 99/292</i>	encefalite	BHV-5a
<i>P 96/169</i>	encefalite	BHV-5a
<i>ISO 97/45</i>	encefalite	BHV-5c
<i>ISO 97/87</i>	encefalite	BHV-5c

*amostras de referência

5. DISCUSSÃO

O Brasil possui o maior rebanho bovino comercial do mundo, possuindo atualmente 169,1 milhões de cabeças, sendo superado apenas pela Índia que, por dogma religioso, não explora comercialmente o seu rebanho. Em 1999, o consumo interno nacional de carne bovina teve um crescimento em torno de 2,47%, e um aumento nas exportações, ao redor de 7,76%, o que corresponde a aproximadamente 300 mil toneladas. Também é o quarto país consumidor de carne bovina e derivados (10% do total mundial), sendo o consumo *per capita* de 36,1 kg/ano (Zaidan, 2000).

O BHV-1 representa um importante agente infeccioso, que leva a elevadas perdas econômicas, prejudicando o desempenho da produção e grandes danos à bovinocultura mundial (Weiblen *et al.*, 1996; Van Oirschot, 1998).

Pouco se conhece sobre a epidemiologia do BHV-5 e, conseqüentemente, sobre sua importância na pecuária mundial. Isso se deve principalmente ao fato desse agente ter sido considerado um subtipo do BHV-1 até relativamente pouco tempo (Roizman *et al.*, 1992). Soma-se a isso a ocorrência da maioria dos episódios e surtos de encefalite herpética em rebanhos bovinos da Austrália e América do Sul (Carrillo *et al.*, 1983; Schudel *et al.*, 1986; Studdert, 1990, Weiblen *et al.*, 1996), sendo esporádicos os casos relatados nos EUA e Europa (Osório, 1998).

O presente estudo foi desenvolvido visando fornecer subsídios para análise de infecções por BHV-1 e BHV-5 e das características genômicas desses dois herpesvírus bovinos através da análise com enzimas de restrição. Devido a essa falta de informações sobre o BHV-5, e o crescente relato de epidemias de meningoencefalite por esse agente em várias regiões do Brasil (Weiblen *et al.*, 1989; Weiblen *et al.*, 1996; Salvador *et al.*, 1998), foi dado ênfase neste estudo em se conhecer o perfil de restrição enzimática principalmente das amostras de BHV-5 isoladas em nosso país, uma vez que, proporcionalmente, poucas amostras de BHV-1 foram analisadas.

A análise com enzimas de restrição (REA) têm sido uma técnica amplamente utilizada para a diferenciação genômica dos herpesvírus bovinos em vários países, como Canadá (Misra *et al.*, 1983), Suíça (Metzler *et al.*, 1985, 1986; Engels *et al.*, 1987), Austrália (Bulach & Studdert, 1990), Inglaterra (Edwards *et al.*, 1991), Rússia (Morozov *et al.*, 1991), Hungria (Magyar *et al.*, 1993), Estados Unidos (d'Offay *et al.*, 1993), Chile (Celedon *et al.*, 1994), Japão (Horiuchi *et al.*, 1995), Polônia (Rola & Zmudzinski, 1995), Argentina (Pidone *et al.*, 1999), dentre outros. No Brasil, Oliveira & Resende (1999) compararam uma amostra de BHV-1 e outra de BHV-5, utilizando enzimas *Bam*HI, *Eco*RI e *Hind*III, porém sem determinar seus possíveis subtipos.

Vários autores, baseados nas diferenças no perfil de restrição enzimática, têm sugerido nomenclaturas para a classificação do BHV-1 e BHV-5 em subtipos (Ludwig, 1983; Misra *et al.* 1983; Metzler *et al.* 1985, 1986). Apesar dessas designações não serem muitas vezes reconhecidas, representam importantes ferramentas no estudo da epidemiologia molecular do BHV-1 e BHV-5 (Metzler *et al.*, 1986; Engels *et al.*, 1987).

Em contraste à relativa facilidade de se obter a propagação do BHV-1 e BHV-5 em cultivo celular, com títulos que variaram de $10^{6,8}$ a $10^{7,8}$ DICC_{50%}/ml, algumas amostras deste estudo apresentaram um baixo rendimento em suas extrações, não se obtendo DNA íntegro suficiente para as clivagens. Várias amostras tiveram seu processamento repetido inúmeras vezes, com o intuito de se conseguir DNA em quantidade e qualidade suficientes para as clivagens. Portanto, nem todas as amostras processadas resultaram em clivagens satisfatórias, sendo que das 20 amostras inicialmente obtidas, 8 destas foram excluídas de nosso estudo por não apresentarem DNA íntegro suficiente para uma visualização nítida dos perfis, sendo possível a utilização de 12 amostras.

Com o objetivo de otimizar as técnicas para a obtenção do DNA viral, foram testados vários protocolos de concentração viral e de extração do DNA, com variações sugeridas pela literatura. Quanto à propagação e concentração viral, não se observou diferença nos produtos obtidos da ultracentrifugação com ou sem colchão de sacarose. Resultados semelhantes foram obtidos por Misra *et al.* (1983) e Horiuchi *et al.* (1995), utilizando apenas ultracentrifugação, e por Osório *et al.* (1985), Whetstone *et al.* (1986, 1993), Magyar *et al.* (1993) e Rola & Zmudzinski (1995), utilizando ultracentrifugação em colchão de sacarose.

No que diz respeito ao tempo de incubação com o tampão de lise na extração do DNA viral, muitos trabalhos utilizam o protocolo de extração que corresponde à incubação a 37°C por uma hora (Osório *et al.*, 1985; Sambrook *et al.*, 1989; Whetstone *et al.*, 1989a e b; Rola & Zmudzinski, 1995). Entretanto, em ambos os protocolos, 37°C por uma hora e 56°C por quinze minutos, obteve-se resultados satisfatórios, sendo que o método de concentração viral, através da ultracentrifugação não influenciou na qualidade do DNA extraído.

