

SERGIO MORAES AOKI

**DESENVOLVIMENTO DE NOVAS
METODOLOGIAS PARA A IDENTIFICAÇÃO E
CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE
HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 1 (BHV-1)**

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para a obtenção do título de **Doutor em Ciências Biológicas**, área de Concentração: Genética.

**BOTUCATU – SP
Fevereiro / 2006**

**DESENVOLVIMENTO DE NOVAS
METODOLOGIAS PARA A IDENTIFICAÇÃO E
CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE
HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 1 (BHV-1)**

SERGIO MORAES AOKI

Orientador: Prof. Dr. José Fernando Garcia

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Botucatu, para a obtenção do Título de **Doutor em Ciências Biológicas**, Área de Concentração: Genética.

**BOTUCATU – SP
Fevereiro / 2006**

Dedicatória

Aos meus pais Kanyti e Maria das Graças, e aos meus irmãos Sandro e Renato por todo amor e apoio incondicional.

Aos amigos que de alguma forma estiveram presentes nesta jornada, pelo carinho, apoio e confiança.

À minha companheira Fernanda, pelo amor, carinho, dedicação e paciência.

Agradecimientos

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que contribuíram de alguma maneira no processo de desenvolvimento deste trabalho e em meu aprendizado acadêmico, especialmente:

Ao amigo, professor e orientador Prof. Dr. José Fernando Garcia, pela orientação desde as épocas de Iniciação Científica, amizade, apoio, discussões, compreensão, paciência e especialmente pela confiança profissional e acadêmica em mim depositadas.

À Profa. Dra. Cárís Maroni Nunes, por ter sido por diversas vezes a mãe do LBBMA, pelas aulas particulares de Epidemiologia, pelo auxílio pessoal em momentos difíceis e incentivos constantes.

Ao Prof. Dr. Paulo Michel Roehle, por ceder um pouquinho do grande conhecimento, pelas estirpes de referência e isolados virais, pelo auxílio laboratorial e pela ajuda em momentos cruciais do projeto.

À Profa. Dra. Luzia Helena Queirós da Silva, pelo companheirismo profissional e auxílio acadêmico.

À grande amiga Anna Paula Oliveira e companheiros do Laboratório de Virologia do IPVDF- Eldorado do Sul- RS, pela grande contribuição e paciência pelas horas de discussões ao MSN messenger e ao celular.

A todos os professores, funcionários do Departamento de Genética pelos ensinamentos, apoio e amizade.

Aos muitos colegas e companheiros de disciplinas de pós-graduação pelos vários favores prestados.

Aos funcionários da Seção de Pós-graduação do Instituto de Biociências – UNESP, Botucatu por todos os trabalhos prestados.

Ao curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Odontologia- Unesp- Araçatuba, onde me graduei e está situado o LBBMA, local de desenvolvimento do presente trabalho.

Ao Frigorífico Bertin de Lins, onde foram colhidas as amostras de leucócitos e gânglios trigeminais, em especial aos Médicos Veterinários do Serviço de Inspeção Federal Drs. Paulo Domingos Lopes, Luiz César Bom e Gisele.

A todas as amigas e amigos do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular Animal pela boa convivência laboratorial e pelos momentos de empenho com o LBBMA: Ariadne, Eduardo, Glenda, Zanon, Paula, Marcella, Francine, Lígia, Rodriguinho, Lígia, Fabinho, Elda, Fabiane, Lúcia, Alexéia, Valéria, Sílvia, Heleno, Érica, Valquíria, Luciana e Cláudia.

Ao “grande” Pedro Florindo (Tatu), pela amizade, risadas e auxílios intra e extralaboratoriais.

Aos meus amigos irmãos Marcos Roberto (Bunda), Mário Vidermann (Denver), Rodrigo Lemos (Campinas), Daniel Sia (Oscar), Gustavo Arbex (Turco) e Laércio Porto (Juquinha) com os quais tive o prazer de dividir o teto por agradáveis anos.

Aos Drs. Luiz Cláudio Mendes (Tio Luigi) e Juliana Peiró (Tia Maligna), por todo auxílio e horas de agradáveis conversas sempre acompanhadas de muita comida e boa bebida.

Aos Médicos Veterinários Alexandre Craveiro (Rrrráu), Giuliano Negrelli (Giu), Marcos Inoue (Sofia) e Andrei, amigos da Rep’Intão.

Ao amigo Mauro Massaharo Nakano (Takeu), pela estadia em Penápolis-SP e pelo auxílio durante a colheita das amostras do experimento.

Ao amigo contemporâneo de graduação e pós-graduação Gustavo Arbex Avelar (Turco), que compartilhou grande parte das situações de adversidades durante todo este período de aprendizagem.

Ao amigo contemporâneo de LBBMA Laércio Porto Neto (Juquinha), pela força, incentivo e companheirismo. Valeu “de verdade”!

Aos meus amigos José Eduardo Zanon e Welson Galhardo, que fatalmente pensaram que eu iria esquecê-los.

À minha grande companheira de todas as horas, amiga e namorada Fernanda Ribeiro da Silva, por permitir fazer parte de sua vida, por todo amor e constantes demonstrações de alegria, companheirismo, paciência e respeito.

Aos meus sobrinhos Matheus, Bia e Carol, minhas preciosidades, por lembrar sempre ao titio que a vida é dinâmica e que novas coisas se aprendem a todo o momento.

Aos meus irmãos Sandro e Renato, pela nossa infância feliz, amizade inabalável e indiscutível, respeito mútuo e principalmente pelo amor que possuímos uns pelos outros.

Aos meus pais, pelas pessoas maravilhosas que são, por todo amor, carinho, paciência, esforço e dedicação que têm desprendido por mim e pelos meus irmãos.

A todos da minha família, em especial, a um eterno amigo e tio (Avelino) com quem muito aprendi sobre alegria e de quem tenho muitas saudades.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de estudos e suporte financeiro do projeto (nº 02/08369-9).

RESUMO

AOKI, S. M. **Identificação e Caracterização Genética de Herpesvírus Bovino Tipo 1 (BHV-1)** [Identification and Genetic Characterization of Bovine Herpesvirus Type 1 (BHV-1)]. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Departamento de Genética, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2006.

O Herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1), membro da subfamília *Alphaherpesvirinae*, gênero *Varicellovirus*, está disseminado mundialmente e tem sido motivo de grande preocupação para criadores e autoridades sanitárias de vários países. Este vírus pode causar a rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), vulvovaginite pustular infecciosa (IPV), balanopostite pustular infecciosa (IPB), conjuntivite e infecções sistêmicas, sendo o aborto uma das conseqüências mais frequentes. O impacto econômico desta enfermidade é observado pelo retardo do crescimento de animais jovens, menor produção leiteira, morte embrionária e fetal, abortamento, com maior freqüência no segundo e terceiro trimestres de gestação, eficiência reprodutiva de matrizes e touros reduzida, além das restrições ao comércio internacional de animais vivos e seus produtos tais como sêmen e embriões, previstas no Código Internacional de Saúde Animal. Planos de controle e erradicação do vírus têm sido aplicados em alguns países da União Européia através da utilização de vacinas com genes deletados, que permitem a diferenciação entre animais naturalmente infectados e vacinados. O presente estudo teve como objetivo desenvolver ferramentas de diagnóstico e caracterização do BHV-1 baseadas na análise do DNA, que auxiliassem no aprimoramento dos programas de controle e erradicação desse vírus nos rebanhos bovinos. Para isso, foi desenvolvido um teste de nested PCR fluorescente para um fragmento do gene timidina quinase (TK) que permite a detecção e discriminação entre BHV-1 e BHV-5. Foram colhidas 100 amostras de gânglios trigeminais e leucócitos de fêmeas bovinas abatidas em frigorífico, sem histórico de vacinação prévia para BHV-1 e que não apresentavam sinais clínicos da doença. Foi possível diagnosticar BHV-1 por nested PCR fluorescente em 32 amostras de leucócitos e BHV-1 e/ou BHV-5 em 56 gânglios trigeminais, posteriormente confirmados por seqüenciamento direto. Objetivando oferecer uma ferramenta alternativa para identificação viral, foram realizadas análises *in silico* para busca de regiões repetitivas de tamanho variável (VNTR) candidatas no genoma do BHV-1 (NC_001847 GenBank). Esta análise revelou 53 candidatos, dos quais 3 foram selecionados para amplificação por PCR e análise por eletroforese capilar. A utilização de oligonucleotídeos iniciadores flanqueando as 3 regiões selecionadas permitiu a identificação e agrupamento de 10 estirpes de BHV-1 e uma de BHV-5, mostrando a conservação dessas regiões entre os dois tipos virais. Com base nos dados apresentados sugere-se a aplicação dessa ferramenta em estudos de evolução e epidemiologia viral.

Palavras-chave: BHV-1, PCR, VNTR, DNA repetitivo, BHV-5.

ABSTRACT

AOKI, S. M. **Identification and Genetic Characterization of Bovine Herpesvirus Type 1 (BHV-1)** [Identificação e Caracterização Genética de Herpesvírus Bovino Tipo 1 (BHV-1)]. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Departamento de Genética, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2006.

Bovine Herpesvirus 1 (BHV-1), *Alphaherpesvirinae* subfamily member, *Varicellovirus* genus, is spread worldwide causing awareness among breeders and sanitary authorities in several countries. This virus can cause the infectious bovine rinotracheitis (IBR), infectious pustular vulvovaginitis (IPV), infectious pustular balanopostitis (IPB), conjunctivitis and systemic infections, with abortion as one of the main consequences. Economic impact of this sickness is observed by growth retard in young animals, decrease on milk production, embryonary and fetal death, abortions, mostly in the second and third trimesters of gestational period, losses in cow and bull's reproductive efficiency, beyond restrictions on international trade of live animals and their semen and embryos, as regulated by the International Animal Health Code (OIE, 2005). Control and eradication programs have been applied in European Community by vaccination with strains possessing deleted genes, allowing differentiation between naturally infected and vaccinated animals. This study aimed to develop DNA-based diagnostic and characterization tools for BHV-1, which could help in improving virus control and eradication programs in cattle herds. For this purpose, a fluorescent nested PCR test targeting thymidine kinase (TK) gene was developed, allowing virus detection and BHV-1/BHV-5 discrimination. One hundred trigeminal ganglia and leukocyte samples were collected from slaughtered cows, without previous BHV-1 vaccination record and without presence of clinical signals of disease. Fluorescent nested PCR permitted BHV-1 diagnosis from 32 leukocyte samples and BHV-1 and/or BHV-5 from 56 trigeminal ganglia, with subsequent confirmation by direct sequencing. Aiming to offer an alternative tool for viral identification, were performed *in silico* analysis in order to search variable number of tandem repeats (VNTR) candidates in BHV-1 genome (NC_001847 GenBank). This analysis has generated 53 candidates, where 3 were selected for PCR amplification and capillary electrophoresis. The use of primers flanking the 3 selected regions enables us to identify and group 10 BHV-1 and one BHV-5 strains, revealing the region conservation among the two viral types. Based on the presented data we suggest the application of this tool as alternative to classical methods in viral evolutionary and epidemiological studies.

Key-words: BHV-1, PCR, VNTR, repetitive DNA, BHV-5.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	8
REFERÊNCIAS	9

ARTIGOS VERSÃO EM PORTUGUÊS

DETECÇÃO DE HERPESVÍRUS BOVINO EM LEUCÓCITOS DE SANGUE PERIFÉRICO DE BOVINOS DE FRIGORÍFICO POR NESTED PCR FLUORESCENTE COMO UMA POTENCIAL FERRAMENTA PARA ESTUDOS EPIDEMIOLÓGICOS.....	15
RESUMO	15
INTRODUÇÃO.....	16
MATERIAL E MÉTODOS	19
RESULTADOS	25
DISCUSSÃO.....	27
AGRADECIMENTOS	31
REFERÊNCIAS	31
FIGURAS E TABELAS	36
REGIÕES REPETITIVAS DE TAMANHO VARIÁVEL (VNTRS) NO GENOMA DO HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 1 (BHV-1) COMO POTENCIAL FERRAMENTA EM IDENTIFICAÇÃO VIRAL.....	41
RESUMO	41
INTRODUÇÃO.....	42
MATERIAL E MÉTODOS	44
RESULTADOS	47
DISCUSSÃO.....	48
AGRADECIMENTOS	50
REFERÊNCIAS	51
FIGURAS E TABELAS	53

ARTIGOS VERSÃO EM INGLÊS

DETECTION OF BOVINE HERPESVIRUS IN PERIPHERAL BLOOD LEUKOCYTES FROM SLAUGHTERED CATTLE BY FLUORESCENT NESTED PCR AS A POTENTIAL TOOL FOR EPIDEMIOLOGICAL STUDIES.....	61
ABSTRACT.....	61
INTRODUCTION.....	62
MATERIAL AND METHODS.....	65
RESULTS.....	70
DISCUSSION.....	72
ACKNOWLEDGEMENTS.....	75
REFERENCES.....	76
FIGURES AND TABLES.....	80
VARIABLE NUMBER OF TANDEM REPEATS (VNTRS) IN BOVINE HERPESVIRUS TYPE 1 (BHV-1) GENOME AS A POTENTIAL TOOL FOR VIRUS IDENTIFICATION.....	85
ABSTRACT.....	85
INTRODUCTION.....	86
MATERIAL AND METHODS.....	88
RESULTS.....	90
DISCUSSION.....	91
ACKNOWLEDGEMENTS.....	94
REFERENCES.....	94
FIGURES AND TABLES.....	97
CONCLUSÕES.....	105

Introdução

INTRODUÇÃO

O Herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1) é responsável por perdas econômicas significativas no setor pecuário mundial. Estas perdas podem ser atribuídas ao retardo no crescimento de animais jovens, menor produção leiteira, morte embrionária e fetal, abortamento com maior frequência no segundo e terceiro trimestres de gestação, redução da eficiência reprodutiva de matrizes e touros, além das restrições ao comércio internacional de animais vivos, sêmen, embriões e produtos derivados biotecnológicos, previstas no Código Internacional de Saúde Animal (OIE, 2001). Entre as doenças causadas por este vírus estão a rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), a balanopostite infecciosa bovina (IBP), a vulvovaginite pustular infecciosa (IPV) e a ceratoconjuntivite (FENNER et al., 1993). Este agente está disseminado pelo mundo todo e é motivo de grande preocupação para criadores e autoridades sanitárias de vários países. No Brasil tem sido isolado desde 1978 (ALICE, 1978). Levantamentos sorológicos indicam que este vírus está disseminado nos rebanhos de todo o país (PITUCO e DEL FAVA, 1998) e estima-se que mais de 50 milhões de bovinos possam estar infectados (LOVATO et al., 1995; VIDOR et al., 1995).

Membro da família *Herpesviridae*, sub-família *Alphaherpesvirinae*, gênero *Varicellovirus*, o herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1), é um vírus constituído por fita dupla de DNA não segmentada, recoberta por um capsídeo icosaédrico, envolto pelo tegumento viral, sobreposto por envelope lipoprotéico. A dupla cadeia de desoxirribonucleotídeos está organizada em um segmento longo de 104 Kb (denominado UL) e um segmento curto de 10 Kb (denominado US), sendo este último

flanqueado por um segmento de repetições internas (IRS) e terminais (TRS) invertidos, cada um contendo 11 Kb, totalizando 136 Kb (SCHWYZER e ACKERMANN, 1996).

As análises no genoma do BHV-1 tiveram início com um mapa de clones de fragmentos gerados pela utilização da endonuclease de restrição Hind III (MAYFIELD et al., 1983) e pela análise da estrutura primária da seqüência do gene timidina kinase (TK) (BELLO et al., 1992), culminando com a descrição completa da estrutura genômica do BHV-1 (SCHWYZER E ACKERMANN, 1996). O BHV-1 possui 67 genes individuais além de dois duplicados nas regiões invertidas do genoma viral. Este fato faz com que este vírus seja capaz de codificar pelo menos 69 proteínas (SCHWYZER e ACKERMANN, 1996), entre as quais se incluem enzimas virais, proteínas reguladoras e proteínas estruturais. Dentro desta última categoria, a classe das glicoproteínas desempenha papel importante nos mecanismos envolvidos na resposta imune, adsorção, penetração e disseminação célula-a-célula, dada sua localização no envelope do vírion e na superfície de células infectadas (DENIS et al., 1996; REBORDOSA et al., 1996; VAN OIRSCHOT, 1999). Pode-se ainda classificar as glicoproteínas como essenciais, devido à sua participação nos mecanismos envolvidos na multiplicação viral (nesta categoria enquadram-se as glicoproteínas gB, gD, gH, gK e gL), ou não-essenciais (glicoproteínas gC, gG, gM, gI e gE), que apesar de exercerem participação dispensável na multiplicação viral, interagem nos mecanismos de resposta imunológica da célula hospedeira (DASIKA e LETCHWORTH, 1999; DENIS et al., 1996; REBORDOSA et al., 1996; SHAW et al., 2000).

De acordo com os padrões de DNA e polipeptídeos, bem como pelas propriedades antigênicas demonstradas por anticorpos monoclonais, as amostras de BHV-1 são classicamente agrupadas em três subtipos: BHV-1.1, BHV-1.2 e BHV-1.3

(ENGELS et al., 1986). Devido a características diferentes do subtipo BHV-1.3 no que diz respeito a padrões de restrição do genoma, microscopia eletrônica, hibridização cruzada e sintomatologia clínica (neurovirulência), este subtipo recebeu mais recentemente a denominação de BHV-5 (ROIZMAN, 1992). Portanto, apenas o BHV-1.1 e BHV-1.2 são classificados como subtipos do BHV-1. Com base nos perfis de digestão com enzimas de restrição e de eletroforese do componente protéico, o BHV-1.2 pode ainda ser subdividido em BHV-1.2a e BHV-1.2b (METZLER et al., 1985). A similaridade de seqüências de DNA existente entre o BHV-1.1 e o BHV-1.2 é estimada em 95% (MAYFIELD et al., 1983). Embora os dados epidemiológicos indiquem que estirpes de BHV-1.1 e BHV-1.2 diferem na manifestação da sintomatologia clínica, é difícil determinar a diferença biológica exata entre os genótipos (RIJSEWIJK et al., 1999). Tem sido sugerido que cada um destes subtipos se adapte melhor a um determinado órgão do hospedeiro, sendo o BHV-1.1 melhor adaptado ao trato respiratório e o BHV-1.2 ao trato genital (EDWARDS et al., 1990). Estudos realizados em um painel de 237 isolados de BHV-1 e duas estirpes de referência (K22 e Cooper) com anticorpos monoclonais voltados para a glicoproteína C (gC) demonstram diferença significativa entre estes dois subtipos virais, indicando que esta glicoproteína pode estar associada às diferentes manifestações clínicas produzidas (RIJSEWIJK et al., 1999).

O evento de latência existente nas infecções por BHV-1 tem papel importante na patogenia e nas medidas de controle deste vírus, pois uma vez infectado, o animal torna-se portador para o resto da vida (PASTORET e THIRY, 1985; VAN OIRSCHOT et al., 1993). Após penetrar no hospedeiro, se ligar às células epiteliais do sítio de inoculação e se replicar, o BHV-1 se dissemina através de feixes nervosos, alcançando

principalmente os gânglios trigeminais e sacral, onde permanece em estado latente (PIDONE et al., 1999). A confirmação da localização desses sítios de latência viral pôde ser comprovada através da utilização de técnicas de hibridização in situ com sondas radioativas (SCHUDEL et al., 1987) e com imunofluorescência específica (NARITA et al., 1983). O BHV-1 também pode ser detectado em leucócitos de sangue periférico (FUCHS et al., 1999), entre os quais linfócitos TCD4+ presentes no tecido linfocítico de tonsilas (WINKLER et al., 2000). O BHV-1 latente pode ser reativado em condições de estresse através da indução por estímulos naturais ou artificiais, tais como: parto (PIDONE et al., 1999), superinfecção com outros microorganismos (EDWARDS e ROEDER, 1983), transporte dos animais (PIDONE et al., 1999) e administração de corticosteróides (CASTRUCCI et al., 1983). Desta forma, o BHV-1 torna-se passível de ser excretado, colocando em risco outros animais que nunca tiveram contato com o vírus (MWEENE et al., 2003). Os sinais clínicos geralmente não estão presentes durante a reativação viral (WYLER et al., 1989).

Medidas de controle ou erradicação do BHV-1 têm sido adotadas por alguns países (ACKERMANN et al., 1990a; ACKERMANN et al., 1990b; VAN OIRSCHOT et al., 1996). Dentre estas medidas, destacam-se a identificação, segregação e abate, empregados em locais onde o índice de animais soropositivos é baixo (ACKERMANN et al., 1990a; ACKERMANN et al., 1990b). Outra medida é a vacinação nos locais onde o controle sem vacinação torna-se inviável (VAN OIRSCHOT et al., 1996). A primeira medida de controle, possui baixo custo e apresenta alta eficiência quando aplicadas medidas restritivas rigorosas. Apesar disso, essa medida é considerada controversa devido à existência de animais sorologicamente negativos latentes no rebanho (LEMAIRE et al., 2000). A segunda (controle com vacinação) pode ser realizada

utilizando-se diferentes tipos de vacinas, dentre elas as vacinas compostas por vírus inativado (HALFEN, 1996; PETZHOLD et al., 2001), vacinas de vírus vivo atenuado (LOMBA et al., 1976; BRYAN et al., 1994), vacinas de DNA (ZHU E LETCHWORTH, 1996; BABIUK et al., 2003) e as vacinas compostas por estirpes contendo deleção de genes, também chamadas DIVAs (do inglês: differential vaccines) (STRUBE et al., 1996; GALEOTA et al., 1997). Esta última tem sido muito utilizada em programas de controle do BHV-1 na União Européia e tem como principal vantagem permitir o diagnóstico sorológico diferencial entre animais vacinados e naturalmente infectados (STRUBE et al., 1996).

Atualmente, as técnicas laboratoriais mais utilizadas para o diagnóstico de BHV-1 são as provas de isolamento viral em cultivo de células, imunofluorescência e virusneutralização, imunoperoxidase e ELISA (GIAVEDONI et al., 1988; FENNER et al., 1993; SPILKI et al., 2005; TEIXEIRA 2001). Rotineiramente, a técnica sorológica de ELISA tem sido muito utilizada para a detecção de anticorpos contra o BHV-1 (SPILKI et al., 2005; TEIXEIRA 2001). Um dos problemas relativos à utilização de testes sorológicos é que, atualmente, a maior parte das vacinas comercializadas no mundo impede a diferenciação sorológica entre animais vacinados e ou infectados (STRUBE et al., 1996). Além das técnicas de diagnóstico relatadas anteriormente, aquelas baseadas na PCR (do inglês: "Polymerase Chain Reaction") demonstram ser altamente específicas, rápidas e sensíveis, tendo sido muito utilizadas para diagnosticar BHV-1 em amostras de fetos naturalmente abortados (ROCHA et al., 1999), secreções nasais (SANTURDE et al., 1996), sêmen bovino (SANTURDE et al., 1996; MASRI et al., 1996; WAGTER et al., 1996; KATARIA et al., 1997; SMITS et al., 2000), sangue (FUCHS et al., 1999; WANG et al., 2001) e em outros tipos de amostras biológicas.

Algumas características virais podem interferir no diagnóstico e estudo epidemiológicos do BHV-1, em especial quando utilizadas técnicas sorológicas tradicionais como virusneutralização, imunofluorescência e imunoperoxidase (GIAVEDONI et al., 1988). Uma destas características é a homologia de aproximadamente 85% existente entre os genomas do BHV-1 e BHV-5 (CHOWDHURY, 1996; ROEHE et al., 1997) e de 95% para os subtipos BHV-1.1 e BHV-1.2, que se refletem na estrutura viral. A distinção entre subtipos pode ser obtida utilizando ensaios baseados em anticorpos monoclonais reativos a epítomos específicos do BHV-1 ou BHV-5 (ROEHE et al., 1997; SOUZA et al., 2002), análise do DNA viral por polimorfismo de fragmentos obtidos com enzimas de restrição (RFLP) (PIDONE et al., 1999; D'ARCE et al., 2002), reação em cadeia pela polimerase (PCR), através da utilização de oligonucleotídeos iniciadores específicos para um ou outro tipo viral (CLAUS et al., 2005), PCR-RFLP (DE-GIULI et al., 2002) e sequenciamento gênico (SILVA et al., 2000; ROS e BELÁK, 2002). Porém, nos testes descritos anteriormente, onde são empregadas tecnologias de DNA, podem ocorrer limitações de dois tipos. A primeira é a necessidade de isolamento e cultivo prévio para obtenção de grandes quantidades de DNA genômico viral, como é o caso da análise por RFLP. A segunda limitação é que poucos tecidos ou secreções são facilmente obtidos de animais vivos e podem ser utilizados para detecção de BHV-1 por PCR, conseqüentemente tornam-se não aplicáveis as tecnologias de PCR-RFLP e seqüenciamento de DNA para diferenciação viral.

Relatos de literatura mencionam sucesso na utilização de testes de PCR em amostras de secreção nasal e de leucócitos. No caso de secreção nasal, a detecção de BHV-1 nesse tipo de amostra biológica requer excreção viral, que está limitada a 1 ou 2

semanas após primo-infecção viral (FUCHS *et. al.*, 1999). Quanto a PCR para detecção de BHV-1 em leucócitos, apenas amostras oriundas de animais infectados naturalmente, com sinais clínicos ou resultados sorológicos indicativos de infecção viral prévia, demonstraram positividade correlacionada (FUCHS *et. al.*, 1999).

Nesse sentido, atualmente faz-se necessário o desenvolvimento e emprego de técnicas diagnósticas que permitam detectar e identificar precisamente pequena quantidade de vírus, inclusive determinando seus subtipos, utilizando material clínico de animais vivos, sem necessidade de isolamento viral prévio, visando o emprego em programas de vigilância epidemiológica para controle e erradicação do BHV-1.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Desenvolver ferramentas de diagnóstico do BHV-1 baseadas na análise do DNA, que permitam o aprimoramento dos programas de controle e erradicação desse vírus na pecuária brasileira.

Objetivos específicos

Identificar a presença de BHV-1 em amostras biológicas de fêmeas bovinas abatidas em frigorífico da Região Noroeste do Estado de São Paulo, com histórico de não vacinação, comparando as técnicas de ELISA e nested PCR em DNA proveniente de leucócitos e gânglios trigeminais.

Localizar regiões VNTRs (do inglês: Variable Number of Tandem Repeats) no genoma do BHV-1 e avaliar a viabilidade de seu emprego na caracterização genética de estirpes de referência e isolados virais.

REFERÊNCIAS

- ACKERMANN, M.; WEBER, H.P.; WYLER, R. Aspects of infectious bovine rhinotracheitis eradication programmes in a fattening cattle farm. *Preventive Veterinary Medicine*, v.9, n.2, p.121-130. 1990b.
- ACKERMANN, M.; MIILLER, H.K.; BRUCKNER, L.; KIHM, U. Eradication of infectious bovine rhinotracheitis in Switzerland: review and prospects. *Veterinary Microbiology*, v.23, n.1-4, p.365-370. 1990a.
- ALICE, J. F. Isolamento do Vírus da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR) no Brasil. *Revista Brasileira de Biologia*, v.38, n.4, p.919-920, 1978.
- BABIUK L.A.; PONTAROLLO, R.; BABIUK, S.; LOEHR, B.; VAN DRUNEN LITTELVAN DEN HURK, S. Induction of immune responses by DNA vaccines in large animals. *Vaccine*, v. 1(7-8): p.649-658, 2003.
- BELLO, L.J.; WHITBECK, J.C.; LAWRENCE, W.C. Sequence and transcript analysis of the bovine herpesvirus 1 thymidine kinase locus. *Virology*, 189(2): 417-414, 1992.
- BRYAN, L.A; FENTON, R.A; MISRA, V; HAINES, D.M. Fatal, generalized bovine herpesvirus type-1 infection associated with a modified-live infectious bovine rhinotracheitis parainfluenza-3 vaccine administered to neonatal calves. *Canadian Veterinary Journal*, v.35, n.223-228, 1994.
- CASTRUCCI, G.; CILLI, V.; FRIGERI, F.; FERRARI, M.; RANUCCI, S.; RAMPICHINI, L. Reactivation of Bovid herpesvirus 1 and 2 and parainfluenza-3 virus in calves latently infected. *Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases*, v.6, n.6, p.193-199, 1983.
- CHOWDHURY, S.I. Construction and characterization of an attenuated bovine Herpesvirus type 1 (BHV-1) recombinant virus, *Veterinary Microbiology*, v. 52, n.1-2, p.13-23, 1996.
- CLAUS, M.P.; ALFIERI, A.F.; FOLGUERAS-FLATSCHART, A.V.; WOSIACKI, S.R.; MÉDICI K.C.; ALFIERI, A.A. Rapid detection and differentiation of bovine herpesvirus 1 and 5 glycoprotein C gene in clinical specimens by multiplex-PCR, *Journal of Virological Methods*, Volume 128, n.1-2, p.183-188, 2005.
- D'ARCE, R.C.; ALMEIDA, R.S.; SILVA, T.C.; FRANCO, A.C.; SPILKI, F.; ROEHE, P.M.; ARNS, C.W. Restriction endonuclease and monoclonal antibody analysis of Brazilian isolates of bovine herpesviruses types 1 and 5. *Veterinary Microbiology*, v.88, n.4, p.315-324, 2002.

DASIKA, G.K.; LETCHWORTH 3rd, G.J. Cellular expression of bovine herpesvirus 1 gD inhibits cell-to-cell spread of two closely related viruses without blocking their primary infection. *Virology*, v.254, n.1, p.24-36, 1999.

DE-GIULI, L.; MAGNINO, S.; VIGO, P.G; LABA, LESTRA I.; FABBI, I.M. Development of a polymerase chain reaction and restriction typing assay for the diagnosis of bovine herpesvirus 1, bovine herpesvirus 2, and bovine herpesvirus 4 infections. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.14, n.4, p.353-356, 2002.

DENIS, M.; HANON, E.; RIJSEWIJK, F.A.; KAASHOEK, M.J.; VAN OIRSCHOT, J.T.; THIRY, E.; PASTORET, P.P. The role of glycoproteins gC, gE, gI, and gG in the induction of cell-mediated immune responses to bovine herpesvirus 1. *Veterinary Microbiology*, v.53, n.1-2, p.121-132, 1996.

EDWARDS, S.; ROEDER, P.L. Attempted reactivation of latent bovine herpesvirus 1 infection in calves by infection with ruminant pestiviruses. *Veterinary Microbiology*, v.8, n.6, p.563-569, 1983.

EDWARDS S.; WHITE H.; NIXON P. A study of the predominant genotypes of bovid herpesvirus 1 isolated in the U.K. *Veterinary Microbiology*, v.22, n.2-3, p.213-223, 1990.

ENGELS, M.; ACKERMAN, M. Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. *Veterinary Microbiology*, v.53, n.1-2, p.3-15, 1996.

FENNER, F.J.; BACHMANN, P.A.; GIBBS, E.P.; MURPHY, F.A.; ROTT, R.; STUDDERT, M. J.; WHITE, D. *Veterinary virology*, 2 ed. San Diego: Academic Press, 1993. p. 337-368.

FUCHS, M.; HÜBERT, P.; DETTERER, J.; RZHIHA, H. Detection of bovine herpesvirus type 1 in blood from naturally infected cattle by using a sensitive PCR that discriminates between wild-type virus and virus lacking glycoprotein E. *Journal of Clinical Microbiology*, v.37, n.8, p.2498-2507, 1999.

GALEOTA, J.A.; FLORES, E.F.; KIT, S.; KIT, M.; OSORIO, F.A. A quantitative study of the efficacy of deletion mutant bovine herpesvirus-1 differential vaccine in reducing the establishment of latency by wildtype virus. *Vaccine*, v.15, n.2, p.123- 128, 1997.

GIAVEDONI, L.D; RUIZ, M.; FIJTMAN, N.; SCHUDEL, A.A.; RODRÍGUEZ, M. Rapid Diagnosis of bovine herpesvirus encephalitis: comparison of nucleic acid hybridization and immunoperoxidase methods using clinical samples. *Journal of Veterinary Medicine series B*, v.35, n.4, p.280-285, 1988.

HALFEN, D.C. Desempenho sorológico de vacinas inativadas para IBR-IPV. *Tese de Mestrado em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Pelotas*, Pelotas- RS, Brasil, p.105, 1996.

KATARIA, R.S.; TIWARI, A.K.; GUPTA, P.K.; MEHROTA, M.L.; RAI, A.; BANDYOPADHYAY, S.K. Detection of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) genomic sequences in bovine semen inoculated with BHV-1 by polymerase chain reaction. *Acta Virologica*, v.41, n.6, p.311-315, 1997.

LEMAIRE, M.; MEYER, G.; BARANOWSKI, E.; SCHYNTS, F.; WELLEMANS, G.; KERKHOF, P.; THIRY, E. Production of bovine herpesvirus type 1-seronegative latent carriers by administration of a live-attenuated vaccine in passively immunized calves. *Journal of Clinical Microbiology*, v.38, n.11, p.4233-4238, 2000.

LOMBA, F.; VASCOBOINIC, E.; ZYGRAICH, N. Immunization of pregnant dams with a temperature-sensitive mutant of the IBR Virus. In: *Proceedings of Congress Diseases of Cattle*, 1976, Paris, p.395-399.

LOVATO, L.T.; WEIBLEN, R.; TOBIAS, F.L.; MORAES, M.P. Herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1): inquérito soro-epidemiológico do rebanho leiteiro do estado do Rio Grande do Sul Brasil. *Ciência Rural*, v.25, n.31, p.425-430, 1995.

MASRI, S.A.; OLSON, W.; NGUYEN, P.T.; PRINS, S.; DEREGT, D. Rapid detection of bovine herpesvirus 1 in the semen of infected bulls by nested polymerase chain reaction assay. *Canadian Journal of Veterinary Research*, v.60, n.2, p.100-1007, 1996.

MAYFIELD, J.E.; GOOD, P.J.; VANOORT, H.J.; CAMPBELL, A.R., REED, D.E. Cloning and cleavage site mapping of DNA from bovine herpesvirus 1 (Cooper strain). *Journal of Virology*, v.47, n.1, p.259-264, 1983.

METZLER, A.E.; MATILE, H.; GASSMANN, U.; ENGELS, M.; WYLER, R. European isolates of bovine herpesvirus 1: a comparison of restriction endonuclease sites, polypeptides, and reactivity with monoclonal antibodies. *Archives of Virology*, v.85, n.1-2, p.57-69, 1985.

MWEENE, A.S.; FUKUSHI, H.; PANDEY, G.S.; SYAKALIMA, M.; SIMUUNZA, M.; MALAMO, M.; NAMBOTA, A.; SAMUI, K.L.; TSUBOTA, T.; NAKAZATO, Y.; ONUMA, M.; YASUDA, J. The prevalence of bovine herpesvirus-1 in traditional cattle in Southern Province, Zambia. *Revue Scientifique et Technique del Office International Des Epizooties*, v.22, n.3, p.873- 877, 2003.

NARITA, M.; INUI, S.; NANBA, K.; SHINIZU, Y. Detection of Virus Particles in Trigeminal Ganglion cells in a Calf Recurrently Infected with Infectious Bovine Rhinotracheitis. *Japanese Journal of Veterinary Sciences*, v.45, n.5, p.691-693, 1983.

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. List B Diseases: Infectious Bovine Rhinotracheitis/Infectious Pustular Vulvovaginitis (IBR-IPV). In: *International Animal Health Code*. Paris: OIE, 2001. Disponível em: <<http://www.oie.int/Norms/MCode/htm>>.

PASTORET, P.P.; THIRY, E. Diagnosis and prophylaxis of infectious bovine rhinotracheitis: the role of virus latency. *Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases*, v. 8, n.1, p.35-42, 1985.

PETZOLD, S.A.; RECKZIEGEL, P.E.; PRADO, J.A.P.; TEIXEIRA, J.C.; WALD, V.B.; ESTEVEZ, P.A.E.; SPILKI, F.R.; ROEHE, P.M. Neutralizing antibodies to bovine herpesvirus types 1 (BHV-1) and 5 (BHV-5) induced by an experimental, oil-adjuvanted, BHV-1 vaccine. *Brazilian Journal of Veterinary research and Animal Science*, São Paulo, v.38, n.1-6, p.184-187, 2001.

PIDONE, H.; GALOSI, C.; ETCHEVERRIGARAY, M. Herpes bovinos 1 y 5. *Analecta Argentina*, v.19, 40-50, 1999.

PITUCO, E.M, DEL FAVA, C. Situação do BVDV na América do Sul. In: Simpósio Internacional sobre Herpesvírus Bovino (tipo 1 e 5) e Vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV), 1998, Santa Maria, RS. Laboratório de Virologia, UFSM, p.49-57.

REBORDOSA, X.; PINOL, J.; PEREZ-PONS, J.A.; LLOBERAS, J.; NAVAL, J.; SERRAHARTMANN, X.; ESPUÑA, E.; QUEROL, E. Glycoprotein E of bovine herpesvirus type 1 is involved in virus transmission by direct cell-to-cell spread. *Virus Research*, v.45, n.1, p.59-68, 1996.

RIJSEWIJK F.A.M., KAASHOEK M.J., LANGEVELD J.P., MELOEN R., JUDEK J., BIENKOWSKA-SZEWCZYK K., MARIS-VELDHUIS M.A. E VAN OIRSCHOT J.T. 1999. Epitopes on glycoprotein C of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) that allow differentiation between BHV-1.1 and BHV-1.2 strains. *Journal of General Virology* v.80, n.6, p.1477-1483, 1999.

ROCHA, M.A.; BARBOSA, E.F.; GUEDES, R.M.; LAGE, A.P.; LEITE, R.C.; GOUVEIA, A. M. Detection of BHV-1 in a naturally infected bovine fetus by a nested PCR assay. *Veterinary Research Community*, v.3, n.2, p.133-141, 1999.

ROEHE, P.M.; SILVA, T.C.; NARDI, N.B.; OLIVEIRA, L.G.; ROSA, J.C.A. Diferenciação entre os vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (BHV-1) e vírus da encefalite bovina (BHV-5) com anticorpos monoclonais. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.17, n.1, p.41-44, 1997.

ROIZMAN, B.; DESROSIERS, R.C.; FLECKESNSTEIN, B.; LOPEZ, C.; MINSON, A.C.; STUDDERT, M.J. The family Herpesviridae: an update. The Herpesvirus Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Archives of Virology*, v.123, n.3-4, p.425-449, 1992.

ROS, C.; BELÁK. S. Characterization of the glycoprotein B gene from ruminant alphaherpesviruses. *Virus Genes*, v.24, n.7, p.99-105, 2002.

SANTURDE, G.; DA SILVA, N.; VILLARES, R.; TABARÉS, E.; SOLANA, A.; BAUTISTA, J.M.; CASTRO, J.M. Rapid and high sensitivity test for direct detection of bovine

herpesvirus-1 genome in clinical samples. *Veterinary Microbiology*, v.49, n.1-2, p.81-92, 1996.

SCHUDEL, A.A.; RODRÍGUEZ, M.; CARRILLO, B.J. Biotecnología en el diagnóstico, caracterización y prevención de la encefalitis bovina a BHV-1. *Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias y Agronómicas– Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria*, 1987.

SCHWYZER, M.; ACKERMANN, M. Molecular virology of ruminant herpesviruses. *Veterinary Microbiology*, v.53, n.1-2, p.17-29, 1996.

SHAW, A.M.; BRAUN, L.; FREW, T.; HURLEY, D.J.; ROWLAND, R.R.; CHASE, C.C. A role for bovine herpesvirus 1 (BHV-1) glycoprotein E (gE) tyrosine phosphorylation in replication of BHV-1 wild-type virus but not BHV-1 gE deletion mutant virus. *Virology*, v.268, n.1, p.159-166, 2000.

SILVA, N.; ESCARMIS, C.; SOLANA, A.; CASTRO, J. M. Variabilidad genómica entre cepas del herpesvirus bovino tipo 1 aisladas de casos clínicos de IBR. *Investigación Agraria, producción y sanidad animales*, v.15, n.1-2, p.59-67, 2000.

SMITS, C.B.; VAN MAANEN, C.; GLAS, R.D.; DE GEE, A.L.W.; DIJKSTRAB, T, VAN OIRSCHOT, J.T.; RIJSEWIJK, F.A.M. Comparison of three polymerase chain reaction methods for routine detection of bovine herpesvirus 1 DNA in fresh bull semen. *Journal of Virological Methods*, v.85, n.1-2, p.65-73, 2000.

SOUZA, V.F.; MELO, S.V.; ESTEVES, P.A.; SCHMIDT, C.S.; GONÇALVES, D.A.; SCHAEFER, R.; SILVA, T.C.; ALMEIDA, R.S.; VICENTIN, F.; FRANCO, A.C.; OLIVEIRA, E.A.; SPILKI, F.R.; WEIBLEN, R.; FLORES, E.F.; LEMOS, R.A.; ALFIERI, A.A.; PITUCO, E.M.; ROEHE, P.M. Caracterização de Herpesvírus bovinos tipos 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5) com anticorpos monoclonais. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.22, n.1, p.13-18, 2002.

SPILKI, F.R.; ESTEVES, P.A.; SILVA, A.D.; FRANCO, A.C; RIJSEWIJK, F.A.M., ROEHE, P.M. A monoclonal antibody-based ELISA allows discrimination between responses induced by bovine herpesvirus subtypes 1 (BoHV-1.1) and 2 (BoHV-1.2). *Journal of Virological Methods*, v.129, n.2, p.191-193, 2005.

STRUBE, W.; AUER, S.; BLOCK, W.; HEINEN, E.; KRETZDORN, D.; RODENBACH, C.; SCHMEER. A gE deleted infectious bovine rhinotracheitis marker vaccine for use in improved bovine herpesvirus 1 control programs. *Veterinary Microbiology*, v.53, n.1-2, p.181-189, 1996.

TEIXEIRA, M.F.B.; ESTEVES, P.A., SCHMIDT; C.S., SPILKI; F.R., SILVA, T.C.; DOTTA, M.A.; ROEHE, P.M. ELISA de bloqueio monoclonal para o diagnóstico sorológico de infecções pelo herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.21, n.1, p.33-37, 2001.

VAN OIRSCHOT, J.T. Diva vaccines that reduce virus transmission. *Journal of Biotechnology*, v.73, n.2-3, p.195-205, 1999.

VAN OIRSCHOT, J.T.; KAASHOEK, M.J.; RIJSEWIJK, F.A. Advances in the development and evaluation of bovine herpesvirus 1 vaccines. *Veterinary Microbiology*, v.53, n.1-2, p.43-54. 1996.

VAN OIRSCHOT, J.T.; STRAVER, P.J.; VAN LIESHOUT, J.A.; QUAK, J.; WESTENBRINK, F.; VAN EXSEL, A.C. A subclinical infection of bulls with bovine herpesvirus type 1 at an artificial insemination centre. *Veterinary Record*, v.132, n.2, p.32-35, 1993.

VIDOR, T.; HALFEN, D.C.; LEITE, T.E.; COSWING, L.T. Herpes bovino tipo 1 (BHV-1): I: Sorologia de rebanhos com problemas reprodutivos. *Revista Ciência Rural*, v.25, p.421-424, 1995.

WAGTER, L.H.; GLAS, R.D.; BLEUMINK-PLUYM, N.; VAN ENGELENBURG, F.A. RIJSEWIJK, F.A.; HOWVERS, D.J. A polymerase chain reaction (PCR) assay for the detection of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) in selectively digest whole bovine semen. *Veterinary Research Community*, v.20, n.4, p.401-408, 1996.

WANG, P.; HURLEY, D. J.; BRAUN, L. J.; CHASE, C. C. Detection of bovine herpesvirus-1 in peripheral blood mononuclear cells eight months postinfection. *Veterinary Diagnostic Investigation*, v.13, n.5, p.424-427, 2001.

WINKLER, M.T.C.; DOSTER, A.; JONES, C. Persistence and reactivation of bovine herpesvirus 1 in the tonsils of latently infected calves. *Journal of Virology*, v.74, n.11, p.5337-5346, 2000.

WYLER, R.; ENGELS, M.; SCHWYZER, M. Infectious bovine rhinotracheitis/vulvovaginitis (BHV-1), 1- 72. In: WITTMANN G.(ed.), Herpesvirus diseases of cattle, horses and pigs. Kluwer academic Publishers, Boston, Mass. 1989.

ZHU, X.; LETCHWORTH, G.J. Mucosal and systemic immunity to bovine herpesvirus-1 glycoprotein D confer resistance to viral replication and latency in cattle. *Vaccine*, v.14, n.1, p.61-69, 1996.

Deteção de Herpesvírus Bovino por Nested PCR Fluorescente em Leucócitos de Sangue Periférico de Bovinos Abatidos como Potencial Ferramenta para Estudos Epidemiológicos

Sergio M. Aoki^{ab}, Paulo M. Roehle^c, Cárís M. Nunes^a, Luzia H. Q. Silva^a, Anna P. Oliveira^c, José F. Garcia,^{a*}

^a Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal, Universidade Estadual Paulista – UNESP - Araçatuba, SP, Brasil, 16050-680.

^b Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista – UNESP - Botucatu, SP, Brasil, 18618-000.

^c DM/ICBS-UFRGS & CPVDF-FEPAGRO, Estrada do Conde 6000, Eldorado do Sul, RS, Brasil, 92990-000.

*** Correspondências:**

Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular Animal (LBBMA)

International Atomic Energy Agency (IAEA) Collaborating Centre on Animal Genomics and Bioinformatics

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP

Rua Clóvis Pestana, 793 – Jd. D. Amélia - 16.050-680

Araçatuba, SP, Brasil.

Fone: (18) 3636-3200 ext. 3636

Email: jfgarcia@terra.com.br

RESUMO

No presente trabalho, descrevemos o uso de um método baseado na PCR fluorescente para detectar Herpesvírus Bovino tipo 1 (BHV-1) em leucócitos de sangue periférico (PBL, do inglês: Peripheral Blood Leukocytes) de 100 fêmeas abatidas em frigorífico e sem sintomatologia clínica de Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR, do inglês: Infectious Bovine Rhinotracheitis), originadas de 10 lotes de bovinos da região Noroeste do Estado de São Paulo e do Estado do Mato Grosso do Sul - Brasil. Uma técnica sensível de nested PCR (do inglês: Polymerase Chain Reaction) foi desenhada

para amplificar fragmentos de DNA específicos do gene timidina quinase (TK do inglês: Thymidine Kinase) a partir de BHV-1 e BHV-5 utilizando um oligonucleotídeo iniciador interno fluorescente e sistema de eletroforese capilar. ELISA de plasma e PCR de gânglios trigeminais foram realizados para relacionar os achados em PBL. Os fragmentos de DNA gerados por PCR foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 2% e sistema capilar. O número de amostras contendo leucócitos positivos para BHV-1 foi de 32% (32/100). Não foram observadas amostras de PBL infectadas com BHV-5 embora a confirmação em gânglio trigeminal tenha indicado 5 amostras com esse vírus. A confirmação dos resultados de PCR foi realizada através de seqüenciamento direto de DNA. Os dados do presente trabalho revelam a presença do BHV-1 em PBL sugerindo a latência em rebanhos infectados. A viabilidade da técnica de nested PCR fluorescente para utilização em diagnóstico de BHV-1 e para distinção entre BHV-1 e BHV-5 foi avaliada como potencial ferramenta para estudos epidemiológicos.

Palavras-chave: BHV-1, BHV-5, bovino, nested PCR, eletroforese capilar.

INTRODUÇÃO

Os Herpesvírus Bovino tipo 1 e 5 (BHV-1 e BHV-5) são membros da família Herpesviridae, sub-família *Alphaherpesvirinae*, e causam perdas econômicas significativas na pecuária de corte e leiteira de todo o mundo ([FAUQUET et al., 2004](#)). O BHV-1 pode causar abortos, perdas fetais, infecção sistêmica em recém nascidos (BARR & ANDERSON, 1993; KIRKBRIDE, 1985), rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), vulvovaginite/balanopostite pustular infecciosa (IPV and IPB, do inglês: Infectious Pustular Vulvovaginitis and Balanopostitis respectivamente) e conjuntivite (ROIZMAN et

al., 1995). O BHV-5 é um herpesvírus neurovirulento, causando meningoencefalite não supurativa bovina que afeta animais de todas as idades, particularmente animais jovens. BHV-1 and BHV-5 são ambos neurotrópicos e têm a habilidade de se replicar no sistema nervoso e estabelecer latência em gânglios sensoriais (ROCK *et al.*, 1993), entretanto o potencial neuropatogênico parece estar restrito ao BHV-5 ([BELKNAP *et al.*, 1994](#)). Outros herpesvírus principais de ruminantes são relacionados ao BHV-1 e BHV-5: Buffalo Herpesvirus 1 (BuHV-1), Cervine Herpesvirus 1 (CeHV-1), Caprine Herpesvirus 1 (CaHV-1) e Rangiferine Herpesvirus 1 (RanHV-1) (ROS & BELÁK, 2002).

A identidade das seqüências de DNA dos genomas do BHV-1 e BHV-5 é de aproximadamente 85% e muitos de seus antígenos podem causar reações cruzadas quando utilizados anticorpos policlonais e monoclonais em testes sorológicos (CHOWDHURY, 1995; ROEHE *et al.*, 1997). Essas características biológicas dificultam a distinção correta dos vírus em amostras biológicas quando utilizadas técnicas tradicionais como virusneutralização, imunofluorescência e imunoperoxidase. (GIAVEDONI *et al.*, 1988). A distinção entre eles pode ser obtida utilizando-se alguns anticorpos monoclonais reativos a epítomos específicos do BHV-1 ou BHV-5 (ROEHE *et al.*, 1997; SOUZA *et al.*, 2002), RFLP (do inglês: Restriction Fragment Length Polymorphism) (D'ARCE *et al.*, 2002) e PCR específicas utilizando oligonucleotídeos iniciadores conservados ou específicos (CLAUS *et al.*, 2005; BORGES *et al.*, 2002).

Métodos baseados na PCR têm adquirido grande importância na área de diagnóstico devido a velocidade e sensibilidade de detecção de DNA viral em amostras biológicas. Diversos formatos de ensaios de PCR têm sido descritos para a detecção de BHV-1 e BHV-5 com diferentes níveis de sensibilidade (ASHBAUGH *et al.*, 1997; ROS *et al.*, 1999; MOORE *et al.*, 2000). A possibilidade de detecção do BHV-1 e BHV-5 por

PCR a partir de diferentes espécimes, tais como “swab” nasal e de mucosa (DE GEE *et al.*, 1996; SANTURDE *et al.* 1996; VAN ENGELENBURG *et al.*, 1995b), pulmões, traquéia, linfonodos e tonsilas (SANTURDE *et al.* 1996, VAN ENGELENBURG *et al.*, 1995b), gânglio sacral (VOGEL *et al.*, 2004) e trigemelar (WINKLER *et al.*, 2002), tecidos do sistema nervoso central (GOMES *et al.*, 2002; HÜBNER *et al.*, 2005) e sêmen bovino (SANTURDE *et al.*, 1996; MASRI *et al.*, 1996; VAN ENGELENBURG *et al.*, 1995b; WAGTER *et al.*, 1996; KATARIA *et al.*, 1997; SMITS *et al.*, 2000; GOMES *et al.*, 2003) tem sido descritas. Entretanto nem todos os tipos de amostras de campo são geralmente utilizáveis no diagnóstico de rotina devido a: 1) localização viral em locais acessíveis somente *post mortem* and 2) dependência da fase de infecção viral. Por exemplo, a detecção de BHV-1 em “swab” nasal requer excreção viral, que está limitada entre 1 a 2 semanas durante a fase produtiva da infecção viral (FUCHS *et al.*, 1999). Uma das principais alternativas para amostragem utilizando a detecção por PCR poderia ser a utilização de leucócitos de sangue periférico (PBL) descrita pela primeira vez em 1999 (FUCHS *et al.*, 1999). Este princípio foi demonstrado pela utilização de sangue de animais naturalmente infectados com confirmação sorológica de infecção por BHV-1 ou de animais onde a doença foi constatada pela sintomatologia clínica ou indicação sorológica de infecção viral prévia.