A seleção das enzimas a serem utilizadas para as clivagens das amostras foi feita através de suas citações na literatura para a tipificação do BHV-1 e BHV-5 (Engels *et al.*, 1981, 1986/87; Misra *et al.*, 1983; Metzler *et al.*, 1985, 1986; d'Offay *et al.*, 1993; Magyar *et al.*, 1993; Whetstone *et al.*, 1993). Como amostras de referência foram utilizadas as cepas *Los Angeles* de BHV-1 e *A663* de BHV-5, as quais também estão citadas na literatura em experimentos similares (Suarez-Heilen *et al.*, 1993; Pidone *et al.*, 1999).

A amostra *Los Angeles* foi isolada de um surto de IBR nos EUA no início dos anos 50, e é considerada protótipo do BHV-1.1. Já a classificação dos subtipos BHV-1.2a e 1.2b identificados no presente trabalho foi baseada em dados publicados na literatura. (Engels *et al.*, 1981, 1986; Horiuchi *et al.*, 1995; Metzler *et al.*, 1985; Magyar *et al.*, 1993; Van Oirschot *et al.*, 1995).

A amostra de BHV-5 *N569*, isolada por French (1962a) de uma caso de encefalite bovina, é considerada o protótipo para o BHV-5. Juntamente com a amostra encefalitogênica *A663*, estas correspondem às duas cepas bem caracterizadas do BHV-5 (d'Offay *et al.*, 1993). Em 1986, estas amostras foram caracterizadas por Metzler *et al.* pela análise com enzimas de restrição, sendo denominadas BHV-1.3a e 1.3b, respectivamente. Seguindo as modificações propostas por Roizman *et al.* (1992), utilizamos a nomenclatura de BHV-5a e 5b neste estudo, para as amostras encefalitogênicas que apresentaram os perfis genômicos correspondentes a estes subtipos. Como não foi possível adquirir a amostra *N569* para ser analisada neste estudo, os perfis de BHV-5a obtidos foram comparados com as caracterizações citadas na literatura, (Metzler *et al.*, 1986; d'Offay *et al.*, 1993).

Através dos perfis genômicos obtidos com as enzimas *HindIII* e *BstEII* foi possível determinar os tipos e subtipos aos quais pertencem as amostras de Herpesvírus Bovino

utilizadas neste experimento, como demonstrado no Esquema 1. Os perfis de restrição enzimática obtidos com a enzima *Bam*HI permitiram a análise das diferenças genômicas entre BHV-1 e BHV-5, mas não das variações de seus subtipos (figuras 5 e 6). Tais variações, para o BHV-1, mostraram-se muito discretas nos perfis obtidos com *Eco*RI (figura 5), e bastante evidentes nas clivagens com *Hind*III (figuras 5 e 7), como também demonstrado por Engels *et al.* (1981), Misra *et al.* (1983), Metzler *et al.* (1985) Gregersen *et al.* (1985) e Kennedy *et al.* (1986).

Para a determinação dos subtipos de BHV-5 a enzima *Bst*EII foi a única capaz de demonstrar diferenças entre os perfis de restrição das amostras encefalitogênicas (figuras 5, 6, 8, 9 e 10). Esses resultados são similares aos obtidos por Metzler *et al.* (1986), Engels *et al.* (1986/87), d'Offay *et al.* (1993) e Magyar *et al.* (1993). Whetstone *et al.* (1993) observaram diferenças entre os perfis dos subtipos de BHV-1 e 5 utilizando a enzima *Pst*I. Todavia os resultados alcançados no presente estudo com as clivagens por esta enzima não foram satisfatórios, tendo em vista que são gerados fragmentos muitos pequenos e de difícil resolução no gel de agarose, o que impossibilita uma visualização nítida do perfil obtido (Figura 5). Por isso, não foi possível uma classificação segura baseando-se nas diferenças entre os perfis resultantes da clivagem com esta enzima.

A amostra de referência para o BHV-1 *Los Angeles* (LA) manteve os mesmos perfis de restrição enzimática, típicos de BHV-1.1, que os demonstrados por Engels *et al.* (1981, 1986/87), Metzler *et al.* (1985), Magyar *et al.* (1993), e Horiuchi *et al.* (1995). Os perfis obtidos para a amostra de BHV-5 *A663* também não sofreram alterações, quando analisadas por diferentes autores (Metzler *et al.*, 1986; Engels *et al.*, 1986/87; Magyar *et al.*, 1993). Estes achados confirmam os relatos de que o genoma do BHV se mantém estável, não originando

mudanças nos perfis de REA após várias passagens *in vitro* em cultivo celular (Misra *et al.*, 1983; Whetstone *et al.*, 1989; Horiuchi *et al.*, 1995).

Na análise das amostras autóctones, a cepa *EVT 123/98*, isolada de um caso de IBR, apresentou um perfil de restrição compatível ao subtipo 1.1, ou seja, similar ao perfil da amostra de referência *LA*. Esse achado condiz com vários trabalhos que correlacionam o subtipo BHV-1.1 a casos de sintomatologia respiratória (Misra *et al.*, 1983; Gregersen *et al.*, 1985; Metzler *et al.*, 1985, Miller *et al.*, 1988), sendo chamado de subtipo "IBR-like" (Ludwig, 1983).

Todavia, outra amostra isolada de um caso de IBR, *SV 265/96*, apresentou um perfil compatível ao subtipo 1.2a (figura 7), quando comparada a amostras desse mesmo subtipo mostradas por Metzler *et al.* (1986) e Engels *et al.* (1986). O subtipo 1.2 é comumente relacionado a casos de IPV (Engels *et al.*, 1981, Whetstone *et al.*, 1989), tendo sido descrito por Ludwig (1983, 1984) como tipo "IPV-like" (tabela 1). Entretanto, outros autores relataram a associação desse subtipo (1.2a) também a outras enfermidades, como IBR e abortos, sugerindo a ausência de correlação estrita entre sintomatologia clínica e perfil genômico por REA e assim condizendo com os achados preliminares deste estudo. (Misra *et al.*, 1983; Metzler *et al.*, 1985, 1986; Kennedy *et al.*, 1986; Morozov *et al.*, 1991; Miller *et al.*, 1991; Magyar *et al.*, 1993; Christensen *et al.*, 1996).

Considerando o alto grau de similaridade encontrado nos genomas dos diferentes subtipos de BHV-1 e 5, a razão para os diferentes sinais clínicos apresentados ainda parece uma incógnita. Alguns autores sugerem que o tipo de enfermidade gerada pelo BHV-1 ou BHV-5 poderia estar relacionada muito mais com a rota de infecção e/ou outros fatores ambientais envolvidos, do que com as diferenças encontradas no perfil genômico dessas

amostras, ou ainda uma combinação de todos esses fatores (Engels *et al.*, 1986; Misra *et al.*, 1983; Pidone *et al.*, 1999; Seal & Whetstone, 1994).

Com relação ao perfil genômico da amostra de BHV-1 009, isolada de sêmen de um touro clinicamente sadio, foi encontrado similaridade dessa amostra com o subtipo 1.2b (figura 7), compatível com o perfil da amostra de referência K22, demonstrada por Engels (1986), e citada por Ludwig (1983) como "IPV-like". Esse achado condiz com os relatos encontrados, que descrevem a detecção no sêmen tanto do BHV-1.1 como do BHV-1.2b, a partir de touros com infecção subclínica e clínica de IBR ou IPB (Rola & Zmudzinski, 1995; Van Oirschot *et al.*, 1995). O BHV-1.2b é descrito como agente etiológico de surtos esporádicos de infecções genitais, bem como enfermidade respiratória branda (Edwards *et al.*, 1991), todavia parece não estar associado a infecções abortivas (Miller *et al.*, 1991).

Para as cepas encefalitogênicas AA 05, EVI 88/95, ISO 99/292, P 96/169 e SV 136/88, todos os perfis de restrição enzimática encontrados se mostraram compatíveis com os perfis de BHV-5 descritos na literatura (Brake & Studdert, 1985; Seal *et al.*, 1985; Engels *et al.*, 1986; Metzler *et al.*, 1986; Bulach & Studdert, 1990; Magyar *et al.*, 1989, 1993; d'Offay *et al.*, 1993; Seal & Whetstone, 1994; Pidone *et al.*, 1999). O perfil obtido dessas amostras utilizando-se a enzima *BstEII* indica a compatibilidade dessas ao perfil da cepa de referência australiana N569, diferindo da amostra argentina A663 (figuras 5, 6 e 8). Esses resultados confirmam os achados de Suarez-Heinlein *et al.* (1993), que analisaram amostras de BHV-1 e 5 isoladas na América do Sul. Nesta referência os pesquisadores também caracterizaram a amostra SV 136/88, a mesma utilizada em nosso estudo. Esses autores descrevem que a amostra SV 136/88 compartilha epítomos comuns com a cepa N569, demonstrado através da utilização de anticorpos monoclonais.

Adotando o critério de Metzler *et al.* (1985, 1986) modificado por Roizman *et al.* (1992), sugerimos a adoção da nomenclatura de "BHV-5a" para as amostras que apresentam o mesmo perfil genômico da cepa padrão australiana N569, e de "BHV-5b" às que correspondem ao padrão argentino da cepa A663 (tabela 2).

No caso das cepas encefalitogênicas ISO 97/45 e ISO 97/87, cujo perfil de restrição enzimática obtido com a enzima *BstEII* se mostra inédito e diferente de todos os perfis de BHV-5 descritos na literatura (esquema 1, figuras 9 e 10), poderíamos especular que se trata de um novo subtipo de BHV-5. Seguindo a mesma linha de raciocínio proposta por Metzler *et al.* (1985, 1986) e modificada por Roizman *et al.* (1992), poderíamos sugerir então a adoção da nomenclatura de "BHV-5c" para as amostras que apresentarem este perfil de restrição enzimática (tabela 2), mostrado pela primeira vez nessas duas amostras analisadas. Porém, para confirmar as diferenças dos perfis encontrados nas duas amostras denominadas de "BHV-5c", necessita-se de estudos filogenéticos mais acurados, como o sequenciamento das amostras, para verificar diversidades no genoma não expressas pela análise com enzimas de restrição.

O presente estudo teve um caráter pioneiro em relação a investigação molecular de amostras de Herpesvírus Bovino isoladas no Brasil, utilizando a técnica de análise com enzimas de restrição. Esta técnica, apesar de laboriosa, é segura e específica para a diferenciação de amostras de BHV-1 e BHV-5, bem como para a classificação de seus subtipos. Os resultados apresentados neste trabalho são no mínimo instigantes, merecendo um estudo mais abrangente quanto a distribuição dos subtipos de BHV-1 e 5 encontradas em nosso país.

6. CONCLUSÕES

- 6.1. A análise dos perfis de restrição enzimática obtidos com as enzimas *Hind*III e *Bst*II foi suficiente para se determinar a quais tipos e subtipos pertencem as amostras autóctones de BHV-1 e BHV-5 utilizadas neste estudo.
- 6.2. Todos os perfis de restrição enzimática encontrados para as amostras brasileiras mostraram-se compatíveis com os perfis de BHV-1 e BHV-5 descritos na literatura, com exceção dos perfis obtidos com a enzima *Bst*II para duas amostras encefalitogênicas.
- 6.3. Das sete amostras autóctones de BHV-5 analisadas, cinco apresentaram perfis de restrição enzimática similares ao da amostra australiana de referência N569, quando clivadas com a enzima *Bst*II, enquanto que as amostras ISO 97/45 e ISO 97/87 apresentaram um perfil genômico nunca antes demonstrado na literatura.
- 6.4. Com base no esquema proposto por Metzler *et al.* (1985, 1986), e modificado por Roizman *et al.* (1992), as amostras ISO 97/45 e ISO 97/87 seriam de um subtipo de BHV-5 distinto daqueles até o presente reconhecidos. Em consonância com este esquema, propõe-se que estas amostras sejam classificadas dentro de um novo subtipo, que seria denominado “BHV-5c”.