O presente estudo descreve a presença de BHV-1 em leucócitos de sangue periférico (PBL) em animais abatidos em frigorífico e sem sintomatologia clínica de IBR, baseado em teste sorológico (ELISA) e PCR. Para esta finalidade, um teste sensível do tipo nested PCR baseado no gene timidina quinase (TK) foi padronizado para amplificar fragmento de DNA de 301 pb ou de 273 pb a partir de BHV-1 e BHV-5, respectivamente. Através do uso de um oligonucleotídeo iniciador interno fluorescente,

os produtos de PCR foram analisados em sistema de eletroforese capilar e comparados com eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio, para avaliar a capacidade discriminatória entre ambos os métodos para os dois vírus. ELISA e PCR de gânglios trigeminiais foram realizados para permitir a elaboração de inferências com respeito a efetividade do nested PCR fluorescente desenhado neste estudo para verificar a existência de DNA de BHV em leucócitos de sangue periférico (PBL). Todas as amostras positivas de leucócitos e gânglios trigeminiais foram submetidas ao seqüenciamento de DNA para confirmação.

MATERIAL E MÉTODOS

Estirpes virais

Estirpes de referência de BHV-1 (Los Angeles) e BHV-5 (N569) foram cedidas pelo Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor- IPVDF- Eldorado do Sul- RS- Brasil em suspensões de células Madin-Darby Bovine Kidney (MDBK) contendo 10^3 TCID₅₀/ml.

Diluições seriadas em sangue

Suspensões de células MDBK tituladas foram utilizadas para preparo das diluições seriadas em sangue. Diluições na base 10 foram realizadas utilizando sangue de bovino não infectado por BHV-1 e BHV-5 (do rebanho experimental da Universidade Estadual Paulista- UNESP - Campus Araçatuba), previamente monitorado sorologicamente (HerdChek® Infectious Bovine Rhinotracheitis Antibody Test Kit - IBR ELISA Screen/Verification - IDEXX Laboratories Inc.). Pontos de diluição incluíram as concentrações de 10^2 TCID₅₀/ml to 10^{-6} TCID₅₀/ml de BHV-1 e BHV-5, em dois

conjuntos separados de amostras. A extração de DNA das amostras diluídas (sangue + suspensão de células infectadas) foi realizada com o QIAamp[®] DNA Mini Kit (Qiagen, Helden, Germany), conforme instruções do fabricante. Para produzir amostras de referência com quantidade de DNA viral suficiente para uso como controle positivo na PCR, suspensão de células MDBK infectadas foram submetidas a purificação de DNA utilizando o mesmo protocolo.

Sangue e gânglio trigeminal

Amostras de sangue foram coletadas de 100 fêmeas (ao longo da linha de abate Frigorífico Bertin- SP- Brasil). O sangue foi coletado em tubo contendo 1 ml de solução citrato de sódio/ácido cítrico (18,4 mg/ml e 4,0 mg/ml respectivamente). Além das amostras de sangue, gânglios trigeminais foram individualmente coletados através da dissecação da cabeça, armazenados em sacos plásticos e mantidos a 4°C até chegada ao laboratório. Devido ao rigoroso sistema de rastreamento utilizado pelo frigorífico, sangue e gânglios trigeminais foram obtidos do mesmo animal. As amostras foram coletadas em grupos de 10 indivíduos originados da mesma propriedade. Após a cada sessão de coleta de material biológico, o proprietário dos animais foi contatado para responder questionário sobre histórico de vacinação para BHV-1, tamanho total do rebanho, procedimentos de manejo, localização da propriedade e outras informações epidemiológicas. Todos os 100 animais foram classificados como não vacinados pelos proprietários. Após chegada ao laboratório, os tubos contendo sangue foram centrifugados a 4.000 x g/ 10 min, sendo aproximadamente 400 µL de “Buffy coat” e 1000 µL de plasma removidos, transferidos para um novo tubo e armazenados a -20°C

até a extração de DNA ou diluição para o teste de ELISA. Os gânglios trigeminiais foram armazenados a -80°C até a preparação do DNA.

Extração de DNA de leucócitos e gânglios trigeminiais

Tubos contendo 400 μL de “Buffy coat” foram descongelados e os debris eritrocitários restantes e hemoglobina eliminados por lavagem com 700 μL de tampão citrato de sódio (SSC) (SAMBROOK et al., 1989), sendo finalmente centrifugados a 14.000 x g/ 1 min. O sobrenadante foi descartado por inversão do tubo. O procedimento de lavagem foi realizado por duas vezes. Cada tubo contendo os leucócitos lavados foi submetido a lise com uma solução contendo: 375 μL de acetato de sódio (0,2 M), 50 μL de dodecyl sulfato de sódio SDS (10%) e 5 μL de proteinase K (20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), a 56°C “overnight” até a dissolução completa do sedimento. Para realizar o isolamento de DNA da solução resultante foram adicionados 400 μL de solução fenol/ clorofórmio/ álcool isoamílico (25:24:1), sendo os tubos agitados utilizando o vortex e centrifugados a 14.000 x g/ 2 min. O sobrenadante foi cuidadosamente transferido para um novo tubo de polipropileno de 1,5 ml. A precipitação do DNA foi realizada pela adição de 1,0 ml de isopropanol absoluto (previamente resfriado a -20°C), seguido de centrifugação a 14.000 x g/ 2 min. Após remoção do sobrenadante, 1,0 ml de etanol 70% foi adicionado ao sedimento que foi centrifugado a 14.000 x g/ 2 min. O sedimento de DNA foi ressuspensionado em 200 μL de tampão Tris-EDTA (TE) pH 8.0 seguido de incubação a 56°C por 1 hora. Vinte e cinco miligramas de gânglio trigeminal dissecado foram submetidos à extração de DNA utilizando QIAamp[®] DNA Mini Kit (Qiagen, Helden,

Germany), conforme instruções do fabricante. O DNA foi eluído com 200 μ L de tampão de eluição fornecido com o kit.

Amplificação de DNA bovino

Para verificar a qualidade das amostras de DNA (em relação à presença de inibidores e integridade do DNA), todas as amostras de DNA (leucócitos e gânglios trigeminais) foram submetidas à técnica de PCR visando amplificar região do gene do receptor do hormônio luteinizante bovino (bLHR) (Genbank nº acesso AF491303). A PCR foi realizada em volume final de 25 μ L contendo: 5,0 μ L de solução de DNA, 15 pmol de cada primer (LH6- 5' TTATTCTGCCATCTTTGCTGAGA 3' e LH11- 5' CCTCCGAGCATGACTGGAATGGC 3'), 2,5 μ M de cada dNTP, 2,5 μ L tampão de reação da enzima *Taq* Polimerase 10 vezes concentrado (100 mM Tris-HCl, pH 9.0, 500 mM KCl), 2,0 mM de $MgCl_2$, e 1,0 U of Platinum *Taq* Polymerase (Invitrogen- USA), completando o volume com água ultrapura (Invitrogen- USA). As condições de amplificação foram definidas em um termociclador PTC- 100 (MJ-Research[®], Waltham, Massachusetts, USA), realizando 10 minutos de denaturação inicial, seguidos por 35 ciclos 94°C/60 segundos, 60°C/30 segundos e 72°C/120 segundos, com extensão final de 72°C por 10 minutos. Os produtos da PCR foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio (Figura 2).

Nested PCR fluorescente para o gene da timidina quinase do BHV

Amostras de DNA de leucócitos e gânglios trigeminais foram submetidas à técnica de nested PCR fluorescente desenhada para produzir um fragmento do gene TK de 301 pb (BHV-1) ou de 273 pb (BHV-5) (Genbank nº acesso D00438 – BHV-1 and S56149 – BHV-5) (Figura 1). A primeira etapa de amplificação por PCR foi realizada em volume final de 50 µL contendo: 20 µL de solução de DNA, 5,0 µL de DMSO, 20 pmol de cada primer (TK1 5' GTACTGGCGCACGATGTT 3' e TK2 5' GTAGAGCTCGCGGCACTTG 3'), 2,5 µM de cada dNTP, 5,0 µL tampão de reação *Taq* Polimerase 10 vezes concentrado (100 mM Tris-HCl, pH 9.0, 500 mM KCl), 2,0 mM de MgCl₂, e 1,0 U of Platinum *Taq* Polymerase (Invitrogen- USA), completando o volume com água ultrapura (Invitrogen- USA). As condições de amplificação foram definidas em um termociclador PTC- 100 (MJ-Research[®], Waltham, Massachusetts, USA), realizando 10 minutos de denaturação inicial, seguidos por 35 ciclos sendo os 10 primeiros começando a 94°C/50 segundos, 70°C/90 segundos e 72°C/60 segundos, e decrescendo 1°C na temperatura de anelamento a cada ciclo. Os 25 ciclos restantes foram realizados a 94°C/50 segundos, 60°C/90 segundos e 72°C/60 segundos com extensão final de 72°C por 10 minutos. A segunda etapa de amplificação foi realizada imediatamente após o término da primeira etapa utilizando 2 µL de produto de PCR da primeira reação. A mesma concentração de reagentes foi utilizada na segunda etapa, alterando somente o par de oligonucleotídeos iniciadores (TK3 5' TGGTACGGACGCCTTAAGTGG 3' e TK4 5' GTTGATCTCGCGGAGGCAGTA 3', este ultimo marcado com o fluorocromo hexachloro-6-carboxyfluorescein - HEX na extremidade 5'). As condições de amplificação foram definidas em um termociclador

PTC- 100 (MJ-Research[®], Waltham, Massachusetts, USA), realizando 10 minutos de denaturação inicial, seguidos por 35 ciclos sendo os primeiros 10 começando a 94°C/50 segundos, 70°C/90 segundos e 72°C/60 segundos, e decrescendo 0,5°C na temperatura de anelamento a cada ciclo. Os 25 ciclos restantes foram realizados a 94°C/50 segundos, 65°C/90 segundos e 72°C/60 segundos com extensão final de 72°C por 10 minutos. Os produtos de PCR foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio e por eletroforese capilar (MegaBace 1000 GE- Healthcare- UK Limited). A forma e intensidade dos picos fluorescentes foram monitoradas com auxílio do programa Fragment Profiler (GE- Healthcare- UK Limited) e um padrão interno de tamanho de fragmento de DNA - ET-400R (GE- Healthcare- UK Limited) foi utilizado para padronizar os tamanhos dos fragmentos em análise.

ELISA

Todos os 100 indivíduos foram triados para presença de anticorpos anti-BHV-1 através de teste sorológico utilizando HerdChek[®] Infectious Bovine Rhinotracheitis Antibody Test Kit - IBR ELISA Screen/Verification (IDEXX Laboratories Inc.), conforme instruções do fabricante. A absorbância foi medida em equipamento Tecan Sunrise ELISA Reader (Tecan Trading AG, Switzerland) e os dados analisados com auxílio do programa XCheck 3.3 (IDEXX Laboratories Inc.).

Seqüenciamento de DNA

Fragmentos de PCR do gene da timidina quinase (TK) obtidos de todas amostras positivas (leucócitos e gânglios trigeminais) foram submetidos ao seqüenciamento direto utilizando os sistemas Dyenamic ET[®] e MegaBace 1000 (GE- Healthcare- UK

Limited) conforme recomendações do fabricante. A verificação da qualidade das seqüências e os alinhamentos múltiplos foram realizados com auxílio dos programas Phred/Phrap and BioEdit[®] respectivamente. Para confirmar os resultados positivos quanto a detecção e diferenciação de estirpes, todas as seqüências de DNA geradas foram comparadas com o GenBank utilizando o aplicativo BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)

RESULTADOS

Determinação do limiar de detecção para BHV-1 e BHV-5 utilizando nested PCR em diluições seriadas

A eficiência e efetividade do nested PCR foram avaliadas em diluições seriadas na base 10 de estirpes de referência de BHV-1 e BHV-5 em sangue total bovino. O limiar de detecção foi de 10^{-2} TCID₅₀/ml (BHV-1) e 10^1 TCID₅₀/ml (BHV-5) em eletroforese em gel de agarose 2% (Figura 3). Os DNAs das menores diluições detectáveis foram utilizados como controle positivo para os ensaios subseqüentes e para a padronização do nested PCR fluorescente em eletroforese capilar aplicado a leucócitos e gânglios trigeminiais coletados no frigorífico.

Demonstração da viabilidade do método de detecção de BHV-1 e -5 por eletroforese capilar

Para avaliar a viabilidade da análise da forma e intensidade dos picos fluorescentes gerados pela eletroforese capilar para a detecção de BHV em amostras de sangue, alíquotas de produtos de nested PCR originados de estirpes de referência de BHV-1 e BHV-5 foram submetidos paralelamente à eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio e eletroforese capilar. Em contraposição à dificuldade de discriminação dos fragmentos de DNA de BHV-1 (301 pb) e BHV-5 (273 pb) em sistema de eletroforese de agarose, o uso de oligonucleotídeo marcado acoplado ao sistema automatizado de eletroforese capilar proporcionou clara diferenciação entre fragmentos específicos de DNA de BHV-1 e BHV-5 (Figura 4).

Detecção de BHV por sorologia e nested PCR em animais de abatedouro

A detecção de anticorpos anti-BHV-1 utilizando o teste ELISA Screening foi positiva em 68 dos 100 animais (Tabela 1). As amostras positivas foram confirmadas utilizando a placa de verificação fornecida no HerdChek® Infectious Bovine Rhinotracheitis Antibody Test Kit - IBR ELISA Screen/Verification (IDEXX Laboratories Inc.).

Todos as amostras de leucócitos e gânglios trigeminais foram submetidas à detecção por nested PCR em gel de agarose 2% e eletroforese capilar automatizada (Figura 5). Somando-se todos os sinais positivos de PCR a partir de leucócitos e gânglios trigeminais, a detecção de DNA viral ocorreu 88 vezes (32 vezes em leucócitos e 56 vezes em gânglios trigeminais) (Tabela 1). Dos 10 diferentes lotes analisados neste estudo, foi possível detectar BHV-1 desde 1 até 10 indivíduos por propriedade,

tanto por ELISA como por nested PCR fluorescente de gânglios trigeminais (TKT). Amostras positivas para BHV-1 por nested PCR de leucócitos (TKL) foram identificadas em 8 propriedades. Também foi possível detectar BHV-5 em gânglios trigeminais em 5 propriedades (Tabela 2). Todas as amostras positivas de leucócitos demonstraram o mesmo padrão na eletroforese capilar (Figura 4), que foram confirmados por sequenciamento direto do DNA. Das 56 amostras de gânglios trigeminais positivas, 43 foram compatíveis somente com padrões de eletroforese capilar para BHV-1, enquanto 12 com padrão BHV-5. Uma amostra de gânglio trigeminal apresentou ambos os picos, porém somente BHV-1 pôde ser confirmado por sequenciamento (Tabela 1).

DISCUSSÃO

No presente estudo, descrevemos um método simples para detecção de herpesvirus bovino em leucócitos utilizando nested PCR fluorescente, desenhado para amplificar um fragmento de 301 pb e/ou 273 pb (BHV-1 ou BHV-5 respectivamente) do gene TK, baseando-se nas diferenças existentes na região escolhida entre os genomas dos dois tipos virais (Figura 1). O delineamento desse teste objetivou oferecer uma ferramenta rápida e barata para estudos epidemiológicos. Sinais positivos de PCR até o limiar de 10^{-2} TCID₅₀/ml e 10^1 TCID₅₀/ml, para BHV-1 e BHV-5 respectivamente, indicam o potencial deste teste diagnóstico para triagens de BHV em larga escala. O uso de um teste de PCR bovino-específico no DNA proveniente das amostras de campo (leucócitos e gânglios trigeminais de animais de abatedouro), demonstrou a eficiência do processo de purificação de DNA empregado, indicando a produção de uma solução de DNA livre de contaminantes que poderiam inibir futuras reações enzimáticas (Figura 2). A eficiência na detecção de BHV variou entre os tipos 1 e 5 (10^{-2} TCID₅₀/ml e 10^1

TCID₅₀/ml respectivamente). Apesar de amostras de referência terem sido utilizadas, as diferenças encontradas na sensibilidade entre ambos os tipos em diluições seriadas pode ser atribuída a existência de seqüência de 4 bases (TGGT) na extremidade 5' do oligonucleotídeo TK3 (Figura 1), inexistente no genoma de BHV-5, que pode causar anelamento ineficiente quando o alvo é este último (Figuras 3A e 3B).

Visando melhorar a discriminação entre os fragmentos amplificados por PCR a partir de BHV-1 e BHV-5, utilizou-se sistema de eletroforese capilar para detecção dos mesmos. O oligonucleotídeo TK4 marcado com hexachloro-6-carboxyfluorescein (HEX) foi utilizado na segunda etapa de amplificação para as estirpes de referência Los Angeles e N569, e permitiu clara observação de dois diferentes padrões de pico (270 pb para BHV-1 e 245 pb para BHV-5). As análises em eletroforese capilar confirmaram os padrões de eletroforese em gel de agarose 2% (Figura 4). Foi observada alteração na migração de DNA quando comparadas eletroforese em gel de agarose e capilar, o que pode ser explicada pela relação não-linear entre tamanho de fragmento e migração quando os diferentes sistemas de eletroforese são comparados (MC CORD et al., 1993; KOUMI et al., 2004). Sistemas automatizados de eletroforese capilar, apesar de possuir custo operacional e sofisticação maiores, permitem o processamento de amostras em grande escala, permitindo a semi-automatização dos procedimentos de diagnóstico. A abordagem baseada em eletroforese capilar tem sido utilizada com sucesso para detectar outros agentes infecciosos (ENGLUND et al., 2001; LI et al., 2000) indicando o potencial para aplicação desta ferramenta na área de diagnóstico.

A detecção de BHV-1 e 5 utilizando nested PCR fluorescente em leucócitos (TKL) foi realizada em paralelo com o nested PCR fluorescente de gânglios trigeminiais (TKT) e teste sorológico de ELISA. O teste de ELISA indicou 68 animais positivos

distribuídos ao longo dos 10 lotes analisados, entretanto, somente 18 amostras foram confirmadas por nested PCR TKL e 38 por nested PCR TKT (Tabela 1). Testes sorológicos, como o ELISA indireto utilizado neste estudo, baseiam-se na detecção de anticorpos produzidos após infecção ou presentes na circulação em anos subseqüentes após infecção, mesmo após o desaparecimento dos sinais clínicos (BABIUK *et al.*, 1996). Baseado nessa premissa, animais sorologicamente positivos podem ser negativos por PCR, no caso do BHV estar presente em quantidades abaixo do limiar de detecção do método (FUCHS *et al.*, 1999). Uma vez que o gânglio trigeminal é tido como sítio clássico de latência para o grupo de vírus BHV-1 e 5 (PIDONE *et al.*, 1999; SCHUDEL *et al.*, 1987; NARITA *et al.*, 1983), números maiores de cópias virais por célula são esperados na área do gânglio trigeminal quando comparados com os presentes em leucócitos do sangue periférico. Este sítio foi co-investigado utilizando o teste de nested PCR e números maiores de animais positivos por nested PCR TKT (56) foram observados quando comparados com os resultados de TKL (32). Esse achado foi compatível com características específicas do mecanismo de latência viral. Pela análise dos animais negativos por ELISA e que foram classificados como positivos por nested PCR TKL e TKT (23 animais), uma possível interpretação poderia ser baseada na existência de baixos títulos de anticorpos em infecções latentes (HAGE *et al.*, 1998). Além disso, o estresse causado por mudanças de manejo (supressão de comida e água, além do transporte da propriedade para o frigorífico) pode ser um fator importante na reativação viral, ajudando a explicar estes resultados (THIRDY *et al.*, 1987).

Recentes estudos têm relatado o uso de técnicas de PCR objetivando diferenciar BHV-1 de BHV-5. Alegre *et al.* (1995) utilizaram o gene timidina quinase para BHV-1 e glicoproteína D para BHV-5 em um sistema multiplex. A maior diferença entre o relato

previamente publicado e a técnica descrita no presente estudo é que o gene alvo utilizado é o mesmo tanto para BHV-1 quanto para BHV-5 (timidina quinase), explorando diferenças na seqüência de DNA existentes entre os dois tipos. Claus *et al.* (2005) descreveram um teste PCR multiplex em ensaio que explora diferenças na seqüência do gene da glicoproteína C onde demonstram a viabilidade de detecção e diferenciação em eletroforese em gel de agarose 2% de até 5 e 50 TCID₅₀/ml de BHV-1 e BHV-5 respectivamente. Esses relatos recentes têm demonstrado a rapidez desses métodos de detecção e diferenciação para BHV-1 e BHV-5 em amostras biológicas originadas de animais com sintomatologia clínica de forma infecciosa genital, abortiva ou encefálica. Relativamente à detecção de DNA de BHV-1 em sangue total, considerando o potencial uso dos métodos baseados em PCR para estudos epidemiológicos, a primeira descrição vem de Fuchs *et al.* (1999). Esses autores descreveram a aplicação de um conjunto de técnicas de PCR desenhadas para detectar BHV-1 em sangue total derivado de animais com sintomatologia clínica, resultados sorológicos positivos e/ou com histórico de IBR. Até onde nosso conhecimento nos permite afirmar, nenhum outro estudo envolvendo detecção de BHV em animais naturalmente infectados utilizando DNA de sangue total como alvo principal de PCR foi publicado até o presente, entretanto a detecção em sangue e em tecidos não neurais de bovinos infectados experimentalmente foi anteriormente descrita por Mweene *et al.*, (1996). No presente estudo descrevemos um método simples para detecção de DNA de BHV-1 presente em amostras de DNA de leucócitos de sangue periférico de animais sem sintomatologia clínica, escolhidos aleatoriamente em frigorífico, em um único teste de nested PCR.

Leucócitos de sangue periférico têm a vantagem de constituírem tecido de fácil e rápido acesso, permitindo a amostragem de grande número de animais vivos. Nesse contexto, devido a dificuldade de diferenciação de fragmentos de PCR em eletroforese em gel de agarose 2% (que está baseada na diferença aproximada de 23 pb presente nessa seqüência específica de DNA entre BHV-1 e BHV-5), a detecção utilizando o sistema automatizado de eletroforese capilar demonstrou especificidade suficiente para diferenciar os fragmentos de PCR distintos (Figura 4). Além disso, o uso da eletroforese capilar permitiu diferenciação de BHV tipo 1 e 5 em amostras de gânglios trigeminais, abrindo a clara possibilidade para uso das abordagens sorológicas e genéticas combinadas para estudos epidemiológicos.

Experimentos adicionais com maior número de amostras de campo são necessários para certificar a aplicabilidade do uso do nested PCR fluorescente em leucócitos de sangue periférico em levantamentos epidemiológicos.

AGRADECIMENTOS

Este estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo- FAPESP (processo nº 02/08369-9 e nº 02/08470-1). Agradecemos ao Frigorífico Bertin Ltda- SP- Brasil pelas amostras de frigorífico e a Érica Ribeiro pelo precioso suporte técnico no seqüenciamento de DNA.

REFERÊNCIAS

ALEGRE, M.; NANNI, M.; FONDEVILA, N. Development of a Multiplex Polymerase Chain Reaction for the Differentiation of Bovine Herpesvirus 1 and 5. *Journal of Veterinary Medicine Series B* V.48, v.8, p.613-621, 2001.

ASHBAUGH, S.E.; THOMPSON, K.E.; BELKNAP, E.B.; SCHULTHEISS, P.C.; CHOWDHURY, S.; COLLINS, J.K. Specific detection of shedding and latency of bovine herpesvirus 1 and 5 using a nested polymerase chain reaction. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.9, n.4, p.387–394, 1997.

BABIUK, L.A.; VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S.; TIKOO, S.K. Immunology of bovine herpesvirus 1 infection. *Veterinary Microbiology*, v.53, n.1-2, p.31-42, 1996.

BARR, M.C; ANDERSON, M.L. Infectious diseases causing bovine abortion and fetal loss. *The Veterinary Clinics of North American- Food and Animal Practice*, v.9, n.2, p. 343-368, 1993.

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

CHOWDHURY, S.I. Molecular basis of antigenic variation between the glycoproteins C of respiratory bovine herpesvirus 1 (BHV-1) and neurovirulent BHV-5. *Virology*, v.213, n.2, p.558-568, 1995.

CLAUS, M.P.; ALFIERI, A.F.; FOLGUERAS-FLATSCHART, A.V.; WOSIACKI, S.R.; MÉDICI K.C.; ALFIERI, A.A. Rapid detection and differentiation of bovine herpesvirus 1 and 5 glycoprotein C gene in clinical specimens by multiplex-PCR. *Journal of Virological Methods*, v.128, n.1-2, p.183-188, 2005.

D'ARCE, R.C.F.; ALMEIDA, R.S.; SILVA, T.C.; FRANCO, A.C.; SPILKI, F.; ROEHE, P.M.; ARNS, C.W. Restriction endonuclease and monoclonal antibody analysis of Brazilian isolates of bovine Herpesvirus types 1 and 5. *Veterinary Microbiology*, v.88, n.4, p.315–324, 2002.

DE GEE, A. L. W., L. H. A. WAGTER, AND J. J. HAGE. 1996. The use of polymerase chain reaction assay for the detection of bovine herpesvirus 1 in semen during a natural outbreak of infectious bovine rhinotracheitis. *Veterinary Microbiology*, v.53, n.1-2, p.163-168, 1996.

ENGLUND, S.; BOLSKE, G.; BALLAGI-PORDÁNY, A.; JOHANSSON, K.E. Detection of *Micobacterium avian* subs *paratuberculosis* in tissues samples single, fluorescent and nested PCR based on the IS900 gene. *Veterinary Microbiology*, v.81, n.3, p.257-271, 2001.

FAUQUET, C.M.; MAYO, M.A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L.A. Virus Taxonomy. The Eighth Report. Academic Press, San Diego, p. 1162, 2004.

FUCHS, M., HÜBERT, P., DETTERER, J., RZHIHA, H. Detection of bovine herpesvirus type 1 in blood from naturally infected cattle by using a sensitive PCR that discriminates between wild-type virus and virus lacking glycoprotein E. *Journal of Clinical Microbiology*, v.37, n.8, p.2498-2507, 1999.

GIAVEDONI, L.D.; RUIZ, M.; FIJTMAN, N.; SCHUDEL, A.A.; RODRIGUEZ, M. Rapid diagnosis of bovine herpesvirus encephalitis: comparison of nucleic acid hybridization and immunoperoxidase methods using clinical samples. *Journal of Virological Methods*, 35: 280-285, 1988.