7. REFERÊNCIAS

- Achour HÁ & Moussa A. 1996. Serological and virological studies on the Infectious Bovine Rhinotracheitis in Algeria. *J. Vet. Med. B*, 43: 251-256.
- Ackermann M, Peterhans E & Wyler R. 1982. DNA of bovine herpesvirus type 1 in the trigeminal ganglia of latently infected calves. *Am. J. Vet. Res.*, 43(1): 36-40.
- Ackermann M & Wyler R. 1984. The DNA of an IPV strain of bovid herpesvirus type 1 in the sacral ganglia during latency after intravaginal infection. *Vet. Microbiol.* 9(1): 53-63.
- Ackermann M, Muller HK Bruckner L & Kihm U. 1990. Erradication of infectious bovine rhinotracheitis in Switzerland: review and prospects. *Vet. Microbiol.* 23: 365-370.
- Alice SJ. 1978. Isolamento do vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) no Brasil. *Rev. Bras. Biol.* 38: 919-920.
- Almeida RS. 1997. Produção e caracterização de anticorpos monoclonais contra antígenos do Vírus da Encefalite Bovina (BHV-5). *Tese de Mestrado*. Fac. Med. Vet. UFRGS, 74p.
- Anunciação AVM, Leite RC & Moreira EC. 1989. Presença de anticorpos para o herpesvírus bovino 1 (HVB 1) em bovinos nos Estados de Minas Gerais, Goiás e Rio de Janeiro através da prova de hemaglutinação passiva. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.* 41(5): 433-441.
- Ashbaugh SE, Thompson KE, Belknap EB, Schultheiss PC, Chowdhury S, Collins JK. 1997. Specific detection of shedding and latency of bovine herpesvirus 1 and 5 using a polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest.* 9(4):387-94.
- Babiuk LA, Lawman MJ & Ohmann HB. 1988. Viral-bacterial synergistic interaction in respiratory disease. *Adv. Virus Res.* 35:219-49.
- Bagust TJ & Clarke L. 1972. Pathogenesis of meningoencephalitis produced in calves by infectious bovine rhinotracheitis virus. *J. Comp. Pathol.* 89: 375-383.

- Barenfus M, Delli Quadri CA, McEntire, RW & Schroeder, RJ. 1963. Isolation of Infections Bovine Rhinotracheitis Virus from calves with meningoencephalitis. **J. Amer. Vet. Med. Ass.** 143: 725
- Bartha, A, Hajdú, G, Áldásy, P & Paczolay, G. 1969. Occurrence of encephalitis caused by Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus in calves in Hungary. **Acta Vet. Hung.** 19: 145-151.
- Bitsch, V. 1978. The P³⁷ modification of the infectious bovine rhinotracheitis virus-serum neutralization test. **Acta Vet. Scand.** 19: 497-505.
- Boelaert F, Biront P, Soumare B, Dispas M, Vanopdenbosch E, Vermeersch JP, Raskin A, Dufey J, Berkvens D, Kerkhofs P. 2000. Prevalence of bovine herpesvirus-1 in the Belgian cattle population. **Prev Vet Med.** 45(3-4):285-95.
- Brake, F & Studdert, MJ. 1985. Molecular epidemiology and pathogenesis of ruminant herpesviruses including bovine, buffalo and caprine herpesviruses 1 and bovine encephalitis herpesvirus (1985) **Aust. Vet. J.** 62: 331-334.
- Bratanich AC, Sardi SI, Smitsaart EN & Schudel AA, 1991. Comparative studies of BHV-1 variants by *in vivo* - *in vitro* tests. **J. Vet. Med. B.** 38: 41-48.
- Bulach DM & Studdert MJ. 1990. Comparative genome mapping of bovine encephalitis herpesvirus, bovine herpesvirus 1, and buffalo herpesvirus. **Arch. Virol.** 113:17-34.
- Bush CE & Pritchett RF. 1985. A comparison of the genome of Bovine Herpesvirus type 1 and Pseudorabies virus. **J. Gen. Virol.** 66: 1811-1817.
- Carrillo BJ, Ambroggi A, Schudel AA, Vazquez M, Dahme E & Porpischil A. 1983. Meningoencephalitis caused by IBR virus in Argentina. **J. Vet. Med. B.** 30:327-332.
- Celedon MO, Ojeda JM, Malmus C, Santibanez M, Berrios P. 1994. A comparison of restrictive endonuclease sites of bovine herpesvirus type 1 isolates in Chile. **J. Vet. Med. B.** 41(7-8): 460-6.

- Chowdhury SI, Lee BJ, Ozkul A & Weiss ML. 2000. Bovine herpesvirus 5 glycoprotein E is important for neuroinvasiveness and neurovirulence in the olfactory pathway of the rabbit. *J. Virol.* 74(5): 2094-106.
- Christensen LS, Madsen KG, Nylin B & Ronsholt L. 1996. A contribution to the systematization of bovine herpesvirus 1 based on genomic mapping by restriction fragment pattern analysis. *Virus Res.* 46(1-2): 177-82.
- Chung YT, Chang TY, Chang TJ & Wu FM. 1993. Detection of infectious bovine rhinotracheitis virus DNA by the nested double polymerase chain reaction method. *J. Chinese Soc. Vet. Sci.* 19(1): 26-37.
- Collins JL, Ayers VK, Whetstone CA & Van Drunen Littel-Van Den Hurk S. 1993. Antigenic differences between the major glycoproteins of bovine herpesvirus type 1.1 and encephalitis herpesvirus type 1.3. *J. Gen. Virol.*, 74: 1509-1517.
- Crandell RA, Ichimura H & Kit S. 1988. Isolation and comparative restriction endonuclease DNA fingerprinting of equine herpes-virus from cattle. *Am. J. Vet. Res.* 49: 1807-1813.
- Dawson PS, Darbyshire JH, Loosemore RM, Paterson AB & Faull WB. 1962. Infectious bovine rhinotracheitis (IBR). A clinical condition of cattle occurring in the United Kingdom. *Vet. Rec.* 74: 1379-1383.
- De Stefano E, Passos EC & Angerami AC. 1993. Levantamento sorológico de rinotraqueíte infecciosa bovina no município de Ibirubá, RS *In Reunião Anual do Instituto Biológico* 6:16 (resumo).
- d'Offay JM, Mock RE & Fulton RW. 1993. Isolation and characterization of encephalitic bovine herpesvirus type 1 isolates from cattle in North America. *Am. J. Vet. Res.* 54: 534-439.
- Edwards S, Newman RH & White H. 1991. The virulence of British isolates of Bovid Herpesvirus 1 in relationship to viral genotype. *Br. Vet. J.* 147: 216-232.
- Engels M, Steck F & Wyler R. 1981. Comparison of the genomes of . Infectious bovine rhinotracheitis and Infectious Pustular Vulvovaginitis virus strains by restriction endonuclease analysis. *Arch. Virol.* 67: 169-174.

- Engels M, Giuliani C, Wild P, Beck TM, Loepfe E & Wyler R. 1986. The genome of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) strains exhibiting a neuropathogenic potential compared to known BHV-1 strains by restriction site mapping and cross-hybridization. **Virus Res.** 6:57-73.
- Engels M, Loepfe E, Wild P, Schraner E & Wyler R. 1987. The genome of caprine herpesvirus 1: genome structure and relatedness to bovine herpesvirus 1. **J. Gen. Virol.** 68 : 2019-2023.
- Engels M & Ackermann M. 1996. Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. **Vet. Microbiol.** 53(1-2): 3-15.
- Eugster AK, Angulos AB & Jones LP. 1974. Herpesvirus Ancephalitis in Range Calves. **Proc. Ann. Mtg. Am. Assoc. Vet. Lab. Diagn.** 17: 267-290.
- Fenner, FJ, Gibbs, EPJ, Murphy, FA, Rott, R, Studdert, MJ & White, D.O. **Vet. Virol.** 2 ed. San Diego: Academic Press, 1993, 676 p.
- Forman AJ & Babiuk LA. 1982. Effect of infectious bovine rhinotracheitis virus infection on bovine alveolar macrophage function. **Infect. Immun.** 35(3): 1041-7.
- French EL. 1962a. A specific virus encephalitis in calves: isolation and characterization of the causal agent. **Aust. Vet. J.** 38 : 216-221.
- French EL. 1962b. Relationship between infectious bovine rhinotracheitis (IBR) virus and a virus isolated from calves with encephalitis. **Aust. Vet. J.** 38: 555-556.
- Friedli K & Metzler AE. 1987. Reactivity of monoclonal antibodies to proteins of a neurotropic bovine herpesvirus 1 (BHV-1) strain. **Arch. Virol.** 94 : 109-122.
- Galarza JM, Periolo OH 1983. Rinotraqueítis Infecciosa Bovina - Prevalencia en la Provincia de Formosa mediante la prueba de Inmunofluorescencia Indirecta. **Gazeta Vet.** 45: 1296-1300.

- Galvão CL. 1986. Diagnóstico da infecção genital do herpesvírus 1 (BHV-1) pelos métodos de isolamento e imunofluorescência direta. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.* 38(1): 92-94.
- Gewehr VR, Oliveira LG & Roehle PM. 1994. Isolamento de herpesvirus bovino tipo I (BHV-1) de casos de aborto e encefalite. *In VI Salão de Iniciação Científica da UFRGS.* Resumo 409, 123.
- Gregersen JP, Pauli G, Ludwig H. 1985. Bovine herpesvirus 1: differentiation of IBR- and IPV-viruses and identification and functional role of their major immunogenic components. *Arch Virol.* 84(1-2): 91-103.
- Greig AS, bannister CL, Mitchell D & Barker CAV. 1958. Cultivation in tissue culture of an infectious agent from coital exanthema of cattle. *Can J Comp Med*, 22: 119-122.
- Griffith IB, Gallego MI, Villamil LC. 1982. Factores de infertilidad y perdidas económicas en ganado de leche en Colombia. *In: Informe ICA-ANALC, 1924-1927.*
- Gibbs EPJ & Rweyemamu MM. 1977. Bovine Herpesvirus. Part I. Bovine herpesvirus 1. *Vet. Bull.* 47(5): 317-343.
- Guliani S & Sharma R. 1995. Experimental infections of lambs with bovine herpesvirus type 1 (BHV-1). *Int J Animal Sci*, 10: 73-75.
- Hage JJ, Vellema P, Schukken YH, Barkema HW, Rijsewijk FA, Van Oirschot JT & Wentink GH. 1997. Sheep do not a major role in bovine herpesvirus 1 transmission. *Vet. Microbiol.* 57:41-54.
- Horiuchi M, Yamazaki N, Furuoka H, Matsui T, Nakagawa M, Ishiguro N, Shinagawa M. 1995. Restriction endonuclease analysis of bovine herpesvirus type 1 isolates from calves with fatal encephalitis: comparison with vaccine virus. *J. Vet. Med. Sci*, 57 (3): 577-580.
- Johnston LAY & McGavin MD. 1962. A viral meningoencephalitis in calves. *Aust. Vet. J.* 38:207-215.
- Kahrs, R.F. 1977. Infectious bovine rhinotracheitis: a review and update. *J.A.V.M.A.*, 171(10): 1055-1064.

- Kataria R & Rai A. 1992. Characterization of bovine herpesvirus-1 on the basis of restriction enzyme *Hind* III pattern of its DNA. **Indian J. Virol.** 8 : 22-26.
- Kendrik JW, Gillespie JH, McEntree K. 1958. Infectious pustular vulvovaginitis of cattle. **Cornell Vet.** 48: 458-495.
- Kennedy TP, Evermann JF, Cheevers WP. 1986. Restriction endonuclease patterns of bovine herpesvirus type 1 isolated from mammary gland. **Am. J. Vet. Res.** 47(12): 2525-2529.
- Leung-Tack P, Audonnet J-C & Riviere M. 1994. The complete DNA sequence and the genetic organization of the short unique region (U_S) of the bovine herpesvirus type 1 (ST strain). **Virology.** 199 : 409 - 421.
- Lorenz RJ & Bögel K. 1973. Methods of calculation *In Laboratory Techniques in Rabies*. Kaplan MM and Koprowsky H (eds) . World Health Organization. Geneva. 321-355.
- Lovato LT, Weiblen R, Tobias FL & Moraes MP. 1995. Herpesvírus bovino tipo 1 (HVB 1): inquérito soro-epidemiológico no rebanho leiteiro do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural** 25(3): 425-430.
- Ludwig, H. 1983. Bovine herpesviruses. In: Roizman, B. (Ed.) **The Herpesviruses**. Boston: Plenum Press. 2: 135-214.
- Ludwig H. 1984. Herpesviruses of bovidae: The characterization, grouping and role of different types, including latent viruses. In: Wittman G, Gaskell RM, Rziha HJ, eds. **Latent herpes virus infections in veterinary medicine**. Boston: Martinus Nijhoff Publishers, 171-189.
- Madigan MT, Martinko JM & Parker J. 2000. **Brock Biology of Microorganisms**. 9th.ed, 991p.
- Madin SH, York CJ, & Mckercher DG (1956) Isolation of Infectious bovine rhinotracheitis virus. **Science** 124: 721-722.
- Magyar G, Benko M, Harrach B, Kucsera L, Bartha A. 1989. DNA restriction enzyme analysis of a bovine herpesvirus 1 strain isolated from encephalitis in Hungary. **Acta Vet. Hung.** 37(4): 349-352.