GOMES, L.I.; ROCHA, M.A.; COSTA, E.A.; LOBATO, Z.I.P.; MENDES, L.C.N.; BORGES, A.S.; LEITE, R.C.; BARBOSA-STANCIOLI, E.F. Detection of bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) in cattle in Southeast Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.54, n.2, p.217-220, 2002.

GOMES, L.I.; ROCHA, M.A.; SOUZA, J.G.; COSTA, E.A.; Bovine herpesvirus 5 in bull semen: amplification and sequence analysis of the US4 gene. *Veterinary Research Communications*, v.27, n.6, p.495- 504, 2003.

HAGE, J.J.; GLAS, R.D.; WESTRA, H.H., MARIS-VELDHUIS, M.A., VAN OIRSHOT, J.T, RIJSEWIJK, F.A. Reactivation of latent bovine Herpesvirus 1 in cattle seronegative to gB and gE. *Veterinary Microbiology*, p.60, n.2-4, p.87-98, 1998.

HUBNER S.O; OLIVEIRA A.P.; FRANCO A.C.; ESTEVES P.A.; SILVA A.D.; SPILKI F.R.; RIJSEWIJK F.A.; ROEHE PM. Experimental infection of calves with a gI, gE, US9 negative bovine herpesvirus type 5. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, v.28, n.3, p.187-96, 2005.

KATARIA, R. S., TIWARI, A. K., GUPTA, P. K., MEHROTA, M. L., RAI, A., BANDYOPADHYAY, S. K. Detection of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) genomic sequences in bovine semen inoculated with BHV-1 by polymerase chain reaction. *Acta Virologica*, v.41, n.6, p.311-315, 1997.

KIRKBRIDE, C.A. Managing an outbreak of livestock abortion. 2- Diagnosis and control of bovine abortion. *Vet. Med.*, v.80, p.70-79, 1985.

LI, Q.; LIANG, J.; LUAN, G., ZAHNG, Y.; WUANG, K. Molecular beacon-based homogeneous fluorescence PCR assay for the diagnosis of infectious diseases. *Analytical Sciences*, v.16, n.1, p.245-248, 2000.

MASRI, S. A., OLSON, W., NGUYEN, P. T., PRINS, S., DEREGI, D. Rapid detection of bovine herpesvirus 1 in the semen of infected bulls by nested polymerase chain reaction assay. *Canadian Journal of Veterinary Research*, v.60, n.2, p.1000-1007, 1996.

MCCORD, B.R.; JUNG, J.M.; HOLLERAN, E.A. High resolution capillary electrophoresis of forensic DNA using a non gel sieving buffer. *Journal of Liquid Chromatography*. v.16, p.1963-1981, 1993.

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

-
- MWEENE, A.S.; OKASAKI, K.; KIDA, H. Detection of viral genome in non-neural tissues of cattle experimentally infected with bovine herpesvirus 1. *Japanese Journal of Veterinary Research*, v.44, n.3, p.165-74, 1996.
- NARITA, M.; INUI, S.; NANBA, K.; SHINIZU, Y. Detection of Virus Particles in Trigeminal Ganglion cells in a Calf Recurrently Infected with Infectious Bovine Rhinotracheitis. *Japanese Journal of Veterinary Sciences*, v.45, n.5, p.691-693, 1983.
- NATHANKARNKITKOOL, S.; OEFNER, P.J.; BARTISCH, G.; CHIN, M.A.; BONN, G.K. High-resolution capillary electrophoretic analysis of DNA in free solution. *Electrophoresis*, v.13, p.18-31, 1992.
- PIDONE, H.; GALOSI, C.; ETCHEVERRIGARAY, M. Herpes bovinos 1 y 5. *Analecta Argentina*, v.19, 40-50, 1999.
- ROCK, D.L.. The molecular bases of latent infections by alphaherpesviruses. *Seminars in Virology*, 4: 157-165, 1993.
- ROEHE, P.M.; SILVA, T.C.; NARDI, N.B.; OLIVEIRA, L.G.; ROSA, J.C.A. Diferenciação entre os vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (BHV-1) e vírus da encefalite bovina (BHV-5) com anticorpos monoclonais. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.17, n.1, 41-44, 1997.
- ROIZMAN, B.; DESROSIERS, R.C.; FLECKESNSTEIN, B.; LOPEZ, C.; MINSON, A.C.; STUDDERT, M.J. The family Herpesviridae: an update. The Herpesvirus Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Archives of Virology*, v.123, n.3-4, p.425-449, 1992.
- ROS, C.; BELÁK. S. Characterization of the glycoprotein B gene from ruminant alphaherpesviruses. *Virus Genes*, v.24, n.2, p.99-105, 2002.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning - A Laboratory Manual, 2 Ed. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, 1989.
- SANTURDE, G., DA SILVA, N., VILLARES, R., TABARÉS, E., SOLANA, A., BAUTISTA, J. M., CASTRO, J. M. Rapid and high sensitivity test for direct detection of bovine herpesvirus-1 genome in clinical samples. *Veterinary Microbiology*, v.49, n.1-2, p.81-92, 1996.
- SCHUDEL, A.A.; RODRÍGUEZ, M.; CARRILLO, B.J. Biotecnología en el diagnóstico, caracterización y prevención de la encefalitis bovina a BHV-1. *Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias y Agronómicas– Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria*, 1987.
- SMITS, C. B., VAN MAANEN, C., GLAS, R. D., DE GEE, A. L. W., DIJKSTRAB, T, VAN OIRSCHOT, J. T., RIJSEWIJK, F. A. M. Comparison of three polymerase chain reaction

methods for routine detection of bovine herpesvirus 1 DNA in fresh bull semen. *Journal of Virological Methods*, v.85, n.1-2, p.65- 73, 2000.

SOUZA, V.F.; MELO, S.V.; ESTEVES, P.A.; SCHMIDT, C.S.; GONÇALVES, D.A.; SCHAEFER, R.; SILVA, T.C.; ALMEIDA, R.S.; VICENTIN, F.; FRANCO, A.C.; OLIVEIRA, E.A.; SPILKI, F.R.; WEIBLEN, R.; FLORES, E.F.; LEMOS, R.A.; ALFIERI, A.A.; PITUCO, E.M.; ROEHE, P.M. Caracterização de herpesvírus bovinos tipos 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5) com anticorpos monoclonais. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.22, n.1, p.13-18, 2002.

THIRTY, E.; SALICI, J.T.; BUBLLOT, M.; PASTORET, P.P. Reactivation of infectious bovine rhinotracheitis virus by transport. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, v.10, n.1, p.59-63, 1987.

VAN ENGELENBURG, F. A. C., M. J. KAASHOEK, J. T. VAN OIRSCHOT, AND F. A. M. RIJSEWIJK. 1995. A glycoprotein E deletion mutant of bovine herpesvirus 1 infects the same limited number of tissues in calves as wild type virus, but for a shorter period. *Journal of General Virology*, v.76, n.9, p.2387–2392, 1995.

VOGEL, F.S.F.; FLORES E.F.; WEIBLEN, R.; WINKELMANN, E.R.; MORAES, M.P.; BRAGANÇA, J.F.M.. Intrapreputial infection of young bulls with bovine herpesvirus type 1.2 (BHV-1.2): acute balanoposthitis, latent infection and detection of viral DNA in regional neural and non-neural tissues 50 days after experimental reactivation. *Veterinary Microbiology*, v.98, n.3-4, p.185-196, 2004.

WAGTER, L. H., GLAS, R. D., BLEUMINK-PLUYM, N., VAN ENGELENBURG, F. A. RIJSEWIJK, F. A., HOWVERS, D. J. A polymerase chain reaction (PCR) assay for the detection of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) in selectively digest whole bovine semen. *Veterinary Research Communications*, v.20, n.4, p.401-408, 1996.

WENZ, H. M. Capillary electrophoresis as a technique to analyze sequence-induced anomalously migrating DNA fragments. *Nucleic Acids Research.*, v.22, n. 19, p.4002-4008, 1994.

WINKLER, M. T. C., DOSTER, A., JONES, C. Persistence and reactivation of bovine herpesvirus 1 in the tonsils of latently infected calves. *Journal of Virology*, v.74, n.11, p.5337- 5346, 2002.

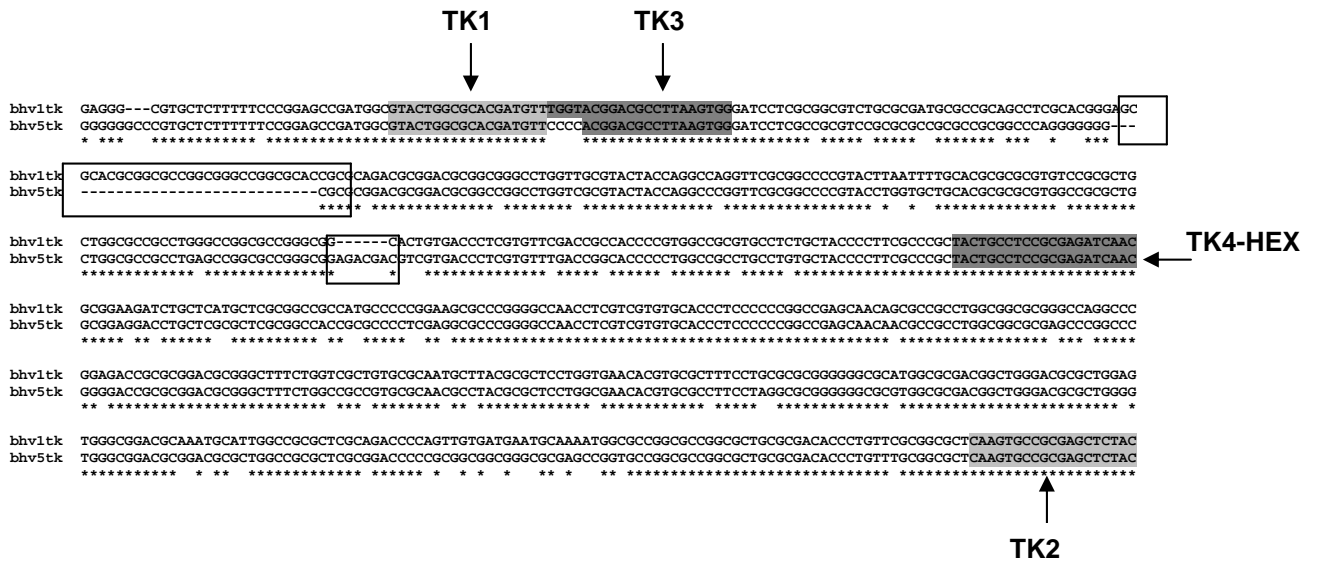


Figura 1: Representação esquemática dos conjuntos de oligonucleotídeos para o nested PCR fluorescente utilizado para a detecção de BHV-1 e BHV-5 baseado no gene timidina quinase (TK). Setas indicam posição dos conjuntos de oligonucleotídeos na seqüência do gene. TK1 e TK2: conjunto de oligonucleotídeos utilizado para amplificação externa. TK3 e TK4-HEX: conjunto de oligonucleotídeos internos utilizado para nested PCR fluorescente. Caixa: Pontos de diferença na seqüência de DNA do gene TK entre BHV-1 e BHV-5.

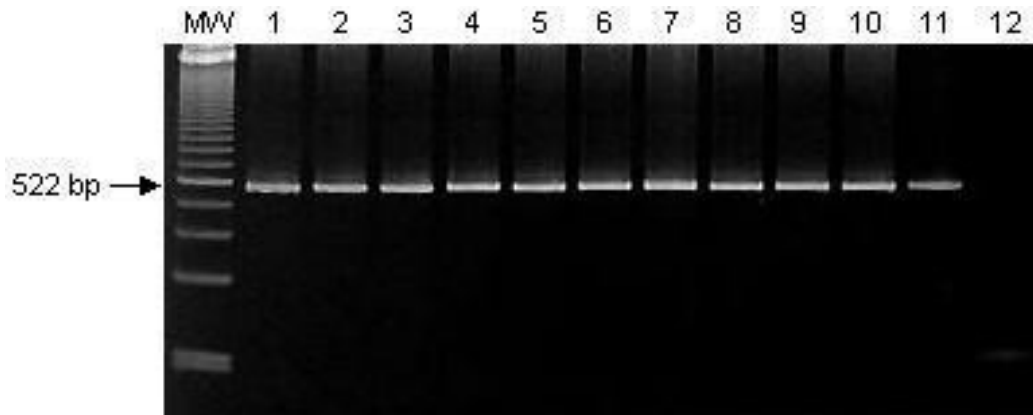


Figura 2: Avaliação da qualidade do DNA de leucócitos de sangue periférico obtidos em abatedouro através da PCR para fragmento específico do gene LHR bovino (bLHR). MW) Marcador de peso molecular “100 pb DNA ladder”. 1-11) DNA de 10 amostras de leucócitos de animais selecionados aleatoriamente. 12) Controle negativo da PCR (sem DNA).

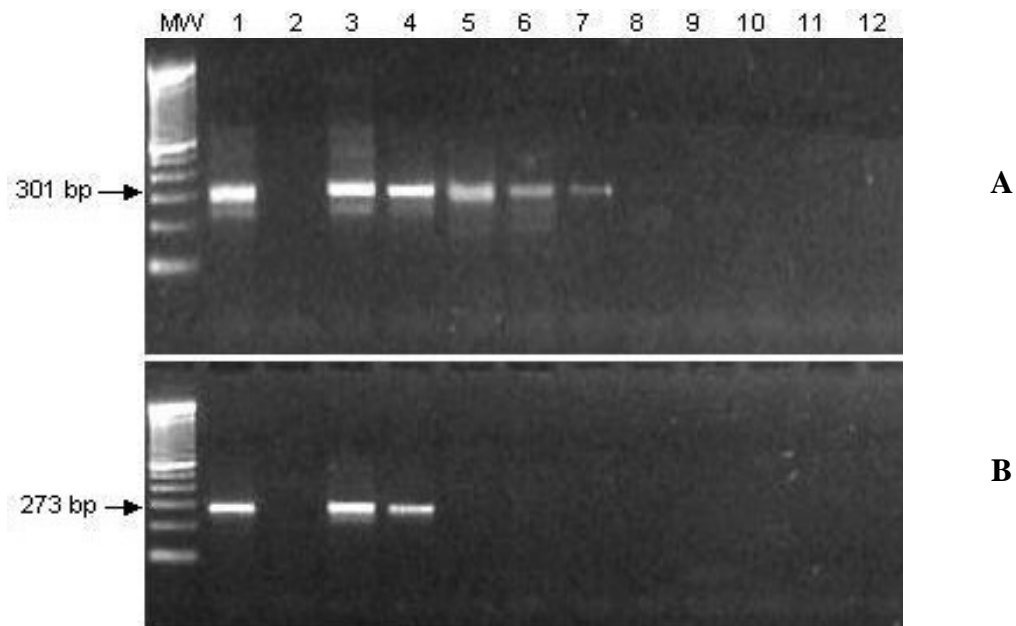


Figura 3: Determinação do limiar de detecção para BHV-1 e BHV-5 em diluições seriadas em sangue bovino livre de BHV visualizadas em eletroforese de gel de agarose 2% corado com brometo de etídio onde A) Diluições seriadas de BHV-1 em sangue bovino livre de BHV. B) Diluições seriadas de BHV-5 em sangue bovino livre de BHV. MW) Marcador de peso molecular “100 pb DNA ladder”, A1 e B1) DNA controle positivo A2 e B2) DNA de sangue bovino livre de BHV. A3/B3 a A11/B11) Diluições seriadas de vírus em sangue livre de BHV de 10^2 TCID₅₀/ml a 10^{-6} TCID₅₀/ml. A12 e B12) Controle negativo da PCR (sem DNA).

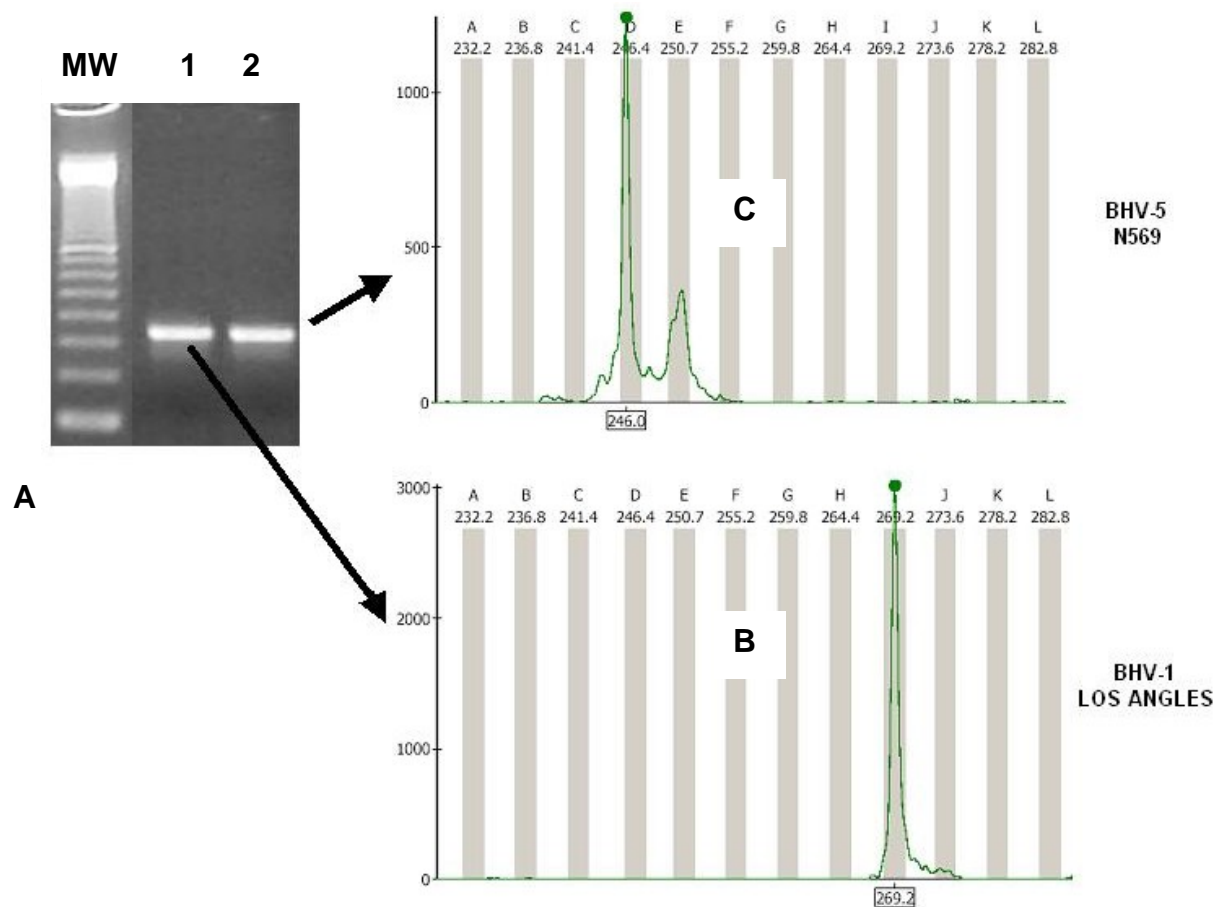


Figura 4: Demonstração da aplicabilidade do método de detecção de BHV por eletroforese capilar. A) eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio. MW) Marcador de peso molecular “100 pb DNA ladder”, 1) Amplificação por nested PCR de estirpe de referência de BHV-1 (Los Angeles) e 2) Amplificação por nested PCR de estirpe de referência de BHV-5 (N569). B) Padrão de pico de eletroforese capilar a partir de amplificação por nested PCR de estirpe de referência de BHV-1 (Los Angeles) e C) Padrão de pico de eletroforese capilar a partir de amplificação por nested PCR de estirpe de referência de BHV-5(N569).

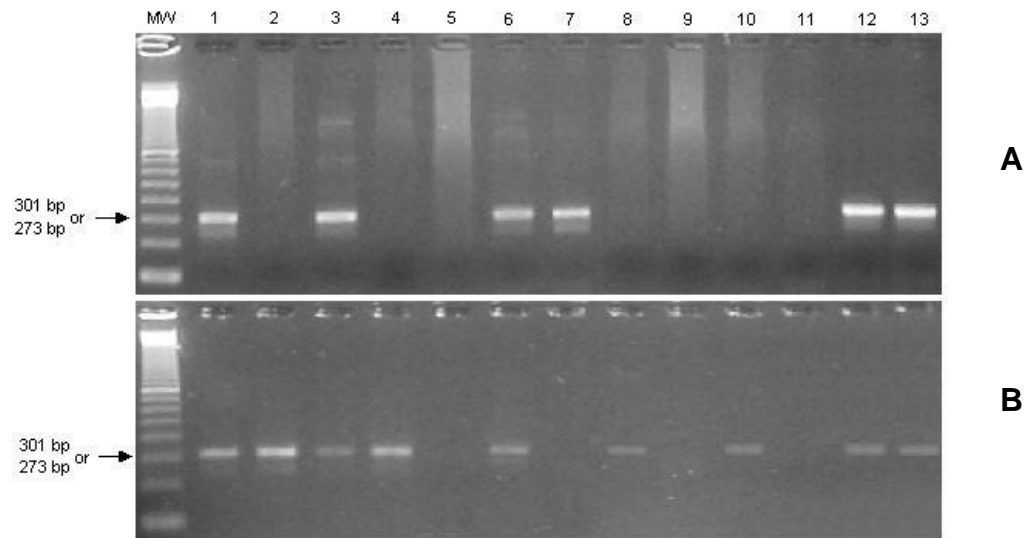


Figura 5: Teste de detecção para BHV baseado em PCR de amostras de bovinos de abatedouro. A) DNA de leucócitos de sangue periférico (TKL) e B) DNA de gânglio trigeminal (TKT). MW) Marcador de peso molecular “100 pb DNA ladder”, 1-10) Amostras selecionadas aleatoriamente (de 61 a 70) 11) Controle negativo da PCR (sem DNA), 12) DNA de estirpe de referência de BHV-1 (Los Angeles) e 13) DNA de estirpe de referência de BHV-5 (N569).

Tabela 1: Resultados gerais do diagnóstico de BHV utilizando ELISA, nested PCR de leucócitos de sangue periférico (TKL) e nested PCR de gânglios trigeminais (TKT) em bovinos de abatedouro.

ELISA	TKL	TKT	Número total de animais por categoria
+	-	-	23
+	270	-	7
+	270	270	8
+	270	245	3
+	-	270	20
+	-	245	6
+	-	270/245	1
-	270	270	7
-	270	245	2
-	270	-	5
-	-	270	8
-	-	245	1
-	-	-	9
68^a	32^a	56^a	100^b

^a Número de amostras positivas, ^b Número total de bovinos abatidos, 245 = positivo para BHV-5 e 270 = positivo para BHV-1

Tabela 2: Origem geográfica dos bovinos de abatedouro e resultados de ELISA, nested PCR de leucócitos de sangue periférico (TKL) e nested PCR de gânglios trigeminais (TKT) por propriedade.

Lote	Município	ELISA	BHV-1		BHV-5		Número total de tecidos positivos por propriedade
			TKL	TKT	TKL	TKT	
1	Três Lagoas- MS	5	1	2	-	-	3
2	Marília- SP	9	-	5	-	5	10
3	Rosana- SP	10	3	7	-	-	10
4	Araçatuba- SP	7	-	4	-	-	4
5	Lins- SP	10	2	2	-	-	4
6	Três Lagoa- MS	5	9	6	-	-	15
7	Marília- SP	6	6	5	-	2	13
8	Três Lagoa- MS	1	4	5	-	2	11
9	Inocência- MS	9	3	4	-	2	9
10	Camapuã- MS	6	4	5 ^a	-	1 ^a	9
TOTAL	-	68	77	12			

^a Um animal com infecção por ambos os vírus.

Regiões Repetitivas de Tamanho Variável (VNTR) no Genoma do Herpesvírus Bovino tipo 1 (BHV-1) como Potencial Ferramenta em Identificação Viral

Sergio M. Aoki^{ab}, Paulo M. Roehe^c, Cárís M. Nunes^a, Luzia H. Q. Silva^a, Anna P. Oliveira^c, José F. Garcia,^{a*}

^a Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal, Universidade Estadual Paulista – UNESP - Araçatuba, SP, Brazil, 16050-680.

^b Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista – UNESP - Botucatu, SP, Brazil, 18618-000.

^c DM/ICBS-UFRGS & CPVDF-FEPAGRO, Estrada do Conde 6000, Eldorado do Sul, RS, Brazil, 92990-000.

*** Corresponding author:**

Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular Animal (LBBMA)

International Atomic Energy Agency (IAEA) Collaborating Centre on Animal Genomics and Bioinformatics

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP

Rua Clóvis Pestana, 793 – Jd. D. Amélia - 16.050-680

Araçatuba, SP, Brazil.

Fone: (18) 3636-3200 ext. 3636

Email: jfgarcia@terra.com.br

RESUMO

O presente estudo relata a descoberta e caracterização de seqüências compostas por regiões repetitivas de tamanho variável (VNTR) no genoma do Herpesvírus Bovino tipo 1 (BHV-1) e ilustra a aplicabilidade destas regiões para identificação viral. A análise do genoma do BHV-1 (número de acesso GenBank NC_001847) utilizando análises *in silico* específicas indicou 53 potenciais candidatos a regiões VNTR distribuídos ao longo do DNA viral fita dupla. DNA de estirpes referência de BHV-1, isolados de campo (BHV-1.1 e BHV-1.2), vacina comercial composta por BHV-1 atenuado e estirpe referência de BHV-5 foram submetidos à PCR utilizando 3

pares de primers visando amplificar regiões VNTR selecionadas e a um teste de nested PCR discriminatório para possibilitar diferenciação entre BHV-1 e BHV-5. As 3 regiões VNTR acessadas por PCR apresentaram polimorfismos de tamanho causados por variações no número de repetições, permitindo a identificação de cada estirpe individualmente. A análise de regiões VNTR do BHV-1 demonstrou ser alternativa rápida e prática, quando comparada ao seqüenciamento e RFLP (do inglês: restriction fragment length polymorphism) para genotipagem viral, e com potencial aplicações em estudos evolutivos e epidemiológicos.