- Magyar G, Tanyi J, Hornyak A, Bartha A. 1993. Restriction endonuclease analysis of Hungarian bovine herpesvirus isolates from different clinical forms of IBR, IPV and encephalitis. **Act. Vet. Hung.** 41(1-2): 159-170.
- Maisonave J. 1998. Situación de BHV-1 en Uruguay. In: **Simpósio Internacional sobre Herpesvirus Bovino e Vírus da Diarréia Viral Bovina**. Santa Maria, RS, Brasil. 113-115.
- Masri SA, Olson W, Nguyen PT, Prins S, Deregt, D. 1996. Rapid detection of bovine herpesvirus 1 in the semen of infected bulls by a nested polymerase chain reaction assay. **Can. J. Vet. Res.** 60(2): 100-107.
- Mayfield JE, Good PJ, Van Oort HJ, Campbell AR & Reed DE. 1983. Cloning and cleavage site : mapping of DNA from BHV-1 (Cooper strain). **J. Virol.** 47: 259-264.
- Méndez MC, Riet -Correa F, Schild AI 1987. Laboratório Regional de diagnóstico. **Doenças diagnosticadas no ano 1986**. Editora da universidade, Pelotas, RS, 30p.
- Meyer G, Lemaira M & Lykaru J. 1996. Establishment of a rabbit model for bovine herpesvirus type 5 neurological acute infection. **Vet. Microbiol.** 51: 27-40.
- Metzler AE, Matile H, Gassmann U, Engels M, Wyler R. 1985. European isolates of bovine herpesvirus 1: a comparison of restriction endonuclease sites, polypeptides, and reactivity with monoclonal antibodies. **Arch. Virol.** 85: 57-69.
- Metzler AE, Schudel AA, Engels M. 1986. Bovine Herpesvirus 1: molecular and antigenic characteristics of variant viruses isolated from calves with neurological disease. **Arch. Virol.** 87: 205-217.
- Miller NJ. 1955. Infectious necrotic rhinotracheitis of cattle. **J.A.V.M.A.**, 126: 463-467.
- Miller JM, Van der Maaten MJ, Whetstone CA. 1988. Effects of a bovine herpesvirus-1 isolate on reproductive function in heifers: classification as a type-2 (infectious pustular vulvovaginitis) virus by restriction endonuclease analysis of viral DNA. **Am J Vet Res.** 49(10): 1653-6.
- Miller JM. 1991. The effects of IBR virus infections on reproductive function of cattle. **Vet. Med.** 86(1): 790-794.

- Misra V, Babiuk LA & Darcel CQ. 1983. Analysis of Bovine Herpesvirus type 1 isolates by Restriction Endonuclease Fingerprinting. **Arch. Virol.** 76: 341-354.
- Moretti B, Orfei Z, Mondino G & Perschino A. 1964. Infectious Bovine Rhinotracheitis clinical observations and isolation of virus. **Vet. Italiana**, 15: 676.
- Morosov IA, Shuliak AF, Artiushin SK, Koromyslov GF. 1991. Differentiation of strains of bovine infectious rhinotracheitis virus using restriction analysis. **Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol**, 4: 29-32.
- Mueller SBK, Ikuno HA, Campos MTGR & Ribeiro LOC. 1978. Isolamento e identificação da rinotraqueíte infecciosa dos bovinos, de um rim de feto bovino (IBR/IPV). **Arq. Inst. Biológico (São Paulo)** 45: 187-190.
- Nettleton PF, Sharp JM, Herring AJ & Herring JÁ. 1984. Infectious bovine rhinotracheitis virus excretion after vaccination, challenge and immunosuppression. In: Wittman G, Gaskell RM, Rziha HJ, eds. **Latent Herpes Virus Infections in Veterinary Medicine**, Boston: Martinus Nijhoff Publishers, 191-209.
- Nyaga PN, McKercher DG. 1979. Pathogenesis of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) infections: interactions of the virus with peripheral bovine blood cellular components. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis.** 2(4): 587-602.
- Nogueira FRC, Camargo AJR, Resende DA. 1986. Ocorrência de rinotraqueíte infecciosa/vulvovaginite pustular infecciosa bovina no Estado do Rio de Janeiro. **PESAGRO. Comunicado Técnico n.167**, Rio de Janeiro, RJ, 1-5.
- Obando C, Baule C, Pedrique C, Veracierta C, Belak S, Merza M, Moreno-Lopez J. 1999. Serological and molecular diagnosis of bovine viral diarrhoea virus and evidence of other viral infections in dairy calves with respiratory disease in Venezuela. **Acta Vet Scand.** 40(3):253-62.
- Oliveira ME & Rezende M. 1999. Comparison between bovine herpesvirus 1 and 5 by restriction endonuclease analysis. **Virus Rev & Res**, 80.
- Osorio FA, Reed DE, Van der Maaten MJ & Metz CA. 1985. Comparison of the herpesviruses of cattle by DNA restriction endonuclease analysis and serologic analysis. **Am. J. Vet. Res.** 46: 2104-2109.