Palavras-chave: BHV-1, PCR, VNTR, genotipagem, repetitive DNA.

INTRODUÇÃO

Regiões repetitivas de tamanho variável (VNTR) são regiões repetitivas de DNA distribuídas nos genomas. Arranjos ao acaso de seqüências repetidas de DNA estão posicionados livremente ao longo do genoma, variando desde repetições nucleotídicas simples até repetições de grandes fragmentos de seqüência (GOLDSTEIN & SCHLOTTERER, 1999). Essa característica pode ser observada desde vírus até mamíferos e tem sido descrita alta variabilidade quanto ao número de repetições (TAUTZ & SCHLOTTER, 1994; FIELD & WILLS, 1998). Regiões VNTR podem variar em tamanho (FOSTER & TRIMARCHI, 1994) e estar envolvidas com características biológicas (MOXON *et al.* 1994). Muitos exemplos de VNTR funcionais têm sido descritos em diversas classes de vírus (DAVIS *et al.*, 1999). Repetições mononucleotídicas funcionais foram encontradas em Mengovírus (DUKE *et al.*, 1990; HAHN & PALEMBERG, 1995), Vírus da Estomatite Vesicular (BARR *et al.*, 1997), Vírus

da Hepatite C (YAMADA *et al.*, 1996) e Vírus Sincicial Respiratório Humano (GARCIA-BARRENO *et al.*, 1994).

O aumento de virulência do Vírus da Influenza Aviária tem sido atribuído a mudanças no número de repetições de trinucleotídeos e tetranucleotídeos no sítio de clivagem da hemaglutinina (PERDUE *et al.*, 1997; WEBSTER *et al.*, 1992). A existência de regiões VNTR relacionadas à alteração da expressão e/ou conformação protéica, demonstra que a expansão e contração no número de repetições nucleotídicas é um fenômeno recorrente nos vírus (DAVIS *et al.*, 1999). Em estudo pioneiro envolvendo caracterização genética molecular do BHV-1, Hammerschmidt *et al.* (1986) analisaram o genoma de diferentes estirpes de BHV-1 pela técnica de RFLP utilizando a endonuclease Hind III e descreveu heterogeneidade em um fragmento específico da região terminal UL (do inglês: Unique Long). Este fragmento polimórfico foi detectado em DNA de amostras selvagens, isolados com alto número de passagens em cultura de células, bem como em estirpes não patogênicas. O seqüenciamento de DNA dos fragmentos de RFLP revelaram que a heterogeneidade era causada por repetições curtas de 14 pb (5' GCTCCTCCTCCCTC 3'), que eram conservadas em outros vírus (Herpes Simplex Virus tipo 1- HSV-1 e Epstein-Barr Virus EBV). A variabilidade compreendeu entre 8 e 38 unidades de repetição de 14 pb com heterogeneidade geral da região de aproximadamente 400 pb. Apesar de nenhuma característica relacionada à atenuação ter sido atribuída a esta região neste estudo, suspeitou-se que este VNTR influencie a replicação viral, sugerindo a existência de outros potenciais VNTR ao longo do genoma do BHV-1. Recentemente, Walker *et al.* (2001) caracterizaram estirpes de Citomegalovírus humano (HCMV), um Betaherpesvírus de 240 Kb, através de análises de VNTR. Estes autores utilizaram 10 regiões repetitivas que permitiram a

caracterização de 46 estirpes diferentes. Baseados em Davis *et al.* (1999) que demonstraram a aplicabilidade do uso de softwares específicos para localizar regiões VNTR candidatas em todo genoma viral, o objetivo do presente estudo foi localizar este tipo de seqüências de DNA no genoma do BHV-1 através de análise computacional, e utilizar esta informação para propor novas ferramentas de caracterização molecular.

MATERIAL E MÉTODOS

Análise in silico do genoma do BHV-1

A busca por regiões repetitivas no genoma do BHV-1 (NC_001847 GenBank) foi conduzida com o auxílio do software Tandem Repeats Finder[®] (Benson, 1999), que utiliza algoritmo específico que procura por repetições adjacentes através de critérios de porcentagem de identidade e freqüência das repetições. Cinquenta e três potenciais regiões VNTR foram identificadas (Tabela 1). Pretendendo demonstrar a viabilidade da busca de VNTR *in silico*, três regiões candidatas foram submetidas ao desenho de primers utilizando o software Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi).

Estirpes virais

Estirpes de referência de BHV-1 e BHV-5, e isolados virais (BHV-1.1 e BHV-1.2) foram preparadas no Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor- IPVDF- Eldorado do Sul- RS- Brasil (Tabela 4). Todas as estirpes foram propagadas em cultura de células MDBK em MEM (Modified Eagle Media), suplementado com 10% de albumina sérica bovina (BSA), 10 µg/ mL de enrofloxacina (Baytril[®]) e incubadas a 37°C

em ambiente com 5% de CO₂. A purificação do DNA a partir de suspensão de células infectadas foi realizada com o sistema Qiamp[®] DNA mini kit (Qiagen, USA) conforme instruções do fabricante. DNA de amostra de vacina comercial composta por BHV-1 atenuado Cattle Master[®] (Pfizer Animal Health, New York, USA) foi isolado da mesma forma. A eluição do DNA das colunas foi realizada com 200 µL do buffer de eluição incluso no sistema de purificação.

PCR e eletroforese capilar

Visando diferenciar amostras de BHV-1 de BHV-5, metodologia de nested PCR fluorescente foi desenhada para gerar padrões de pico diferentes em eletroforese capilar para cada um dos vírus (270 pb e 245 pb respectivamente). A primeira etapa de amplificação por PCR foi realizada em volume final de 50 µL contendo: 20 µL de solução de DNA, 5,0 µL de DMSO, 20 pmol de cada primer (TK1 e TK2) (Tabela 3), 2,5 µM de cada dNTP, 5,0 µL tampão de reação *Taq* Polimerase 10 vezes concentrado (100 mM Tris-HCl, pH 9.0, 500 mM KCl), 2,0 mM de MgCl₂, e 1,0 U of Platinum *Taq* Polymerase (Invitrogen- USA), completando o volume com água ultrapura (Invitrogen- USA). As condições de amplificação foram definidas em um termociclador PTC- 100 (MJ-Research[®], Waltham, Massachusetts, USA), realizando 10 minutos de denaturação inicial, seguidos por 35 ciclos sendo os 10 primeiros começando a 94°C/50 segundos, 70°C/90 segundos e 72°C/60 segundos, e decrescendo 1°C na temperatura de anelamento a cada ciclo. Os 25 ciclos restantes foram realizados a 94°C/50 segundos, 60°C/90 segundos e 72°C/60 segundos com extensão final de 72°C por 10 minutos. A segunda etapa de amplificação foi realizada imediatamente após o término da primeira

etapa utilizando 2 μ L de produto de PCR da primeira reação. A mesma concentração de reagentes foi utilizada na segunda etapa, alterando somente o par de oligonucleotídeos iniciadores (TK3 e TK4, este último marcado com o fluorocromo hexachloro-6-carboxyfluorescein - HEX na extremidade 5') (Tabela 3). As condições de amplificação foram definidas em um termociclador PTC- 100 (MJ-Research[®], Waltham, Massachusetts, USA), realizando 10 minutos de denaturação inicial, seguidos por 35 ciclos sendo os primeiros 10 começando a 94°C/50 segundos, 70°C/90 segundos e 72°C/60 segundos, e decrescendo 0,5°C na temperatura de anelamento a cada ciclo. Os 25 ciclos restantes foram realizados a 94°C/50 segundos, 65°C/90 segundos e 72°C/60 segundos com extensão final de 72°C por 10 minutos.

Para detectar a variação de tamanho das 3 regiões VNTR potenciais selecionadas, foram utilizados 3 diferentes conjuntos de pares de oligonucleotídeos (Tabela 3). As mesmas concentrações e condições da segunda etapa de PCR foram aplicadas para VNTR2, VNTR4 e VNTR5, exceto pela adição dos respectivos conjuntos de pares de oligonucleotídios e 20 μ L de DNA molde.

Os produtos de PCR foram submetidos a análise por eletroforese capilar em sistema MegaBace 1000 (GE- Healthcare - UK Limited). A forma e intensidade dos picos foram monitoradas pelo uso do programa Fragment Profiler (GE- Healthcare - UK Limited) e um padrão interno de peso molecular ET-400R (GE- Healthcare - UK Limited) foi utilizado para acessar os tamanhos dos fragmentos.

Agrupamento filogenético das análises dos VNTRs

Baseado nos resultados da análise de PCR dos VNTRs (organizados em formato GenePop) foram desenhados agrupamentos filogenéticos de estirpes de BHV-1 e BHV-5 através dos programas Populations[®] e TreeView[®].

RESULTADOS

Análises in silico

Após realizar a análise computacional para prever regiões VNTR potenciais a partir do genoma do BHV-1 (NC_001847 GenBank), foi possível identificar 53 regiões VNTR candidatas ao longo de todo genoma, com diferenças no tamanho do período de repetições variando entre 3 e 94 pares de base (Tabela 1). O uso do programa Tandem Repeats Finder permitiu identificar 8 regiões com mais de uma possibilidade de combinação de repetições na mesma posição do genoma (Tabela 1).

Identificação e caracterização molecular de estirpes de referência utilizando marcadores VNTR

Para avaliar a viabilidade da utilização do método *in silico* para identificar marcadores VNTR, 3 regiões foram selecionadas para serem amplificadas por PCR (VNTR2, VNTR4 e VNTR5) localizadas nas posições 15, 44 e 53 Kb respectivamente, no segmento da região única longa (UL, do inglês Unique Long) do genoma do BHV-1. Conjuntos de primers flanqueando as regiões VNTR2, VNTR4 e VNTR5 foram desenhados apresentando marcação fluorescente no oligonucleotídeo reverso e utilizados sobre o DNA de diferentes estirpes de BHV (Tabela 2). Anteriormente ao uso dos primers VNTR, teste nested PCR fluorescente específico para o gene TK foi

aplicado em todas as amostras para discriminar BHV-1 de BHV-5. Todos os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese capilar e os fragmentos de DNA foram classificados em padrões de pico. Dois padrões diferentes foram encontrados para TK, 3 para VNTR2 e VNTR5 e 4 para VNTR4 (Figuras 2, 3, 4 e 5 e Tabela 3). Todas as estirpes geraram resultados positivos, exceto pela região VNTR4 a partir do BHV-5. Agrupamento filogenético das estirpes de BHV utilizadas neste estudo permitiram identificá-las e caracterizá-las individualmente (Tabela 4 e 6).

DISCUSSÃO

De acordo com as inferências de Davis *et al.* (1999) sobre tamanho dos genomas e capacidade de processamento de dados, foi observada a factibilidade do processamento do genoma completo do BHV-1 utilizando o programa Tandem Repeats Finder para a identificação de regiões VNTR potenciais virais. A identificação da distribuição de regiões VNTR potenciais ao longo de praticamente todo o genoma do BHV-1 demonstraram que estas regiões estão presentes não somente nas regiões de seqüência repetitiva interna e terminal (IR e TR do inglês: Internal and Terminal Repetitive respectivamente) de 11 Kb, como esperado dado o conhecido papel dessas regiões no funcionamento do genoma. Os conjuntos de oligonucleotídeos utilizados nesse estudo, permitiram a discriminação entre BHV-1 e BHV-5 (Figura 2) e o reconhecimento individual de 10 estirpes de referência examinadas. Os conjuntos de oligonucleotídeos específicos para as 3 regiões VNTR selecionadas produziram amplificação positiva, exceto pelo VNTR4 no BHV-5. Esta falha pode ser atribuída de alguma forma a polimorfismos presentes na região de anelamento do oligonucleotídeo ao BHV-5. Entretanto, resultados positivos na PCR utilizando os conjuntos de

oligonucleotídeos VNTR2 e VNTR5 demonstraram que esta metodologia pode ser aplicada em estudos com BHV-5, uma vez que este vírus possui aproximadamente 85% de homologia de DNA com o genoma do BHV-1 (CHOWDHURY *et al.*, 1995). As 10 estirpes examinadas foram distinguidas umas das outras pela análise do tamanho dos fragmentos em eletroforese capilar. Foram observados 3 padrões para VNTR2 (Figura 3), 4 para VNTR4 (Figura 4) e 3 para VNTR5 (Figura 5). Outras técnicas têm sido utilizadas para identificar e tipificar BHV-1/BHV-5. Métodos clássicos baseados em RFLP para classificação viral têm sido utilizados com sucesso, permitindo a análise de restrição de DNA de todo o genoma, sendo apto a indicar 5 subtipos (BHV-1.1, BHV-1.2a, BHV-1.2b, BHV-5a e BHV-5b) (METZLER *et al.*, 1985; ROIZMAN *et al.*, 1992). Entretanto, para ser utilizado eficientemente, o RFLP demanda de grandes quantidades de DNA, o que requer multiplicação viral em cultura de células. A genotipagem viral também tem sido realizada empregando a comparação de seqüências de DNA de genes específicos (MEYER *et al.*, 1999; SILVA *et al.*, 2000; ROS & BELÁK, 2002). Apesar de não requerer isolamento prévio por passagem em cultura de células, esta abordagem tem a desvantagem de analisar somente pequenos fragmentos de DNA, oferecendo visão limitada da variabilidade genômica. Os dados gerados no presente estudo sugerem a possibilidade para exploração de polimorfismos de VNTR como uma nova ferramenta de identificação individual de estirpes de BHV-1. Em oposição às desvantagens do RFLP e dos métodos baseados em seqüenciamento gênico, as análises de VNTR oferecem a possibilidade de cobertura de todo o genoma sem requerer grandes quantidades de DNA molde. A observação do grupo LAM/LAM US9-/LAM VHS- e SV265/SV265gE- na análise do agrupamento (Figura 6), indicou a conservação de padrões em estirpes similares mesmo após passagens em cultura de

células. Esse recurso também foi observado quando padrões da vacina Cattle Master[®] (Pfizer Animal Health, New York, USA) e estirpe Los Angeles também foram agrupadas.

Apesar de ser mais dispendiosa, a eletroforese capilar automatizada permite alta capacidade de processamento de amostras, permitindo a semi-automatização dos procedimentos de diagnóstico. As abordagens baseadas em eletroforese capilar têm sido utilizadas com sucesso na detecção de agentes infecciosos (ENGLUND *et al.*, 2001; LI *et al.*, 2000), indicando a aplicação potencial desta ferramenta na área de diagnóstico molecular. Além disso, a melhora da metodologia pelo emprego de multiplex-PCR através da utilização de conjuntos de oligonucleotídeos marcados com diferentes fluorocromos pode ser mais custo-efetiva. Além disso, pouca quantidade de DNA molde e menor tempo para análise completa são características positivas da eletroforese capilar.

Acreditamos que estudos futuros explorando o potencial das regiões VNTR descritas neste trabalho podem complementar o painel de marcadores para caracterização e identificação de BHV. O presente estudo forneceu um painel substancial de marcadores moleculares candidatos com potencial aplicabilidade em investigação evolutiva e epidemiológica do BHV-1.

AGRADECIMENTOS

Este estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo- FAPESP (processos nº 02/08369-9 e nº 02/08470-1). Agradecemos a Érica Ribeiro pelo precioso suporte técnico no desenvolvimento da eletroforese capilar.

REFERÊNCIAS

- BARR, J.N.; WHELAN, S.P.J.; WERTZ, G.W. cis-acting signals involved in termination of vesicular stomatitis mRNA synthesis include the conserved AUAC and the U7 signal for polyadenylation. *Journal of Virology*, v.71, n.11, p.8718–8725, 1997.
- BENSON, G. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Research*, v.27, n.2, p.573-580, 1999.
- DAVIS, C.L.; FIELD, D.; METZGAR, D.; SAIZ, R.; MORIN, P.A.; SMITH, I.L.; SPECTOR, S.A.; WILLS, C. Numerous length polymorphisms at short tandem repeats in human cytomegalovirus. *Journal of Virology*, v.73, n.8, p.6265-6270, 1999.
- DUKE, G. M.; OSORIO, J.E.; PALMENBERG, A.C. Attenuation of Mengo virus through genetic engineering of the 59 noncoding poly(C) tract. *Nature*, v.343, p.474-476, 1990.
- ENGLUND, S.; BOLSKE, G.; BALLAGI-PORDÁNY, A.; JOHANSSON, K.E. Detection of *Micobacterium avian* subs *paratuberculosis* in tissues samples single, fluorescent and nested PCR based on the IS900 gene. *Veterinary Microbiology*, v.81, n.3, p.257-271, 2001.
- FIELD, D.; WILLS, C. Abundant microsatellite polymorphisms in *S. cerevisiae* and the different distributions of microsatellites in eight prokaryotes and *S. cerevisiae* results from strong mutation pressures and a variety of selection forces. *Proceedings National Academic Science USA*, v.95, n.4, p.1647-1652, 1998.
- FIELD, D.; WILLS, C. Long, polymorphic microsatellites in simple organisms. *Proceedings Biological Science*, v.263, n.1367, p.209–215, 1996.
- FOSTER, P.L.; TRIMARCHI, J.M. Adaptive reversion of a frameshift mutation in *Escherichia coli* by simple base deletions in homopolymeric runs. *Science* v.265, n.5170, p.407-409, 1994.
- GARCIA-BARRENO, B.; DELGADO, T.; MELERO, J.A. Oligo(A) sequences of human respiratory syncytial virus G protein gene: assessment of their genetic stability in frameshift mutants. *Journal of Virology*, v.68, n.9, p.5460–5468, 1994.
- HAHN, H.; PALEMBERG, A.C. Encephalomyocarditis viruses with short poly(C) tracts are more virulent than their mengovirus counterparts. *Journal of Virology*, v.69, n.4, p.2697-2699, 1995.
- HAMMERSCHMIDT, W.; LUDWIG, H.; BUHK, H. Short repeats cause heterogeneity at genomic terminus of bovine herpesvirus 1. *Journal of Virology*, v.58, n.1, p.43-49, 1986.
- LI, Q.; LIANG, J.; LUAN, G.; ZHANG, Y.; WUANG, K. Molecular beacon-based homogeneous fluorescence PCR assay for the diagnosis of infectious diseases. *Analytical Sciences*, v.16, n.1, p.245-248, 2000.

METZLER, A.E.; MATILE, H.; GASSMANN, U.; ENGELS, M.; WYLER, R. European isolates of bovine herpesvirus 1: a comparison of restriction endonuclease sites, polypeptides, and reactivity with monoclonal antibodies. *Archives of Virology*, v.85, n.1-2, p.57-69, 1985.

MEYER, G.; BARE, O.; THIRY, E. Identification and characterization of bovine herpesvirus type 5 glycoprotein H gene and gene products. *Journal of General Virology*, v.80, n.11, p.2849-2859, 1999.

MOXON, E.; RAINEY, P.; NOWAK, M.; LENSKI, R. Adaptive evolution of highly mutable loci in pathogenic bacteria. *Current Biology*, v.4, n.1, p.24-33, 1994.

PERDUE, M.L., GARCIA, M.; SENNE, D.; FRAIRE, M. Virulence-associated sequence duplication at the hemagglutinin cleavage site of avian influenza viruses. *Virus Research*, v.49, n.2, p.173-186, 1997.

ROIZMAN, B.; DESROSIERS, R.C.; FLECKESNSTEIN, B.; LOPEZ, C.; MINSON, A.C.; STUDDERT, M.J. The family Herpesviridae: an update. The Herpesvirus Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Archives of Virology*, v.123, n.3-4, p.425-449, 1992.

ROS, C.; BELÁK, S. Characterization of the glycoprotein B gene from ruminant alphaherpesviruses. *Virus Genes*, v.24, n.7, p.99-105, 2002.

SILVA, N.; ESCARMIS, C.; SOLANA, A.; CASTRO, J. M. Variabilidad genómica entre cepas del herpesvirus bovino tipo 1 aisladas de casos clínicos de IBR. *Investigacion Agraria, produccion y sanidad animales*, v.15, n.1-2, p.59-67, 2000.

TAUTZ, D.; SCHLOTTERER, C. Simple sequences. *Current Opinion in Genetics & Development*, v.4, p.832-837, 1994.

WALKER, A.; PETHERAM, S.J.; BALLARD, L.; MURPH, J.R.; DEMMLER, G.J.; BALLE JR., J.F. Characterization of human Cytomegalovirus Strains by Analysis of Short Tandem Repeat Polymorphisms. *Journal of Clinical Microbiology*, v.39, n.6, p.2219-2226, 2001.

WEBSTER, R.G.; BEAN, W.; GORMAN, O.T.; CHAMBERS, T.M.; KAWAOKA, Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiology Reviews*, v.56, n.1, p.151-179, 1992.

YAMADA, N.; TANIHARA, K.; TAKADA, A.; YORIHUZI, T.; TSITSUMI, M.; SHIMOMURA, H.; TSUJI, T.; DATE, T. Genetic organization and diversity of the 39 noncoding region of the hepatitis C virus genome. *Virology*, v.223, n.6, p.255-261, 1996.

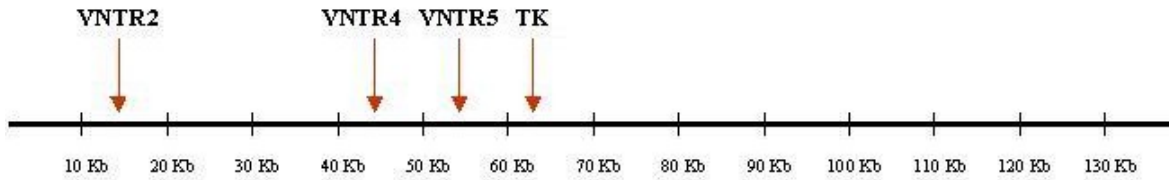


Figura 1: Localização das regiões candidatas VNTR e gene TK utilizados para identificação e caracterização de BHV.

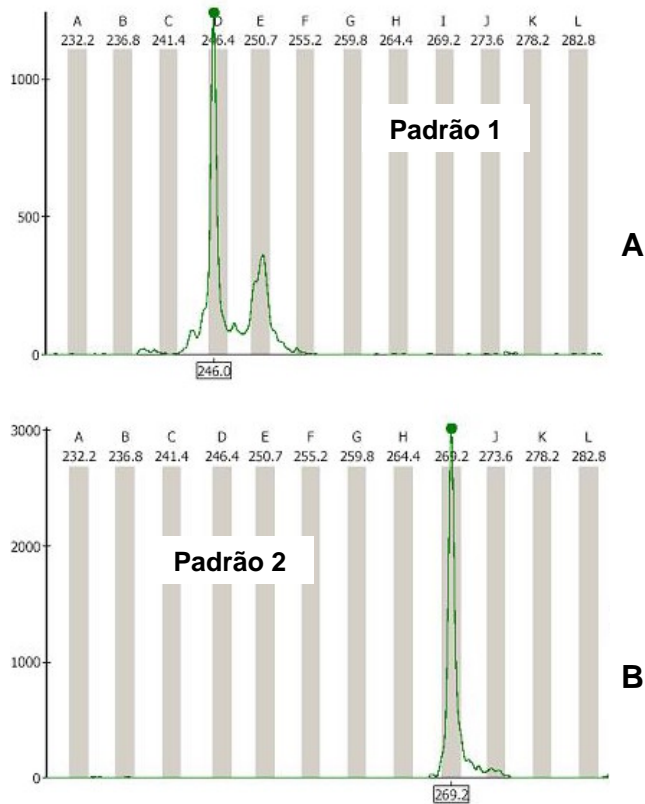


Figura 2: Ilustração dos padrões de pico detectados por eletroforese capilar para os fragmentos de PCR TK. A) Padrão 1 (BHV-5) e B) Padrão 2 (BHV-1).

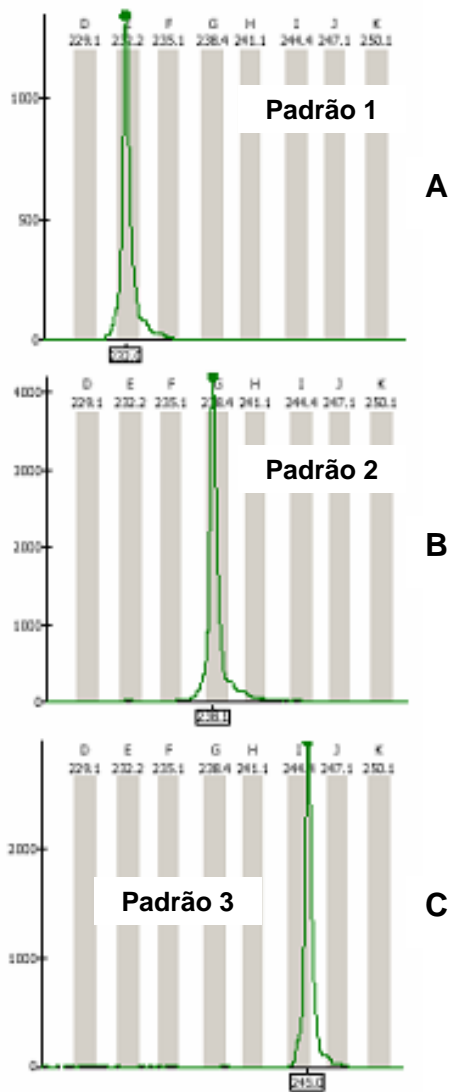


Figura 3: Ilustração dos padrões de pico detectados por eletroforese capilar para os fragmentos de PCR VNTR2. A) Padrão 1; B) Padrão 2 e C) Padrão 3.