- Osorio FA. 1998. Status of Bovine Herpesvirus 1 Infections in North America. In: **Simpósio Internacional sobre Herpesvirus Bovino e Vírus da Diarréia Viral Bovina**. Santa Maria, RS, Brasil. p 73-74.
- Pauli G, Gregersen JP, Storz J, Ludwig H. 1984. Biology and molecular biology of latent bovine herpesvirus type 1 (BHV-1). In: **Latent Herpesvirus Infections in Veterinary Medicine** (Wittmann G, Gaskell RM, Rziha HJ eds.), p. 229-239.
- Pidone CL, Galosi CM, Echeverria MG, Noretto EO, Etcheverrigaray ME. 1999. Restriction endonuclease analysis of BHV-1 and BHV-5 strains isolated in Argentina. **J. Vet. Med. B.** 46(7):453-6.
- Pignatti PF, Cassai E, Meneguzzi G, Chenciner N, Milanesi G. 1979. Herpes simplex virus DNA isolation from infected cells with a novel procedure. **Virology** 93: 260-264.
- Pituco EM, De Stefano E & Passos EC. 1993. Diagnóstico sorológico da rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) no período de 1988 a 1992. **Reunião Anual do Instituto Biológico**, p.16 (resumo).
- Porterfield JS. 1989. **Andrews's viruses of vertebrates**. 5 ed. London: Baillière Tindall, 457p.
- Ravazzolo AP, Dal Pizzol M & Moojen V. 1989. Evidência da presença de anticorpos para o vírus da rinotraqueíte infecciosa dos bovinos em alguns municípios do Estado do Rio Grande do Sul. **Arq. Fac. Vet. UFRGS** 17: 95-98.
- Riedmann S, Reinhardt G, Tadich N, Aguilar M, Aguilar R, Montecinos MI, Miranda JC. 1996. Soroprevalencia de VDBD, VHB-1, PI-3 y VRSB en 12 predios lecheros de la Provincia de Valdivia, Chile. **Arch. Med. Vet.** 28 (1): 121-124.
- Riet-Correa F, Schild AL, Mendez ME *et al.* (1989) Meningoencefalite e necrose do córtex cerebral em bovinos causada por herpesvírus bovino-1. **Pesq. Vet. Bras.** 9:13-16.
- Rijsewijk FA, Kaashoek MJ, Langeveld JP, Meloen R, Judek J, Bienkowska-Szewczyk K, Maris-Veldhuis MA, van Oirschot JT. 1999. Epitopes on glycoprotein C of bovine

herpesvirus-1 (BHV-1) that allow differentiation between BHV-1.1 and BHV-1.2 strains. **J Gen Virol.** 80(6):1477-83.

Rimstad E, Krona R & Hyllseth B. 1992. Comparison of herpesvirus isolated from reindeer, goats, and cattle by restriction endonuclease analysis. **Arch. Virol.** 123(3/4) : 389-397.

Roehe PM, Edwards S & Ibata G. 1994. Comparison of pestivirus multiplication in cells of different species origin. **Res. Vet. Science** 57(2): 210-214.

Roehe PM, Silva TC, Nardi NB, Oliveira LG & Rosa JCA. 1997 Diferenciação entre o vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (BHV-1) e o herpesvírus da encefalite bovina (BHV-5) com anticorpos monoclonais. **Pesq. Vet. Bras.** 17(1): 41-44.

Roizman B, Desrosiers RC, Fleckenstein B, Lopez C, Minson AC & Studdert MJ. 1992. The family Herpesviridae : an update. **Arch. Virol.** 123: 425-448.

Rola J & Zmudzinski J. 1995. Classification of bovine herpesvirus 1 strains isolated from bovine semen by restriction enzyme analysis. In: **Proc. 3rd Congress Europ. Soc. Vet. Virol.**, 164-167.

Rosa JA, Bangel E, Martins RM, Oliveira LG & Roehe PM. 1992. Anticorpos contra o vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) no Rio Grande do Sul. **Anais do XI Congresso Estadual de Medicina Veterinária.** Gramado, RS (resumo p. 86).

Salvador SS, Lemos RAA, Riet-Correa F, Roehe PM & Osório ALAR. 1998. Meningoencefalite causada por herpesvírus bovino tipo 5 no Mato Grosso do Sul e São Paulo. **Pesq. Vet. Bras.**, 18(2): 75-82.

Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2^{ed} edição. **Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y., USA.**

Schild AL, Riet-Correa F, Pereira DB. 1994. Doenças diagnosticadas pelo Laboratório Regional de Diagnóstico em 1993. **Boletim do Laboratório Regional de Diagnóstico** 14:23-26.

- Schudel AA, Carrillo BJ, Wyler R & Metzler AE. 1986. Infections of calves with antigenic variants of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) and neurological disease. **J. Vet. Med. B** 33:303-310.
- Seal BS, Jeor SCST & Taylor REL. 1985. Restriction endonuclease analysis of Bovine herpesvirus 1 DNA and nucleic acid homology between isolates. **J. Gen. Virol.** 60: 2787-2792.
- Seal BS, Whetstone CA. 1994. Immediate-early gene expression and gene mapping comparisons among isolates of bovine herpesvirus 1 and 5. **Vet Microbiol.** 38(4): 369-84.
- Shankar H. & Yadav M.P. 1987 Experimental infection of sheep with BHV-1 (IBR/IPV virus) and its possible role in epizootiology. **Indian Vet. Med. J.** 11:71-76.
- Silva TC. 1995. Produção e caracterização de anticorpos monoclonais contra o herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1). **Tese de mestrado.** Fac. Med. Veterinária UFRGS, 73p.
- Silva A M, Flores EF, Weiblen, R, Botton SA, Irigoyen LF, Roehe PM, Brum MC, Canto MC. 1998. Infecção aguda e latente em ovinos inoculados com o herpesvírus bovino tipo 5 (BHV-5). **Pesq. Vet. Bras.**, 18(3-4): 99-106.
- Silva A M, Flores EF, Weiblen, R, Canto MC, Irigoyen LF, Roehe PM, Sousa RS. 1999. Pathogenesis of meningoencephalitis in rabbits by bovine herpesvirus type-5 (BHV-5). **Rev. Microbiol.** 30(1): 22-31.
- Simard C, LaBoissiere S, Seguin C & Trudel M. 1991. Genomic heterogeneities in bovine herpesvirus type 1 viral isolates: A major variant selected from a field isolate. **Inter. Virol.** 32(3): 117-126.
- Smith GA, Young PL & Reed KC. 1995. Emergence of a new bovine herpesvirus 1 strain in Australian feedlots. **Arch. Virol.** 140: 599-603.
- Spear PG. 1993. Entry of alphaherpesviruses into cells. **Seminar in Virology** 4:167-180.
- Straub OC. 1978. Incidence of IBR-IPV-induced diseases and possible differential-diagnostic problems in various continents and countries. **Dtsch Tierarztl Wochenschr.** 85(3): 84-90.