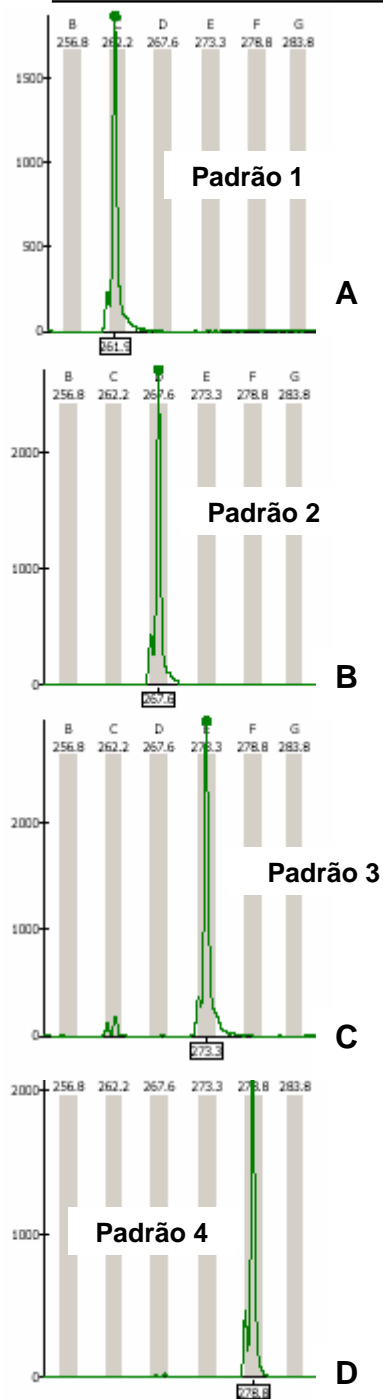


Figura 4: Ilustração dos padrões de pico detectados por eletroforese capilar para os fragmentos de PCR VNTR4. A) Padrão 1; B) Padrão 2; C) Padrão 3 e D) Padrão 4.

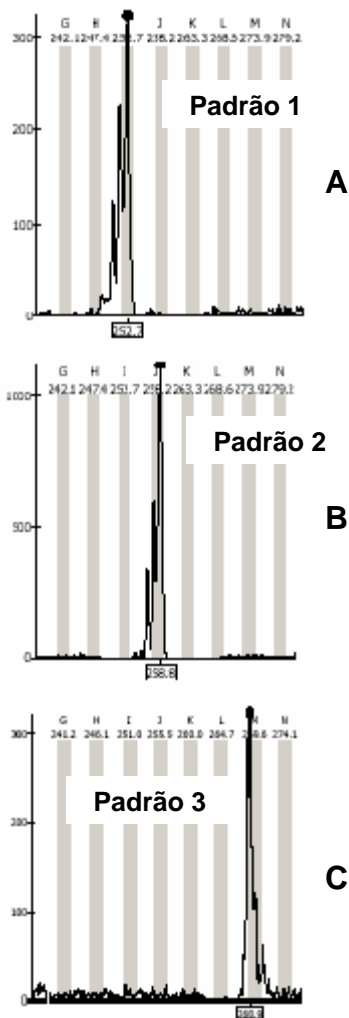


Figura 5: Ilustração dos padrões de pico detectados por eletroforese capilar para os fragmentos de PCR VNTR5. A) Padrão 1; B) Padrão 2 e C) Padrão 3.

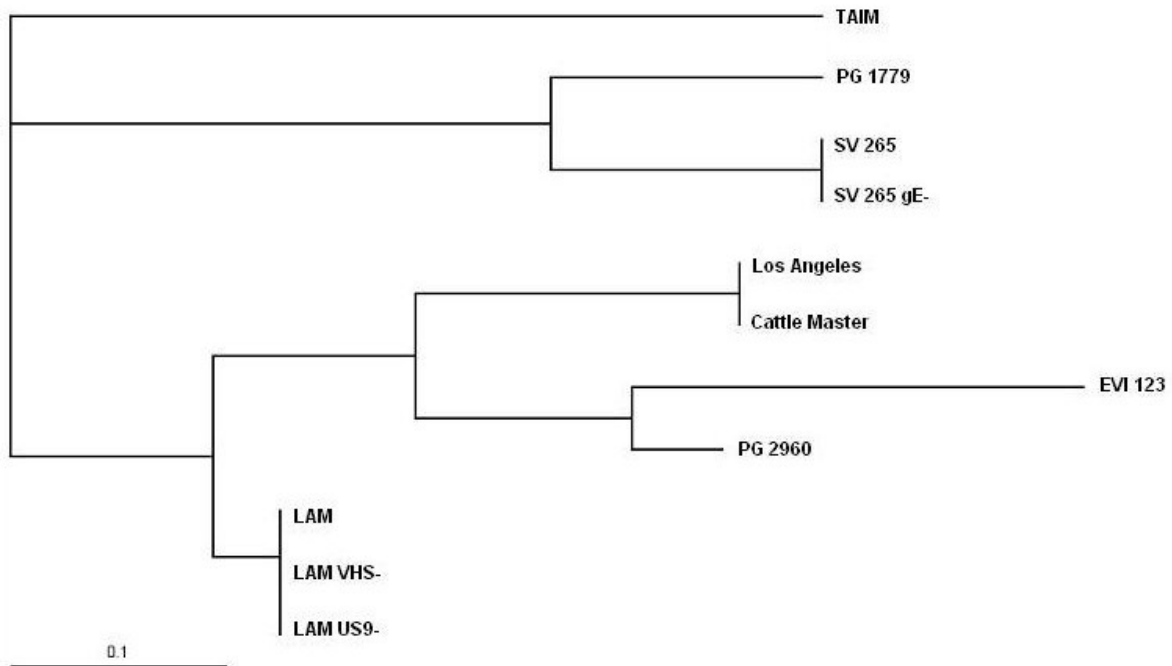


Figura 6: Agrupamento filogenético gerado por análise de regiões VNTR utilizando os programas Populations e TreeView.

Tabela 1: Supostos candidatos VNTR no genoma do BHV-1 gerados por análise *in silico*.

Posição no genoma do BHV-1 (pb)	Tamanho da repetição	Número de cópias estimado
235--437	14	14.5
15662--15692^a	6	5.2
15905--16089	60	3.1
16254--16287	6	5.7
29482--29516	18	1.9
38497--38579	27	3.1
38770--38951	21	8.5
38945--39001	12	4.8
39037--39112 ^b	6	12.7
39037--39112 ^b	18	4.2
39403--39570	27	6.2
39920--40035	12	9.7
44383--44416^a	6	5.7
53894--53928^a	9	3.9
58468--58503	18	2.0
74423--74455	12	2.6
91715--91792	6	13.0
98764--98861 ^b	6	16.3
98756--98857 ^b	12	8.5
101253--101287	6	5.8
102256--102320	18	3.6
103109--103133	6	4.2
103351--103421	3	24.0
105405--105433	3	9.7
105490--105574 ^b	9	9.4
105490--105598 ^b	3	36.3
105851--105887	15	2.5
106013--106039	14	1.9
106993--107031	18	2.2
107060--107134	39	1.9
107388--107495	33	3.3
108971--109160	94	2.0
111362--111412	17	3.0
111808--111863	21	2.7
112072--112370	5	59.8
112486--112611	13	11.2
112478--112611	22	6.1
113845--113879	17	2.1
113877--114109 ^b	9	25.9
113877--114111 ^b	18	13.1
116147--116192 ^b	6	7.7
116144--116192 ^b	12	4.1
116144--116192 ^b	18	2.7
117287--117322	10	3.4
124109--124341 ^b	9	25.9
124107--124341 ^b	18	13.1
124339--124373	17	2.1
125607--125740 ^b	22	6.1
125607--125732 ^b	13	11.2
125848--126146	5	59.8
126355--126410	21	2.7
126792--126847	17	3.3
129058--129247	94	2.0
130723--130830	33	3.3
130807--130884	18	4.5
131084--131158	39	1.9
131187--131225 ^b	18	2.2
132179--132205 ^b	14	1.9

132338--132367	15	2.0
132644--132728 ^b	9	9.4
132620--132728 ^b	3	36.3
132785--132813	3	9.7
134797--134867	3	24.0
135085--135109	6	4.2

^a Regiões candidatas VNTR analisadas neste estudo.

^b Regiões candidatas VNTR mostrando diferentes tamanho de repetição na mesma região.

Tabela 2: Conjunto de oligonucleotídeos para identificação e caracterização de BHV-1/BHV-5. TK1 e TK2: oligonucleotídeos utilizados na primeira etapa de PCR para identificação de BHV-1/BHV-5. TK3 e TK4: oligonucleotídeos utilizados no nested PCR fluorescente para identificação de BHV-1/BHV-5. Conjunto oligonucleotídeos VNTR2, VNTR4 and VNTR5 (F e R) utilizados para análise VNTR.

<i>nome do oligonucleotídeo</i>	POSIÇÃO NO GENOMA	SEQÜÊNCIA DO OLIGONUCLEOTÍDEO
<i>TK1</i>	63403- 63420 pb	5' GTACTGGCGCACGATGTT 3'
TK2	64063- 64081 pb	5' GTAGAGCTCGCGGCACTTG 3'
<i>TK3</i>	63403- 63420 pb	5' GTACTGGCGCACGATGTT 3'
TK4	63701- 63721 pb	HEX- 5' GTAGAGCTCGCGGCACTTG 3'
VNTR2F	15599- 15616 pb	5' GCTGCCCGCAGAGTCTGG 3'
VNTR2R	15836- 15854 pb	HEX- 5' CCCTCGCCTTCGTTTTTCGT 3'
VNTR4F	44276- 44293 pb	5' CTTTGGGTGCGGGCGTGG 3'
VNTR4R	44547- 44566 pb	HEX- 5' TCGTCAGCAGGGGAGGAGGC 3'
VNTR5F	53833- 53854 pb	5' AGCTATGCAGCGTGGGCCAGTA 3'
VNTR5R	54090- 54110 pb	NED- 5' CGCCGACGAGGACATCCAGAA 3'

HEX – 4,7,2,'4',5',7'-hexaclaro-6-carboxyfluorescein

NED - 7'8'-benzo-5'fluoro-2',4,7-trichloro-5- carboxyfluorescein

Tabela 3: Variantes dos VNTR2, VNTR4 e VNTR5 encontradas após análise por eletroforese capilar, composição da seqüência repetitiva esperada, número e tamanho das variantes observadas.

VNTR Loco	Seqüência repetitiva esperada para estirpe de referência BHV-1 número de repetições	Número de variantes observadas (tamanho dos fragmentos de PCR – pb)
VNTR2	(CGGGCT) ⁵	3 (232 ^a / 238 ^b / 245 ^c)
VNTR4	(GCTCTC) ⁵	4 (262 ^a / 268 ^b / 272 ^c / 278 ^d)
VNTR5	(GGCGGCGCT) ⁴	3 (253 ^a / 259 ^b / 273 ^c)

^a Tamanho do fragmento correspondente ao Padrão 1

^b Tamanho do fragmento correspondente ao Padrão 2

^c Tamanho do fragmento correspondente ao Padrão 3

^d Tamanho do fragmento correspondente ao Padrão 4

Tabela 4: Padrões de pico na análise de eletroforese capilar das estirpes de BHV-1 e BHV-5 gerados por PCR TK, VNTR2, VNTR4 e VNTR5.

ESTIRPES	CONJUNTOS DE OLIGONUCLEOTÍDEOS			
	TK	VNTR2	VNTR4	VNTR5
LOS ANGELES ^a	2	2	1	2
CATTLE MASTER ^d	2	2	1	2
LAM ^a	2	1	2	2
LAM US9- ^c	2	1	2	2
LAM VHS- ^c	2	1	2	2
SV 265 ^b	2	1	4	1
SV 265 gE- ^c	2	1	4	1
PG 1779 ^b	2	1	4	3
EVI 123 ^b	2	3	3	2
PG 2960 ^b	2	3	1	2
TAIM ^e	1	1	-	2

^a Estirpe de referência BHV-1, ^b Isolados de campo de BHV-1, ^c Isolados de campo de BHV-1 com deleções gênicas, ^d Vacina comercial de BHV-1, ^e Isolado de campo de BHV-5.

Detection of Bovine Herpesvirus in Peripheral Blood Leukocytes from Slaughtered Cattle by Fluorescent Nested PCR as a Potential Tool for Epidemiological Studies

Sergio M. Aoki^{ab}, Paulo M. Roehle^c, Cárís M. Nunes^a, Luzia H. Q. Silva^a, Anna P. Oliveira^c, José F. Garcia,^{a*}

^a Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal, Universidade Estadual Paulista – UNESP - Araçatuba, SP, Brazil, 16050-680.

^b Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista – UNESP - Botucatu, SP, Brazil, 18618-000.

^c DM/ICBS-UFRGS & CPVDF-FEPAGRO, Estrada do Conde 6000, Eldorado do Sul, RS, Brazil, 92990-000.

*** Corresponding author:**

Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular Animal (LBBMA)

International Atomic Energy Agency (IAEA) Collaborating Centre on Animal Genomics and Bioinformatics

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP

Rua Clóvis Pestana, 793 – Jd. D. Amélia - 16.050-680

Araçatuba, SP, Brazil.

phone: (18) 3636-3200 ext. 3636

Email: jfgarcia@terra.com.br

ABSTRACT

In this study, we report the use of a fluorescent PCR-based method to detect Bovine Herpesvirus type 1 (BHV-1) in peripheral blood leukocytes (PBL) from 100 slaughtered cows without Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR) clinical symptoms, originated from 10 commercial herds in Northwest of São Paulo State and in Mato Grosso do Sul State in Brazil. A sensitive nested PCR (Polymerase Chain Reaction) assay was designed to amplify specific thymidine kinase gene (TK) DNA fragments from BHV-1 and BHV-5 by using internal fluorescent primer and capillary electrophoresis

detection system. ELISA and nested PCR from trigeminal ganglia were performed in order to compare PBL findings. In order to set up ideal test conditions, serial fold dilutions of BHV-1 and BHV5 reference strains were prepared using non-infected bovine whole blood. Nested PCR generated DNA fragments were visualized both in 2% agarosis gel and capillary electrophoresis systems. The incidence of positive leukocytes was of 32% (32/100) to BHV-1. No BHV-5 infected PBL samples were observed although confirmation on trigeminal ganglia has pointed out to some samples infected with this virus. Confirmation of the PCR result was performed by direct DNA sequencing. Our findings revealed the presence of BHV-1 in PBL suggesting the latency of infected cattle in herds. The viability of fluorescent nested PCR assay to be used for the diagnosis of BHV-1 and to differentiate of BHV-1 and 5 was accessed as potential tool for epidemiological surveys.

Key words: BHV-1, BHV-5, bovine, nested PCR, capillary electrophoresis.

INTRODUCTION

Bovine herpesvirus 1 and 5 (BHV-1 and BHV-5) are members of the *Herpesviridae* family, sub-family *Alphaherpesvirinae*, and cause significant economic losses to beef and dairy cattle around the world (FAUQUET *et al.*, 2004). BHV-1 can cause abortion, fetal losses, systemic infections in newborns (BARR & ANDERSON, 1993; KIRKBRIDE, 1985), infectious bovine rhinotracheitis (IBR), infectious pustular vulvovaginitis/balanoposthitis (IPV/IPB) and conjunctivitis (ROIZMAN *et al.*, 1992). BHV-5 is a neurovirulent bovine herpesvirus, causing bovine non-suppurative meningoencephalitis that affects cattle of all ages, particularly young calves. BHV-1 and BHV-5 are both neurotropic viruses and have the ability to replicate in nervous system

and establish latency in sensory ganglia (ROCK *et al.*, 1993), however neuropathogenic potential seems to be restricted to BHV-5 ([BELKNAP *et al.*, 1994](#)). Other major ruminant herpesviruses related to BHV-1 and BHV-5 are Buffalo Herpesvirus 1 (BuHV-1), Cervine Herpesvirus 1 (CeHV-1), Caprine Herpesvirus 1 (CaHV-1) and Rangiferine Herpesvirus 1 (RanHV-1) (ROS & BELÁK, 2002).

BHV-1 and BHV-5 have close to 85% of DNA homology between their genomes and several of their antigens can cause serological cross-reactions when using polyclonal and monoclonal antibodies in serological test (CHOWDHURY, 1995; ROEHE *et al.*, 1997). These biological characteristics can difficult proper virus differentiation in clinical samples using traditional assays like virus-neutralization, direct immunofluorescence or immunoperoxidase (GIAVEDONI *et al.*, 1988). Distinction can be obtained using monoclonal antibodies reactive to specific BHV-1 or BHV-5 epitopes (ROEHE *et al.*, 1997; SOUZA *et al.*, 2002), restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of viral DNA (D'ARCE *et al.*, 2002) and specific PCR using conserved or specific primers (CLAUS *et al.*, 2005; GOMES *et al.*, 2002).

PCR-based methods have acquired great importance in diagnosis area due its rapidity and high sensitive detection of viral DNA in clinical samples. Several formats of PCR assays have been described for identification of BHV-1 and BHV-5 with different sensitivity levels (ASHBAUGH *et al.*, 1997; FUCHS *et al.*, 1999, MOORE *et al.*, 2000). The possibility of BHV-1 and BHV-5 detection by PCR from different specimens, like nasal swabs and mucosa (DE GEE *et al.*, 1996; SANTURDE *et al.* 1996; VAN ENGELENBURG *et al.*, 1995b), lungs, tracheae, lymph nodes, tonsils (SANTURDE *et al.* 1996, VAN ENGELENBURG *et al.*, 1995b), sacral ganglia (VOGEL *et al.*, 2004), trigeminal ganglia (WINKLER *et al.*, 2002), central nervous system tissues (GOMES *et*

al., 2002; HÜBNER *et al.*, 2005) and bovine semen (SANTURDE *et al.*, 1996; MASRI *et al.*, 1996; VAN ENGELENBURG *et al.*, 1995b; WAGTER *et al.*, 1996; KATARIA *et al.*, 1997; SMITS *et al.*, 2000; GOMES *et al.*, 2003) have been reported. However not all sources of field samples are useful for routine diagnosis using PCR assays due to: 1) virus location on sites accessible only *post mortem* and 2) dependency on virus infection phase. For instance, detection of BHV-1 in nasal swabs requires virus excretion, which is limited to 1 to 2 weeks during productive phase of virus infection (FUCHS *et al.*, 1999). One of the primary choices for sampling in order to PCR detect BHV-1 would be the peripheral blood leukocyte (PBL) which was firstly reported in 1999 (FUCHS *et al.*, 1999). This principle was demonstrated by using blood from naturally infected cattle with serological confirmation of BHV-1 infection or from animals where disease was demonstrated by clinical symptoms or serological indication of previous virus infection.

The present study describes the survey of BHV-1 in peripheral blood leukocyte (PBL) from 100 slaughtered cows without clinical symptoms of IBR using serological ELISA and PCR based test. To this end, a new sensitive nested PCR assay based on thymidine kinase gene (TK) was standardized in order to generate a 301 bp or a 273 bp DNA fragment from BHV-1 and BHV-5, respectively. By means of fluorescent labeled primer, PCR products were analyzed in capillary electrophoresis system and compared with 2% agarose gel electrophoresis, in order to evaluate the discriminatory capacity of both methods for those two viruses. ELISA and nested PCR from trigeminal ganglia were performed in order to allow inferences on the effectiveness of the fluorescent nested PCR designed herein to access BHV DNA existence in peripheral blood leukocyte (PBL). All positive samples from leukocytes and trigeminal ganglia were submitted to DNA sequencing to confirm virus presence.

MATERIAL AND METHODS

Virus strains

Reference strains of BHV-1 (Los Angeles - LA) and BHV-5 (N569) were assigned by the Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor-IPVDF- Eldorado do Sul-RS- Brazil, in Madin-Darby Bovine Kidney (MDBK) cell suspension with 10^3 TCID₅₀/ml.

Serial dilutions in blood

Tittered MDBK cell suspensions were used to prepare serial dilutions in blood. Ten fold serial dilutions were performed using bovine whole blood from a BHV-1 and BHV-5 uninfected animal (from Universidade Estadual Paulista – UNESP – Campus Araçatuba experimental herd), previously serologically monitored (HerdChek® Infectious Bovine Rhinotracheitis Antibody Test Kit - IBR ELISA Screen/Verification - IDEXX Laboratories Inc.). Dilution points have included concentrations ranging from 10^2 TCID₅₀/ml to 10^{-6} TCID₅₀/ml of BHV-1 and BHV-5 in two separated sets of samples. DNA extraction of the diluted samples (blood + infected cell suspension) was performed using QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen, Helden, Germany) following manufacturer's instructions. In order to produce reference samples with sufficient virus DNA to be used as PCR positive controls, infected MDBK cell suspensions (10^3 TCID₅₀/ml) were submitted to DNA purification using the same protocol.

Blood and trigeminal ganglia

Blood specimens were collected from 100 cows along the slaughter line (Frigorífico Bertin – SP – Brazil). Blood was collected in 10 ml tube containing 1 ml of sodium citrate / citric acid solution (18,4 mg/ml and 4,0 mg/ml respectively). In addition

to blood collection, trigeminal ganglia were individually collected by dissection of the head, stored in plastic bags and maintained in 4°C until arriving to the laboratory. Due to the rigorous tracking system performed by the meat industry, blood and ganglia were assigned to the same animal. Samples were collected in groups of 10 individuals originated from the same farm. After each session of biological material collection, the farmer was contacted to answer a questionnaire regarding to information about BHV-1 vaccination history, size of total herd, management procedures, farm location, among other epidemiologic information. All 100 animals were told to be non-vaccinated by their owners. After arrival to the laboratory, tubes containing blood were centrifuged at 4.000 x g/ 10 min and approximately 400 µL of Buffy coat and 1000 µL of plasma were removed, transferred to a clean tube, and kept at -20°C until DNA extraction or dilution for ELISA test. Trigeminal ganglia were stored at -80°C until DNA preparation.

DNA extraction from leukocytes and trigeminal ganglia

Tubes containing 400 µL leukocyte Buffy coat were thawed and remaining erythrocytes debris and hemoglobin were eliminated by washing with 700 µL of sodium citrate (SSC) buffer (SAMBROOK et al., 1989) and centrifugation at 14.000 x g / 1 min. Supernatant was discarded by inversion. Washing was performed twice in total. Each tube containing washed leukocytes was submitted to lyses with a solution constituted of: 375 µL sodium acetate (0,2M), 50 µL sodium dodecyl sulfate SDS (10%) and 5 µL Proteinase K (20,0 µg/µL), overnight until complete pellet dissolution. In order to perform DNA isolation from the resulting solution, 400 µL phenol / chloroform / isoamyl alcohol solution (25:24:1) was added, tubes mixed by vortexing and centrifuged at 14.000 x g / 2

min. Supernatant was carefully placed in a fresh 1,5 ml polypropylene tube. DNA precipitation was done by adding 1,0 ml of isopropanol (kept previously at -20°C) followed by centrifugation at 14.000 x g / 2 min. After removal of supernatant, 1,0 ml of 70% ethanol was added over the pellet and centrifugation at 14.000 x g / 2 min was performed. DNA pellet was re-suspended in 200 µL Tris-EDTA (TE) buffer pH 8,0 followed by incubation at 56 °C for 1 hour. Twenty-five milligrams of dissected trigeminal ganglia was submitted to DNA extraction using QIAamp[®] DNA Mini Kit (Qiagen, Helden, Germany) following manufacturer's instructions. DNA was eluted with 200 µL elution buffer provided with the kit.

Bovine DNA amplification

In order to check quality of DNA samples (in regard to the presence of inhibitors and DNA integrity), all DNA samples (leukocytes and trigeminal ganglia) were submitted to a PCR assay targeting the bovine luteinizing hormone receptor (bLHR) (Genbank accession n. AF491303). PCR was performed in a final volume of 25 µL containing 5,0 µL DNA solution, 15 pmol of each primer (LH6- 5' TTATTCTGCCATCTTTGCTGAGA 3' and LH11- 5' CCTCCGAGCATGACTGGAATGGC 3'), 2,5 µM of each dNTP, 2,5 µL *Taq* polymerase reaction buffer 10 times concentrated (100 mM Tris-HCl, pH 9.0, 500 mM KCl), 2,0 mM MgCl₂, 1,0 unit Platinum *Taq* polymerase (Invitrogen - USA) and volume completed with ultra pure water (Invitrogen - USA). Cycling conditions were defined in a PTC - 100 thermocycler (MJ-Research[®], Waltham, Massachusetts, USA), by setting 10 minutes of initial denaturation at 94°C, followed by 35 cycles of 94°C/60 seconds, 60°C/30 seconds and 72°C/120 seconds, with final extension at 72°C for 10 minutes.

PCR products were visualized in 2% agarosis gel electrophoresis ethidium bromide stained (Figure 2).

Fluorescent BHV thymidine kinase nested PCR

Bovine leukocytes and trigeminal ganglia DNA samples were submitted to a fluorescent nested PCR assay designed to generate a 301 bp (BHV-1) and 273 bp (BHV-5) fragment of gene (TK) (Genbank accession n. D00438 – BHV-1 and S56149 – BHV-5) (Figure 1). First round of PCR amplification was performed in final volume of 50 μ L containing 20 μ L DNA solution, 5,0 μ L DMSO, 20 pmol of each primer (TK1 5' GTACTGGCGCACGATGTT 3' and TK2 5' GTAGAGCTCGCGGCACTTG 3'), 2,5 μ M of each dNTP, 5,0 μ L *Taq* polymerase reaction buffer 10 times concentrated (100 mM Tris-HCl, pH 9.0, 500 mM KCl), 2,5 mM MgCl₂, 1,0 unit Platinum *Taq* polymerase (Invitrogen- USA) and volume completed with ultra pure water (Invitrogen - USA). Cycling conditions were defined in a PTC - 100 thermocycler (MJ-Research[®], Waltham, Massachusetts, USA) by setting 10 minutes of initial denaturation at 94°C, followed by 35 cycles where the first 10 started at 94°C/50 seconds, 70°C/90 seconds and 72°C/60 seconds, decreasing 1°C of annealing temperature each cycle. Remaining 25 cycles were performed at 94°C/50 seconds, 60°C/90 seconds and 72°C/60 seconds with final extension of 72°C for 10 minutes. Second PCR round was performed immediately after completion of the first round using 2 μ l of PCR product from the first reaction. The same reagent concentrations were used for second round only altering the primer pair (TK3 5' TGGTACGGACGCCTTAAGTGG 3' and TK4 5' GTTGATCTCGCGGAGGCAGTA 3', this late labeled with fluorochrome hexachloro-6-carboxyfluorescein - HEX on 5' end).

Cycling conditions were defined in a PTC- 100 thermocycler (MJ-Research[®], Waltham, Massachusetts, USA) by setting 10 minutes of initial denaturation at 94°C, followed by 35 cycles where the first 10 started at 94°C/50 seconds, 70°C/90 seconds e 72°C/60 seconds, decreasing 0,5 °C of annealing temperature each cycle. Remaining 25 cycles were performed at 94°C/50 seconds, 65°C/90 seconds and 72°C/60 seconds with final extension of 72°C for 10 minutes. PCR products were visualized by 2% agarosis gel electrophoresis ethidium bromide stained and by capillary electrophoresis (MegaBace 1000 GE- Healthcare- UK Limited). Fluorescent peaks shape and intensity were monitored with software Fragment Profiler (GE- Healthcare- UK Limited) and internal size standard ET-400R (GE- Healthcare- UK Limited) was used to assign fragment sizes.