- Studdert MJ, Brake F & Browning GF. 1987. Bovine encephalitis herpesvirus is different from bovine herpesvirus 1 and from other ruminant herpesvirus. **Aust. Vet. J.** 149 - 150.
- Studdert MJ. 1990. Bovine encephalitis herpesvirus. **Vet. Rec.** 126(1): 21-22.
- Suarez-Heinlen AS, Metzler AE, Weiblen R, Berrios P, Schudel AA, Rodriguez M. 1993. Molecular characterization of South American Bovine Herpesvirus 1 isolate with monoclonal antibodies and SDS-PAGE. **J. Vet. Med.** 40 (2): 125-130.
- Tikoo SK, Campos M & Babiuk LA. 1995. Bovine herpesvirus 1 (BHV-1): biology, pathogenesis, and control. **Adv. Virus Res.**, 45, 191-223.
- Van Oirschot JT, Straver PJ, Van Lieshout JA, Quak J, Westenbrink F, Van Exsel AC. 1993. A subclinical infection of bulls with bovine herpesvirus type 1 at an artificial insemination center. **Vet. Rec.**, 132(2): 32-35.
- Van Oirschot JT, Rijsewijk FAM, Straver PJ, Ruuls RC, Quak J, Westenbrink F, Gielkens ALJ, Van Dijk JE, Moerman A. 1995. Virulence and genotype of a bovine herpesvirus 1 isolate from semen of a subclinically infected bull. **Vet. Rec.**, 137: 235-239.
- Van Oirschot JT. 1998. The BHV-1 situation in Europe. In: **Simpósio Internacional sobre Herpesvirus Bovino e Vírus da Diarréia Viral Bovina**. Santa Maria, RS, Brasil. p 69-72.
- Varady E, Tuboly T & Derbyshire JB. 1994. Restriction endonuclease analysis of a porcine isolate of bovine herpesvirus type 1. **Can. Vet. J.** 58 : 65-66
- Vasconcellos RO, Varaschin MS, Wauters F. 1993. Meningoencefalite por herpesvírus. In: **Encontro nacional de patologia Veterinária**, Anais, Santa Maria, p.11.
- Vidor T, Halfen DC, Leite TE & Coswig LT. 1995. Herpesvirus bovino tipo 1 (BHV 1): sorologia de rebanhos com problemas reprodutivos. **Ciência Rural**. 25 : 421-424.

- Wagter LHA, Glas RD, Bleumink-Pluym N, Van Engelenburg FAC, Rijsewijk FAM, Houwer DJ. 1996. A polymerase chain reaction (PCR) assay for the detection of bovine herpesvirus 1 (BHV1) in selectively digested whole bovine semen. **Vet. Res. Communic.** 20(4): 401-408.
- Weiblen R, Barros CSL, Canabarro TF. 1989. Bovine meningoencephalitis from IBR virus. **The Veterinary Record** 124:666-667.
- Weiblen, R. 1992a. Doenças Víricas que interferem na Produção Leiteira. In: Charles, T.P. & Furlong, J. (Eds.). **Doença dos bovinos de leite adultos**. Coronel Pacheco: EMBRAPA-CNPGL, 45-62.
- Weiblen R, Kreutz LC, Canabarro TF, Schuch LF & Rebelatto MC. 1992b. Isolation of Bovine Herpesvirus 1 from Preputial Swabs and Semen of Bull with Balanopostitis. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, 4: 341-343.
- Weiblen R, Moraes MP, Rebelatto MC, Lovato LT, Canabarro TF. Bovine herpesvirus isolates. **Revista de Microbiologia**, 27: 208-211, 1996.
- Whetstone CA, Wheeler JG, Reed DE. 1986. Investigation of possible vaccine-induced epizootics of infectious bovine rhinotracheitis, using restriction endonuclease analysis of viral DNA. **Am J Vet Res.** 47(8):1789-95.
- Whetstone CA, Miller JM, Bortner DM & Van Der Maaten MJ. 1989. Changes in the bovine herpesvirus 1 genome during acute infection, after reactivation from latency, and after superinfection in the host animal. **Arch. Virol.**, 106: 261-279.
- Whetstone CA, Seal BS & Miller JM. 1993. Variability occurs in the inverted repeat region of genomic DNA from bovine herpesvirus 1 respiratory, genital e bovine herpesvirus 5 encephalitic isolates. **Vet. Microbiol.**, 38: 181-189.
- Wizigmann G, Vidor T & Ricci ZM. 1972. Investigações sorológicas sobre a ocorrência e incidência dos vírus PI-3, IBR e diarreia a vírus enfermidade das mucosas dos bovino no Estado do Rio Grande do Sul. **Boletim do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor**. 1: 52-58.

- Xia JQ, Lofstedt RM, Yason CV, Kibenge FSB. 1995. Detection of bovine herpesvirus 1 in the semen of experimentally infected bulls by dot-blot hybridization, polymerase chain reaction and virus isolation. **Res. Vet. Sci.**, 59(2): 183-185.
- Yason CV, Harris LM, McKenna PK, Wadowska D, Kibenge FSB. 1995. Establishment of conditions for the detection of bovine herpesvirus-1 by polymerase chain reaction using primers in the thymidine kinase region. **Can. J. Vet. Res.**, 59(2): 94-101.
- Yates WD. 1982. A review of infectious bovine rhinotracheitis, shipping fever pneumonia and viral-bacterial synergism in respiratory disease of cattle. **Can J Comp Med.** 46(3):225-63.
- York CJ, Schwarz AJF, Estela LA. 1957. Isolation and identification of bovine rhinotracheitis virus in tissue culture. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** 94: 740-744.
- Zaha A (coord). 2000. **Biologia Molecular Básica**. 2ª ed, Porto Alegre, 336p.
- Zaidan J. 2000. In: <http://www.abcz.org.br/informat/>. **Informativo ABCZ - Jornal Oficial da Associação Brasileira dos Criadores de Zebu**, ano 15 - 150 - Fevereiro/Março de 2.000. Acessado