ELISA

All 100 individuals were screened for anti-BHV-1 antibodies by serological test using HerdChek[®] Infectious Bovine Rhinotracheitis Antibody Test Kit - IBR ELISA Screen/Verification (IDEXX Laboratories Inc.), following manufacturer's instructions. The absorbance was measured in a Tecan Sunrise ELISA Reader[®] (Tecan Trading AG, Switzerland) and data analysis performed with XCheck 3.3 software (IDEXX Laboratories Inc.).

DNA Sequencing

Thymidine kinase gene (TK) PCR fragments from all positive samples (leukocytes and trigeminal ganglia) were submitted to direct sequencing using Dyanamic ET[®] and MegaBace 1000 systems (GE- Healthcare- UK Limited) following manufacturer

instructions. Sequence quality verification and multiple alignments were performed with Phred/Phrap and BioEdit[®] softwares respectively. In order to confirm the positive results both in terms of virus detection and strain differentiation, all generated DNA sequences were compared with GeneBank using BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

RESULTS

Determination of detection threshold for BHV-1 and BHV-5 by using nested PCR in serial dilutions

Efficiency and effectiveness of nested PCR assay were evaluated in serial 10 fold dilutions of BHV-1 and BHV-5 reference strains in bovine whole blood. Detection threshold were of 10^{-2} TCID₅₀/ml (BHV-1) and 10^1 TCID₅₀/ml (BHV-5) in 2% agarosis gel electrophoresis (Figure 3). DNAs from the lower virus detectable dilutions were used as positive controls in subsequent assays and for the standardization of fluorescent capillary electrophoresis nested PCR applied to leukocytes and trigeminal ganglia collected from slaughtered animals.

Demonstration of feasibility of BHV-1 and –5 capillary electrophoresis detection method

In order to evaluate the feasibility of analysis using peak shape and fluorescence intensity generated by capillary electrophoresis to detect BHV in blood samples, aliquots of nested PCR products originated from reference BHV-1 and BHV-5 strains were submitted in parallel to 2% agarosis gel electrophoresis ethidium bromide stained and to capillary electrophoresis. In opposition to the difficulty of discrimination of BHV-1 (301 bp) and BHV-5 (273 bp) DNA fragments discrimination on agarosis electrophoresis

systems, the use of primer labeling coupled with automated capillary electrophoresis has provided a clear differentiation between BHV-1 and BHV-5 specific DNA fragments (Figure 4).

Serological and nested PCR detection of BHV from slaughtered cows

Detection of antibodies against BHV-1 using ELISA screening was positive in 68 of 100 samples (Table 1). Positive samples were confirmed using the verification plate provided with HerdChek[®] Infectious Bovine Rhinotracheitis Antibody Test Kit - IBR ELISA Screen/Verification.

All collected leukocytes and trigeminal ganglia samples were submitted to BHV-1 and 5 nested PCR detection in both 2% agarosis gel electrophoresis and automated capillary electrophoresis (Figure 5). Joining all PCR positive signals from leukocytes and trigeminal ganglia, viral DNA detection has occurred 88 times (32 times in leukocytes and 56 in trigeminal ganglia) (Table 1). From the 10 different herds analyzed in this study, it was possible to detect BHV-1 from 1 to 10 individuals per property, either by ELISA or nested fluorescent PCR from trigeminal ganglia (TKT). BHV-1 positives by nested PCR fluorescent from blood leukocytes (TKL) have occurred in 8 cattle herds. It was also possible to detect BHV-5 by TKT in 5 herds (Table 2). All positive leucocytes samples displayed the same BHV-1 capillary electrophoresis pattern (Figure 4), which was confirmed by direct DNA sequencing. From 56 positive trigeminal ganglia samples, 43 were compatible only with BHV-1 pattern in capillary electrophoresis while 12 with BHV-5 pattern. One trigeminal ganglia sample showed both peaks, however only BHV-1 could be confirmed by sequencing (Table 1).

DISCUSSION

In the present study, we describe a simple method for bovine herpesvirus detection in leukocytes using fluorescent nested PCR, designed to amplify a 301 bp and/or a 273 bp (BHV-1 or BHV-5 respectively) from TK gene based on differences existing in the selected region between BHV-1 and BHV-5 genomes (Figure 1). The concept of this test design was to provide a fast and inexpensive tool for epidemiological surveys. Positive nested PCR signals up to thresholds of 10^{-2} TCID₅₀/ml and 10^1 TCID₅₀/ml, for BHV-1 and BHV-5 respectively, have indicated the potential of this diagnostic test for large BHV screenings. The use of a bovine specific PCR test in DNA from field samples (leukocytes and trigeminal ganglia from slaughtered animals) has shown the efficiency of DNA purification used herein, indicating the production of a DNA solution free of PCR contaminants that could potentially inhibit further enzymatic reactions (Figure 2). The efficiency of BHV detection has varied between types 1 and 5 (10^{-2} TCID₅₀/ml and 10^1 TCID₅₀/ml respectively). Although reference samples have been used, test sensitivity differences found between both types in the serial dilutions could be attributed to a 4 base sequence (TGGT) located in the 5' extremity of TK3 primer (Figure 1), not present in BHV-5 genome, that could cause inefficient primer annealing when its DNA is targeted (Figure 3A and 3B).

Aiming to improve discrimination between BHV-1 and BHV-5 PCR products, we used automated capillary electrophoresis system for their detection. TK4 primer labeled with hexachloro-6-carboxyfluorescein (HEX) was used in the second round of amplification for LA and N569 reference strains, which allowed clear observation of two different peak patterns (270 bp for BHV-1 and 245 bp for BHV-5). Capillary electrophoresis analysis has ratified 2% agarosis gel electrophoresis pattern (Figure 4).

It was observed a shift on DNA migration when comparing agarosis and capillary electrophoresis which could be explained by the non-linear relation between fragment size and migration when agarosis and capillary electrophoresis systems are compared (MC CORD et al., 1993; KOUMI et al., 2004). Automated capillary electrophoresis systems, although having higher operational costs and sophistication, permit higher throughput of samples, allowing the semi-automation of diagnostic procedures. Capillary electrophoresis based approaches have been used with successful to detect other infectious agents (ENGLUND et al., 2001; LI et al., 2000) indicating the potential for application of this tool in molecular diagnosis area.

Detection of BHV-1 and 5 using fluorescent nested PCR in leukocytes (TKL) was performed in parallel with fluorescent nested PCR from trigeminal ganglia (TKT) and serological ELISA test. ELISA has indicated 68 positive animals distributed among of the 10 herds analyzed, however only 18 samples were confirmed by TKL nested PCR and 38 by TKT nested PCR (Table 1). Serological tests, like the indirect ELISA used herein, rely on the detection of antibodies produced after infection or during circulating subsequent years post-infection, even after the disappearing of clinical signs (BABIUK et al., 1996). Based on these premises, serologically positive animals can be negative by PCR in the event of BHV be present in amounts below the detection threshold of the method (FUCHS et al., 1999). Once trigeminal ganglia is assigned as a classical latency site for BHV group viruses (PIDONE et al., 1999; SCHUDEL et al., 1987; NARITA et al., 1983), higher numbers of virus copies per cell in trigeminal ganglia area are expected when compared with those in leukocytes from peripheral blood. This site was co-investigated using nested PCR test and higher number of positive animals by nested PCR from TKT (56) was observed when compared to TKL results (32). This finding was

compatible with the specific characteristics of the virus latency mechanism. From the analysis of ELISA negative animals, which were found to be positive in TKL or TKT nested PCR (23 animals), a possible interpretation could be based on the existence of low antibody response in latent animals (HAGE *et al.*, 1998). In addition to it, stress caused by environment changes (feed and water suppression and transport from farm to slaughterhouse) would be important factors in viral reactivation helping to explain these results (THIRY *et al.*, 1987).

Recent studies have reported the use of PCR assays aiming to differentiate BHV-1 from BHV-5. Alegre *et al.* (2001) have targeted thymidine kinase gene for BHV-1 and glycoprotein D for BHV-5 in a multiplex PCR system. The main difference between the previously published report and the technique described herein is that the target gene used in this study is the same for the BHV-1 and BHV-5 (thymidine kinase), exploiting DNA sequence differences between the two types. CLAUS *et al.* (2005) described a multiplex PCR test exploring glycoprotein C gene sequence differences where they demonstrate the feasibility of detection and differentiation in 2% agarosis gel electrophoresis up to 5 and 50 TCID₅₀ for BHV-1 and BHV-5 respectively. These recent reports have demonstrated rapidity of these detection and differentiation methods for BHV-1 and BHV-5 from clinical samples originated from animals with clinical symptoms of genital, abortive or encephalitic infectious forms. Regarding to BHV-1 DNA detection in whole blood, considering the potential to use PCR based methods for epidemiological studies, the first description comes from Fuchs *et al.* (1999). These authors have described a set of PCR assays designed to detect BHV-1 in whole blood derived from animals with clinical symptoms, positive serological results and/or with IBR history. From our knowledge, no other studies involving detection of BHV from naturally infected herds

using whole blood DNA as major source for PCR target were published, however detection in blood and other non-neural tissues from experimentally infected cattle was previously described by Mweene et al. (1996). In the present study we describe a simple method to detect DNA from BHV-1 in bovine peripheral blood leukocyte DNA from animals without clinical symptoms, sampled randomly in a slaughterhouse, in a single nested PCR test.

Peripheral blood leukocyte has the advantage to constitute a tissue of easy and rapid access, allowing the sampling of large number of live animals. In this context, due to the difficulty of PCR fragment differentiation in 2% agarosis gel electrophoresis (which is based on the 23 bp average difference between BHV-1 and BHV-5 specific DNA sequence), detection using automated capillary electrophoresis showed to have enough specificity to differentiate distinct PCR fragments (Figure 4). Moreover, the use of capillary electrophoresis has permitted differentiation of BHV type 1 and 5 in trigeminal ganglion, opening a clear possibility for the use the combined serological and genetic approaches for epidemiological studies.

Additional experiments with larger number of field samples are needed to certify the appropriateness of using the proposed fluorescent nested PCR in peripheral blood leukocytes in epidemiological surveys.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was financially supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (processes n. 02/08369-9 and 02/08470-1). Thanks to Frigorífico Bertin Ltda. - SP - Brazil for the slaughterhouse samples and to Érica Ribeiro for the precise technical support on DNA sequencing.

REFERENCES

- ALEGRE, M.; NANNI, M.; FONDEVILA, N. Development of a Multiplex Polymerase Chain Reaction for the Differentiation of Bovine Herpesvirus 1 and 5. *Journal of Veterinary Medicine Series B* V.48, v.8, p.613-621, 2001.
- ASHBAUGH, S.E.; THOMPSON, K.E.; BELKNAP, E.B.; SCHULTHEISS, P.C.; CHOWDHURY, S.; COLLINS, J.K. Specific detection of shedding and latency of bovine herpesvirus 1 and 5 using a nested polymerase chain reaction. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.9, n.4, p.387-394, 1997.
- BABIUK, L.A.; VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S.; TIKOO, S.K. Immunology of bovine herpesvirus 1 infection. *Veterinary Microbiology*, v.53, n.1-2, p.31-42, 1996.
- BARR, M.C.; ANDERSON, M.L. Infectious diseases causing bovine abortion and fetal loss. *The Veterinary Clinics of North American- Food and Animal Practice*, v.9, n.2, p. 343-368, 1993.
- BELKNAP, E.B.; COLLINS, J.K.; AYERS, V.K.; SCHULTHEISS, P.C. Experimental infection of neonatal calves with neurovirulent bovine herpesvirus type 1.3. *Veterinary Pathology*, v.31, n.3, p.358-365, 1994.
- CHOWDHURY, S.I. Molecular basis of antigenic variation between the glycoproteins C of respiratory bovine herpesvirus 1 (BHV-1) and neurovirulent BHV-5. *Virology*, v.213, n.2, p.558-568, 1995.
- CLAUS, M.P.; ALFIERI, A.F.; FOLGUERAS-FLATSCHART, A.V.; WOSIACKI, S.R.; MÉDICI K.C.; ALFIERI, A.A. Rapid detection and differentiation of bovine herpesvirus 1 and 5 glycoprotein C gene in clinical specimens by multiplex-PCR. *Journal of Virological Methods*, v.128, n.1-2, p.183-188, 2005.
- D'ARCE, R.C.F.; ALMEIDA, R.S.; SILVA, T.C.; FRANCO, A.C.; SPILKI, F.; ROEHE, P.M.; ARNS, C.W. Restriction endonuclease and monoclonal antibody analysis of Brazilian isolates of bovine Herpesvirus types 1 and 5. *Veterinary Microbiology*, v.88, n.4, p.315-324, 2002.
- DE GEE, A. L. W., L. H. A. WAGTER, AND J. J. HAGE. 1996. The use of polymerase chain reaction assay for the detection of bovine herpesvirus 1 in semen during a natural outbreak of infectious bovine rhinotracheitis. *Veterinary Microbiology*, v.53, n.1-2, p.163-168, 1996.
- ENGLUND, S.; BOLSKE, G.; BALLAGI-PORDÁNY, A.; JOHANSSON, K.E. Detection of *Micobacterium avian* subs *paratuberculosis* in tissues samples single, fluorescent and nested PCR based on the IS900 gene. *Veterinary Microbiology*, v.81, n.3, p.257-271, 2001.

FAUQUET, C.M.; MAYO, M.A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L.A. Virus Taxonomy. The Eighth Report. Academic Press, San Diego, p. 1162, 2004.

FUCHS, M., HÜBERT, P., DETTERER, J., RZHIHA, H. Detection of bovine herpesvirus type 1 in blood from naturally infected cattle by using a sensitive PCR that discriminates between wild-type virus and virus lacking glycoprotein E. *Journal of Clinical Microbiology*, v.37, n.8, p.2498-2507, 1999.

GIAVEDONI, L.D.; RUIZ, M.; FIJTMAN, N.; SCHUDEL, A.A.; RODRIGUEZ, M. Rapid diagnosis of bovine herpesvirus encephalitis: comparison of nucleic acid hybridization and immunoperoxidase methods using clinical samples. *Journal of Virological Methods*, 35: 280-285, 1988.

GOMES, L.I.; ROCHA, M.A.; COSTA, E.A.; LOBATO, Z.I.P.; MENDES, L.C.N.; BORGES, A.S.; LEITE, R.C.; BARBOSA-STANCIOLI, E.F. Detection of bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) in cattle in Southeast Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.54, n.2, p.217-220, 2002.

GOMES, L.I.; ROCHA, M.A.; SOUZA, J.G.; COSTA, E.A.; Bovine herpesvirus 5 in bull semen: amplification and sequence analysis of the US4 gene. *Veterinary Research Communications*, v.27, n.6, p.495- 504, 2003.

HAGE, J.J.; GLAS, R.D.; WESTRA, H.H., MARIS-VELDHUIS, M.A., VAN OIRSHOT, J.T, RIJSEWIJK, F.A. Reactivation of latent bovine Herpesvirus 1 in cattle seronegative to gB and gE. *Veterinary Microbiology*, p.60, n.2-4, p.87-98, 1998.

HUBNER S.O; OLIVEIRA A.P.; FRANCO A.C.; ESTEVES P.A.; SILVA A.D.; SPILKI F.R.; RIJSEWIJK F.A.; ROEHE PM. Experimental infection of calves with a gI, gE, US9 negative bovine herpesvirus type 5. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, v.28, n.3, p.187-96, 2005.

KATARIA, R. S., TIWARI, A. K., GUPTA, P. K., MEHROTA, M. L., RAI, A., BANDYOPADHYAY, S. K. Detection of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) genomic sequences in bovine semen inoculated with BHV-1 by polymerase chain reaction. *Acta Virologica*, v.41, n.6, p.311-315, 1997.

KIRKBRIDE, C.A. Managing an outbreak of livestock abortion. 2- Diagnosis and control of bovine abortion. *Vet. Med.*, v.80, p.70-79, 1985.

LI, Q.; LIANG, J.; LUAN, G., ZAHNG, Y.; WUANG, K. Molecular beacon-based homogeneous fluorescence PCR assay for the diagnosis of infectious diseases. *Analytical Sciences*, v.16, n.1, p.245-248, 2000.

MASRI, S. A., OLSON, W., NGUYEN, P. T., PRINS, S., DEREGI, D. Rapid detection of bovine herpesvirus 1 in the semen of infected bulls by nested polymerase chain reaction assay. *Canadian Journal of Veterinary Research*, v.60, n.2, p.1000-1007, 1996.

MCCORD, B.R.; JUNG, J.M.; HOLLERAN, E.A. High resolution capillary electrophoresis of forensic DNA using a non gel sieving buffer. *Journal of Liquid Chromatography*. v.16, p.1963-1981, 1993.

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

MWEENE, A.S.; OKASAKI, K.; KIDA, H. Detection of viral genome in non-neural tissues of cattle experimentally infected with bovine herpesvirus 1. *Japanese Journal of Veterinary Research*, v.44, n.3, p.165-74, 1996.

NARITA, M.; INUI, S.; NANBA, K.; SHINIZU, Y. Detection of Virus Particles in Trigeminal Ganglion cells in a Calf Recurrently Infected with Infectious Bovine Rhinotracheitis. *Japanese Journal of Veterinary Sciences*, v.45, n.5, p.691-693, 1983.

NATHANKARNKITKOOL, S.; OEFNER, P.J.; BARTISCH, G.; CHIN, M.A.; BONN, G.K. High-resolution capillary electrophoretic analysis of DNA in free solution. *Electrophoresis*, v.13, p.18-31, 1992.

PIDONE, H.; GALOSI, C.; ETCHEVERRIGARAY, M. Herpes bovinos 1 y 5. *Analecta Argentina*, v.19, 40-50, 1999.

ROCK, D.L.. The molecular bases of latent infections by alphaherpesviruses. *Seminars in Virology*, 4: 157-165, 1993.

ROEHE, P.M.; SILVA, T.C.; NARDI, N.B.; OLIVEIRA, L.G.; ROSA, J.C.A. Diferenciação entre os vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (BHV-1) e vírus da encefalite bovina (BHV-5) com anticorpos monoclonais. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.17, n.1, 41-44, 1997.

ROIZMAN, B.; DESROSIERS, R.C.; FLECKESNSTEIN, B.; LOPEZ, C.; MINSON, A.C.; STUDDERT, M.J. The family Herpesviridae: an update. The Herpesvirus Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Archives of Virology*, v.123, n.3-4, p.425-449, 1992.

ROS, C.; BELÁK, S. Characterization of the glycoprotein B gene from ruminant alphaherpesviruses. *Virus Genes*, v.24, n.2, p.99-105, 2002.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, 2 Ed. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, 1989.

SANTURDE, G., DA SILVA, N., VILLARES, R., TABARÉS, E., SOLANA, A., BAUTISTA, J. M., CASTRO, J. M. Rapid and high sensitivity test for direct detection of bovine herpesvirus-1 genome in clinical samples. *Veterinary Microbiology*, v.49, n.1-2, p.81-92, 1996.

SCHUDEL, A.A.; RODRÍGUEZ, M.; CARRILLO, B.J. Biotecnología en el diagnóstico, caracterización y prevención de la encefalitis bovina a BHV-1. *Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias y Agronómicas– Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria*, 1987.

SMITS, C. B., VAN MAANEN, C., GLAS, R. D., DE GEE, A. L. W., DIJKSTRAB, T, VAN OIRSCHOT, J. T., RIJSEWIJK, F. A. M. Comparison of three polymerase chain reaction methods for routine detection of bovine herpesvirus 1 DNA in fresh bull semen. *Journal of Virological Methods*, v.85, n.1-2, p.65- 73, 2000.

SOUZA, V.F.; MELO, S.V.; ESTEVES, P.A.; SCHMIDT, C.S.; GONÇALVES, D.A.; SCHAEFER, R.; SILVA, T.C.; ALMEIDA, R.S.; VICENTIN, F.; FRANCO, A.C.; OLIVEIRA, E.A.; SPILKI, F.R.; WEIBLEN, R.; FLORES, E.F.; LEMOS, R.A.; ALFIERI, A.A.; PITUCO, E.M.; ROEHE, P.M. Caracterização de herpesvírus bovinos tipos 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5) com anticorpos monoclonais. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.22, n.1, p.13-18, 2002.

THIRTY, E.; SALICI, J.T.; BUBLLOT, M.; PASTORET, P.P. Reactivation of infectious bovine rhinotracheitis virus by transport. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, v.10, n.1, p.59-63, 1987.

VAN ENGELENBURG, F. A. C., M. J. KAASHOEK, J. T. VAN OIRSCHOT, AND F. A. M. RIJSEWIJK. 1995. A glycoprotein E deletion mutant of bovine herpesvirus 1 infects the same limited number of tissues in calves as wild type virus, but for a shorter period. *Journal of General Virology*, v.76, n.9, p.2387–2392, 1995.

VOGEL, F.S.F.; FLORES E.F.; WEIBLEN, R.; WINKELMANN, E.R.; MORAES, M.P.; BRAGANÇA, J.F.M.. Intrapreputial infection of young bulls with bovine herpesvirus type 1.2 (BHV-1.2): acute balanoposthitis, latent infection and detection of viral DNA in regional neural and non-neural tissues 50 days after experimental reactivation. *Veterinary Microbiology*, v.98, n.3-4, p.185-196, 2004.

WAGTER, L. H., GLAS, R. D., BLEUMINK-PLUYM, N., VAN ENGELENBURG, F. A. RIJSEWIJK, F. A., HOWVERS, D. J. A polymerase chain reaction (PCR) assay for the detection of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) in selectively digest whole bovine semen. *Veterinary Research Communications*, v.20, n.4, p.401-408, 1996.

WENZ, H. M. Capillary electrophoresis as a technique to analyze sequence-induced anomalously migrating DNA fragments. *Nucleic Acids Research.*, v.22, n. 19, p.4002-4008, 1994.

WINKLER, M. T. C., DOSTER, A., JONES, C. Persistence and reactivation of bovine herpesvirus 1 in the tonsils of latently infected calves. *Journal of Virology*, v.74, n.11, p.5337- 5346, 2002.

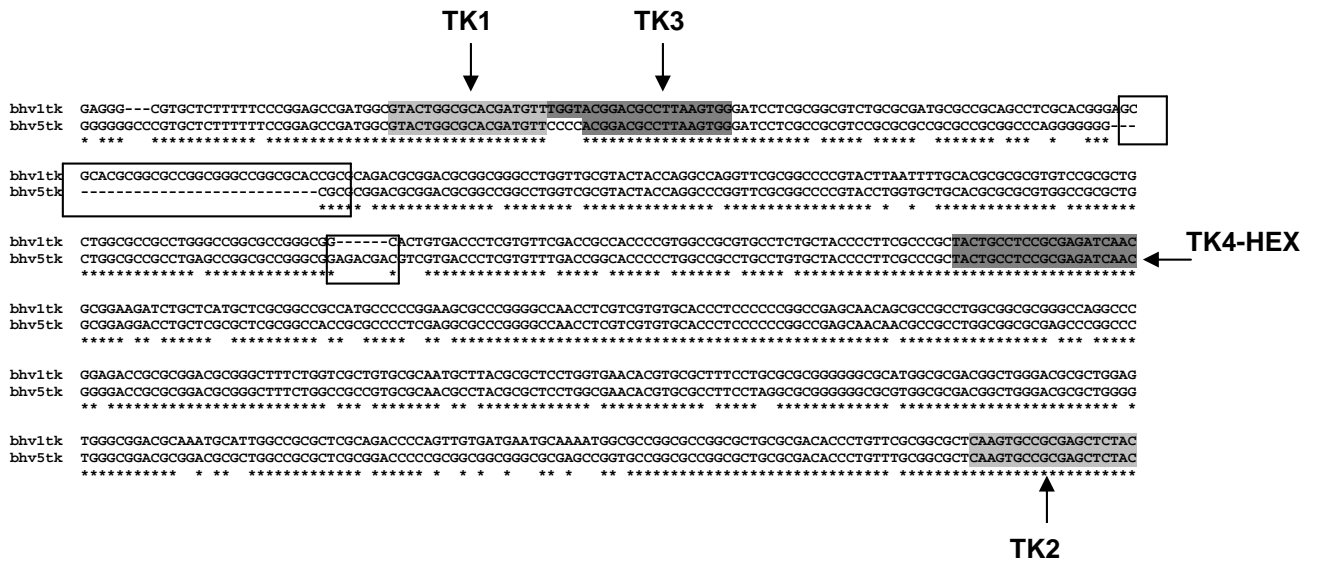


Figure 1: Schematic representation of fluorescent nested PCR primer sets to detect BHV-1 and BHV-5 based on thymidine kinase gene (TK). Arrows show primer sets position. TK1 and TK2: primer sets used for external amplification. TK3 and TK4-HEX: internal primer sets used for fluorescent nested PCR. Boxes: DNA sequence differences between BHV-1 and BHV-5 TK gene.

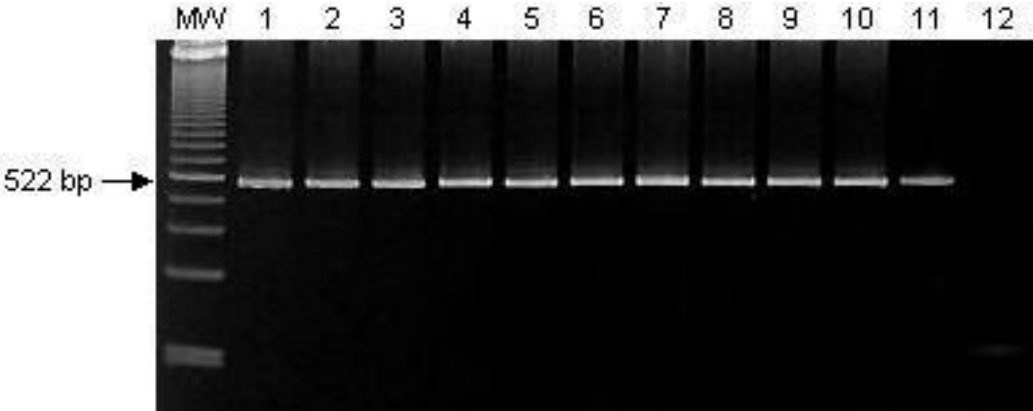


Figure 2: Evaluation of slaughtered peripheral blood leukocytes DNA quality using PCR targeting specific fragment of bovine LHR gene (bLHR). MW) Molecular weight marker “100 bp DNA ladder” 1-11) DNA from 10 leukocytes randomly selected samples. 12) PCR negative control (no DNA).

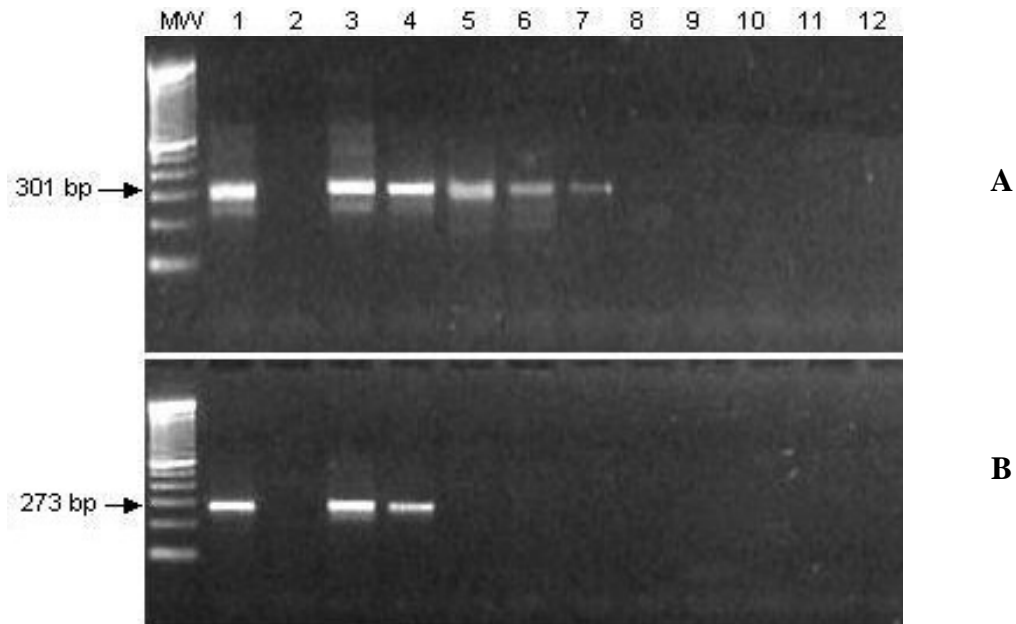


Figure 3: Threshold determination for BHV-1 and BHV-5 detection in serial dilutions over BHV free bovine blood visualized in 2% agarosis gel electrophoresis ethidium bromide stained where A) BHV-1 serial dilutions over BHV free bovine blood. B) BHV-5 serial dilutions over BHV free bovine blood MW) Molecular weight marker "100 bp DNA ladder", A1 e B1) Positive control DNA. A2 e B2) BHV free bovine blood. A3/B3 a A11/B11) 10^2 TCID₅₀/ml a 10^{-6} TCID₅₀/ml serial dilutions over BHV free bovine blood. A12 e B12) PCR negative control (no DNA).

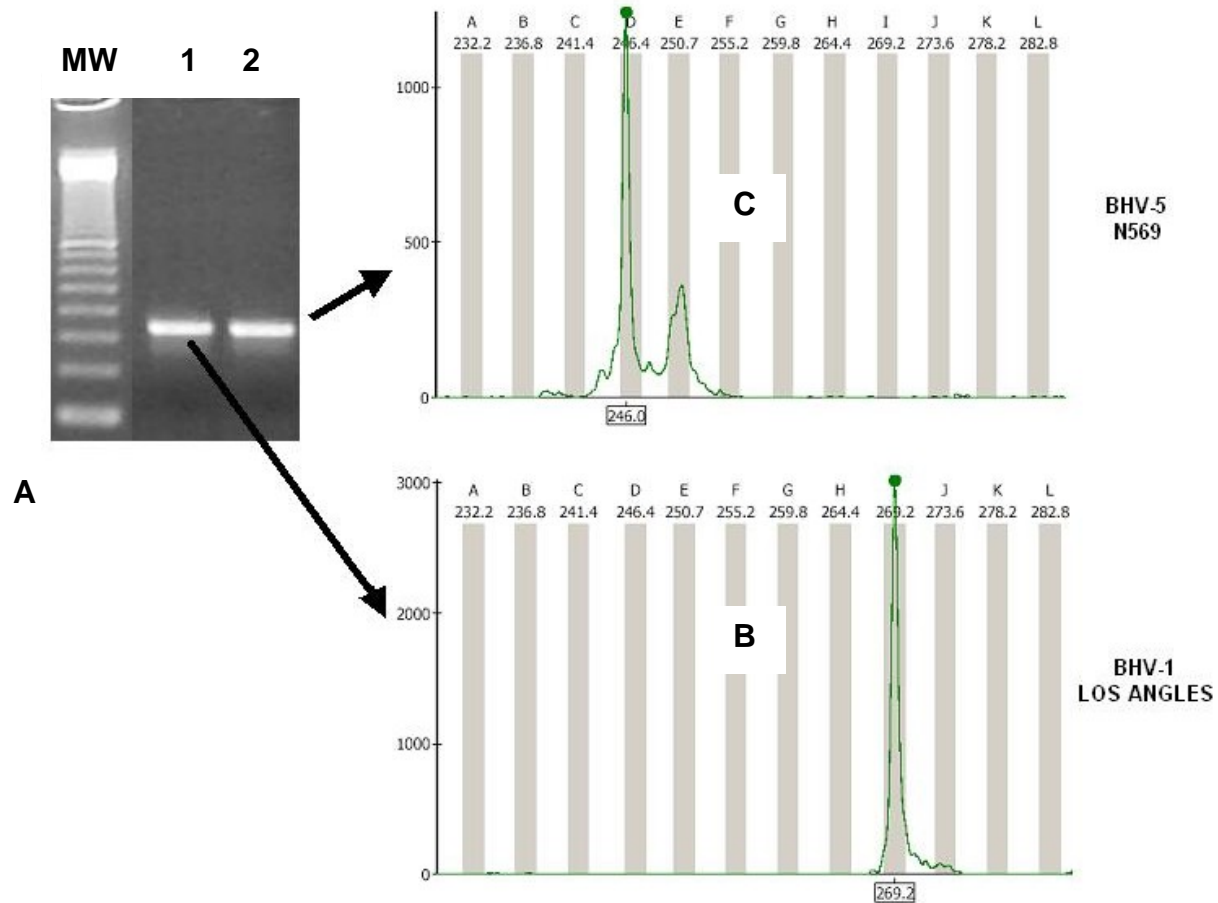


Figure 4: Demonstration of feasibility of capillary electrophoresis detection method. A) 2% agarosis gel electrophoresis ethidium bromide stained. MW) Molecular weight marker 100 bp DNA ladder, 1) Nested PCR amplified BHV-1 reference strain (Los Angeles) and 2) Nested PCR amplified BHV-5 reference strain (N569). B) Capillary electrophoresis peak pattern from nested PCR amplified BHV-1 reference strain (Los Angeles) and C) Capillary electrophoresis peak pattern from nested PCR amplified BHV-5 reference strain (N569).

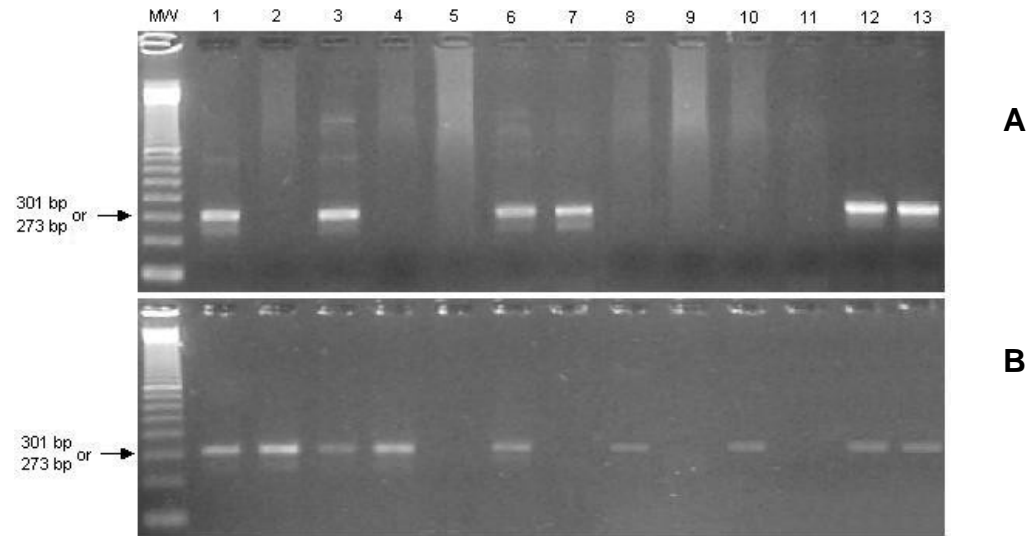


Figure 5: PCR based detection test for BHV in slaughtered cattle samples. A) Peripheral blood leukocytes (TKL) DNA and B) Trigeminal ganglia (TKT) DNA. MW) Molecular weight marker 100 bp DNA ladder, 1-10) Randomly selected samples (from 61 to 70) 11) Negative PCR control (no DNA), 12) BHV-1 reference strain (Los Angeles) DNA and 13) BHV-5 reference strain (N569) DNA.

Table 1: General results of BHV diagnosis using ELISA, nested PCR of peripheral blood leukocytes (TKL) and nested PCR of trigeminal ganglion (TKT) in slaughtered cattle.

ELISA	TKL	TKT	Total number of animals per category
+	-	-	23
+	270	-	7
+	270	270	8
+	270	245	3
+	-	270	20
+	-	245	6
+	-	270/245	1
-	270	270	7
-	270	245	2
-	270	-	5
-	-	270	8
-	-	245	1
-	-	-	9
68^a	32^a	56^a	100^b

^a Number of positive samples, ^b Number of slaughtered cows, 245 = positive for BHV-5 and 270 = positive for BHV-1

Table 2: Geographical origin of slaughtered cattle and ELISA, nested PCR of peripheral blood leukocytes (TKL) and nested PCR of trigeminal ganglion (TKT) tests results per property.

Herds	County	ELISA	BHV-1		BHV-5		Total number of PCR positive tissues per property
			TKL	TKT	TKL	TKT	
1	Três Lagoas- MS	5	1	2	-	-	3
2	Marília- SP	9	-	5	-	5	10
3	Rosana- SP	10	3	7	-	-	10
4	Araçatuba- SP	7	-	4	-	-	4
5	Lins- SP	10	2	2	-	-	4
6	Três Lagoa- MS	5	9	6	-	-	15
7	Marília- SP	6	6	5	-	2	13
8	Três Lagoa- MS	1	4	5	-	2	11
9	Inocência- MS	9	3	4	-	2	9
10	Camapuã- MS	6	4	5 ^a	-	1 ^a	9
TOTAL	-	68	77	12			

^a One animal whit both infections.

Variable Number of Tandem Repeats (VNTR) in Bovine Herpesvirus type 1 (BHV-1)

Genome as a Potential Tool for Virus Identification

Sergio M. Aoki^{ab}, Paulo M. Roehle^c, Cárís M. Nunes^a, Luzia H. Q. Silva^a, Anna P. Oliveira^c, José F. Garcia,^{a*}

^a Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal, Universidade Estadual Paulista – UNESP - Araçatuba, SP, Brazil, 16050-680.

^b Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista – UNESP - Botucatu, SP, Brazil, 18618-000.

^c DM/ICBS-UFRGS & CPVDF-FEPAGRO, Estrada do Conde 6000, Eldorado do Sul, RS, Brazil, 92990-000.

* Corresponding author:

Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular Animal (LBBMA)

International Atomic Energy Agency (IAEA) Collaborating Centre on Animal Genomics and Bioinformatics

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP

Rua Clóvis Pestana, 793 – Jd. D. Amélia - 16.050-680

Araçatuba, SP, Brazil.

phone: (18) 3636-3200 ext. 3636

Email: jfgarcia@terra.com.br

ABSTRACT:

The present study reports the discovery and characterization of variable number of tandem repeats (VNTR) sequences in Bovine Herpesvirus type 1 (BHV-1) genome and illustrates the applicability of this knowledge for viral identification. Analysis of BHV-1 genome (GenBank accession n. NC001847) using specific *in silico* analysis indicated 53 potential VNTR regions distribute along the viral double strand DNA. DNA from BHV-1 reference strains, field isolates (BHV-1.1 and BHV-1.2), attenuated commercial BHV-1 vaccine and Bovine Herpesvirus 5 (BHV-5) reference strain were submitted to PCR using 3 selected primer pairs targeting potential VNTRs and a discriminatory nested

PCR test to allow differentiation between BHV-1 and BHV-5. All 3 VNTR regions accessed by PCR showed the presence of length polymorphisms caused by variation in number of repeats, enabling the identification of each strain individually. VNTR analysis in BHV-1 has demonstrated to be a quick and practical alternative, when compared with DNA sequencing and RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), for viral genotyping with potential applications in evolutionary and epidemiological studies.

Key words: BHV-1, PCR, VNTR, Genotyping, repetitive DNA.

INTRODUCTION

Variable number of tandem repeats (VNTRs) are repetitive DNA regions spread in the genomes. Tandem arrays of repeated DNA sequences are positioned freely along the genome, varying from single nucleotide repeats to larger pieces of sequence repetition (GOLDSTEIN & SCHLOTTERER, 1999). This feature can be observed from virus to mammalian and has well reported high variability in repetition number (TAUTZ & SCHLOTTERER, 1994; FIELD & WILLS, 1998). VNTR regions can vary in length (FOSTER & TRIMARCHI, 1994) and implication with biological characteristics (MOXON *et al.*, 1994). Several examples of functional VNTRs were described in different classes of virus (DAVIS *et al.*, 1999). Mononucleotide repetitions were found in Mengovirus (DUKE *et al.*, 1990; HAHN & PALEMBERG, 1995), Vesicular Stomatitis Virus (BARR *et al.*, 1997), Hepatitis C Virus (YAMADA *et al.*, 1996) and Human Respiratory Syncytial Virus (GARCIA-BARRENO *et al.*, 1994).

Change in the repeat sequence, from trinucleotides to hexanucleotides, in hemagglutinin cleavage site has been attributed to increased virulence in Avian Influenza Virus (PERDUE *et al.*, 1997; WEBSTER *et al.*, 1992). The existence of VNTRs

able to alter gene expression and/or protein folding, which present variability in different types of viral populations, demonstrates that expansion and contraction in nucleotide number of repetitions is a recurrent phenomenon in viruses (DAVIS *et al.*, 1999). In a pioneer study involving molecular genetic characterization of BHV-1, Hammerschmidt *et al.* (1986) have analyzed the genome from different strains of BHV-1 by RFLP assay using Hind III endonuclease and has described heterogeneity in a specific fragment from UL (unique long) terminal region. This polymorphic fragment was detected in wild type DNA, isolates with high number of passages in tissue culture, as well as in non pathogenic strains. DNA sequencing of RFLP fragments revealed that heterogeneity was caused by short repetitions of 14 bp (5' GCTCCTCCTCCCTC 3'), which were conserved in other viruses (Simplex Virus type 1 - HSV-1 and Epstein-Barr virus - EBV). Variability ranged between 8 and 38 fourteen base pairs repetition units with an overall heterogenic region of about 400 bp. Although no function was assigned to that BHV-1 genomic region in this study, suspects of this VNTR influence in viral replication and potential existence of other VNTR regions along BHV-1 genome were raised. Recently, Walker *et al.* (2001) have characterized strains of Human Cytomegalovirus, a Betaherpesvirus with 240 Kb dsDNA, by using VNTR analysis. These authors used 10 regions to characterize 46 different strains. Based on Davis *et al.* (1999) who have demonstrated the feasibility of using specific software to localize VNTR candidate regions in entire virus genomes, the objective of the present study was to identify these types of DNA sequence in the BHV-1 genome by mean of computational analysis, and to use this information to propose new tools for molecular characterization.

MATERIAL AND METHODS

In silico analysis of BHV-1 genome

A genome search of BHV-1 (NC_001847 GenBank) for repetitive regions was carried out by using of Tandem Repeats Finder[®] software (BENSON, 1999), which uses specific algorithm that search for adjacent repetitions by percent identity and frequency repetitions criteria. Fifty-three potential VNTR regions were identified (Table 1). Aiming to demonstrate the feasibility of *in silico* VNTR search, three candidate regions were submitted to primer design using Primer3 software (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi).

Virus Strains

BHV-1 and BHV-5 reference strains and field isolates (BHV-1.1 and BHV-1.2) were prepared at Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor - IPVDF - Eldorado do Sul - RS- Brazil (Table 2). All strains were propagated in Mardin Delby Bovine Kidney (MDBK) cultured cells in MEM (Modified Eagle Media) supplemented with 10% bovine serum albumin (BSA), 10 µg/ mL of enrofloxacin (Baytril[®]) and incubated at 37°C in 5% CO₂ environment. DNA purification from infected cell suspensions was performed with QiaAmp[®] DNA mini kit (Qiagen, USA), following manufacturer instructions. DNA from commercial BHV-1 attenuated vaccine Cattle Master[®] (Pfizer Animal Health, New York, USA) was isolated following the same protocol. DNA was eluted from the columns using 200 µL of supplied elution buffer.

PCR and capillary electrophoresis

Aiming to differentiate BHV-1 from BHV-5 samples, a fluorescent nested PCR assay was designed in order to generate two different peak patterns in capillary electrophoresis analysis (270 bp and 245 bp respectively). First round of PCR amplification was performed in final volume of 50 μ L containing 20 μ L DNA solution, 5,0 μ L DMSO, 20 pmol of each primer (TK1 and TK2) (Table 3), 2,5 μ M of each dNTP, 5,0 μ L *Taq* polymerase reaction buffer 10 times concentrated (100 mM Tris-HCl, pH 9.0, 500 mM KCl), 2,5 mM $MgCl_2$, 1,0 unit Platinum *Taq* polymerase (Invitrogen- USA) and volume completed with ultra pure water (Invitrogen - USA). Cycling conditions were defined in a PTC - 100 thermocycler (MJ-Research[®], Waltham, Massachusetts, USA) by setting 10 minutes of initial denaturation at 94°C, followed by 35 cycles where the first 10 started at 94°C/50 seconds, 70°C/90 seconds and 72°C/60 seconds, decreasing 1°C of annealing temperature each cycle. Remaining 25 cycles were performed at 94°C/50 seconds, 60°C/90 seconds and 72°C/60 seconds with final extension of 72°C for 10 minutes. Second PCR round was performed immediately after completion of the first round using 2 μ l of PCR product from the first reaction. The same reagent concentrations were used for second round only altering the primer pair (TK3 and TK4, this late labeled with fluorochrome hexachloro-6-carboxyfluorescein - HEX on 5' end) (Table 3). Cycling conditions were defined in a PTC- 100 thermocycler (MJ-Research[®], Waltham, Massachusetts, USA) by setting 10 minutes of initial denaturation at 94°C, followed by 35 cycles where the first 10 started at 94°C/50 seconds, 70°C/90 seconds e 72°C/60 seconds, decreasing 0,5 °C of annealing temperature each cycle. Remaining

25 cycles were performed at 94°C/50 seconds, 65°C/90 seconds and 72°C/60 seconds with final extension of 72°C for 10 minutes.

In order to detect length variation in the 3 selected potential VNTRs regions, 3 different PCR primer pair sets were employed (Table 3). The same PCR reagent conditions and concentrations used on second PCR round were applied to VNTR2, VNTR4 and VNTR5, except for addition of respective primer pair sets and 20 µL of DNA template.

PCR products were submitted to capillary electrophoresis analysis in a MegaBace 1000 system (GE- Healthcare- UK Limited). Fluorescent peak shape and intensity were monitored by using the software Fragment Profiler (GE- Healthcare - UK Limited) and internal size standard ET-400R (GE- Healthcare- UK Limited) was used to assign fragment sizes.

Phylogenetic grouping from VNTR analysis

Based on results from PCR VNTR analysis (organized in GenePop format) phylogenetic grouping of BHV-1 and BHV-5 strains was designed by mean of Populations[®] and TreeView[®] softwares.

RESULTS

In silico analysis

After performing software analysis to predict potential VNTR regions from BHV-1 genome (NC_001847 GenBank), it was possible to identify 53 candidate VNTR regions along the whole genome, with period size variation between 3 and 94 base pairs (Table

1). The use of Tandem Repeats Finder software has allowed the identification of 8 regions where more than one possibility of repeat combination in the same genome position (Table 1).

Identification and molecular characterization of reference strains using VNTR markers

In order to evaluate the feasibility of using *in silico* approach to identify VNTR markers, 3 regions were selected to be PCR amplified (VNTR2, VNTR4 and VNTR5, located at positions 15, 44 and 53 Kb respectively in unique long –UL, segment of BHV-1 genome) (Table 1 and Figure 1). Primer sets flanking regions VNTR2, VNTR4 and VNTR5 were designed with fluorescent labeling in the reverse primer, and used on DNA from different BHV strains (Table 2). Prior to the use of VNTR primer sets, a specific TK gene nested fluorescent PCR test was applied to all samples in order to discriminate BHV-1 from BHV-5. All PCR products were submitted to capillary electrophoresis and DNA fragments were classified in peak patterns. Two different patterns was found for TK, 3 for VNTR2 and VNTR5, and 4 for VNTR4 (Figures 2, 3, 4 and 5, and Table 3). All strains have generated positive results, except by VNTR4 region from BHV-5. Phylogenetic grouping of the BHV strains used in this study has allowed to identify and characterize individually them (Table 4 and Figure 6).

DISCUSSION

In agreement with Davis *et al.* (1999) inference on genome size and data processing capability, we have observed the feasibility of processing the entire BHV-1 genome using Tandem Repeats Finder software in order to identify potential virus VNTR

regions. Identification of potential VNTR region distribution along practically all BHV-1 genome demonstrates that these regions are present not only in the 11 Kb internal and terminal repetitive sequences (IRS and TRS) regions, as expected due to the recognized role of these regions on genome functioning. The primer sets used in this study allowed the discrimination between BHV-1 and BHV-5 (Figure 2) and the individual assignment of 10 BHV-1 reference strains examined. Primer sets targeting the 3 selected VNTR regions produced positive PCR amplification, except by VNTR4 in BHV-5. This failure could be attributed to some extent of polymorphism present in the BHV-5 primer annealing region. Therefore, positive PCR results using VNTR2 and VNTR5 primer sets demonstrate this methodology would be applied to BHV-5 studies, since this virus has close to 85% DNA homology with BHV-1 genome (CHOWDHURY, 1995). Ten BHV-1 strains examined were distinguished from another by fragment size analysis in capillary electrophoresis. There were observed 3 patterns for VNTR2 (Figure 3), 4 for VNTR4 (Figure 4) and 3 for VNTR5 (Figure 5). Other techniques have been used to identify and typify BHV-1/BHV-5. Classical RFLP-based methods for virus classification has been used successfully, relying on DNA restriction analysis from whole genome, being able to indicate 5 subtypes (BHV-1.1, BHV-1.2a, BHV-1.2b, BHV-5a and BHV-5b) (METZLER *et al.*, 1985; ROIZMAN *et al.*, 1992) However, in order to be properly performed, RFLP demands large amounts of DNA, which requires virus multiplication on cell culture. Virus genotyping has also been performed using DNA sequence comparison from specific genes (MEYER *et al.*, 1999; SILVA *et al.*, 2000; ROS & BELÁK, 2002). Although not implying on previous isolation by cell culture passages, this approach has the disadvantage of analyzing only short fragments of DNA, offering a limited view of BHV genome variability. Data generated in the present

work suggests the possibility to explore VNTR polymorphism as a new tool for individual BHV-1 strain identification. In opposition to the major disadvantages of RFLP and DNA sequencing-based methods, VNTR analysis offers the possibility of genome wide coverage with no requirements of large amounts of DNA template. The observation of LAM/ LAM US9-/ LAM VHS- and SV265/ SV265gE- clustered in the grouping analysis (Figure 6) has indicated the conservation of patterns in similar strains even after cell culture passages. This feature was also observed when patterns from Cattle Master[®] vaccine (Pfizer Animal Health, New York, USA) and Los Angeles strain have been grouped.

Although being more expensive, automated capillary electrophoresis permits higher throughput processing of samples, allowing the semi-automation of the diagnostic procedures. Capillary electrophoresis based approaches have been used successfully to detect infectious agents (ENGLUND *et al.*, 2001; LI *et al.*, 2000) indicating the potential for application of this tool in molecular diagnosis area. Moreover, methodology improvement by multiplex PCR assay using primer sets labeled with different fluorochromes would be more cost effective. Moreover, fewer amounts of DNA template and less time to complete analysis are positive features of capillary electrophoresis.

We believe that future studies exploring the herein described potential VNTR regions can complement a marker panel for BHV identification and characterization. The present study has provided a substantial panel of candidate molecular markers with potential applicability in evolutionary and epidemiological BHV-1 investigation.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was financially supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (processes n. 02/08369-9 and 02/08470-1). Thanks to Érica Ribeiro for the precise technical support on capillary electrophoresis.

REFERENCES

- BARR, J.N.; WHELAN, S.P.J.; WERTZ, G.W. cis-acting signals involved in termination of vesicular stomatitis mRNA synthesis include the conserved AUAC and the U7 signal for polyadenylation. *Journal of Virology*, v.71, n.11, p.8718–8725, 1997.
- BENSON, G. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Research*, v.27, n.2, p.573-580, 1999.
- DAVIS, C.L.; FIELD, D.; METZGAR, D.; SAIZ, R.; MORIN, P.A.; SMITH, I.L.; SPECTOR, S.A.; WILLS, C. Numerous length polymorphisms at short tandem repeats in human cytomegalovirus. *Journal of Virology*, v.73, n.8, p.6265-6270, 1999.
- DUKE, G. M.; OSORIO, J.E.; PALMENBERG, A.C. Attenuation of Mengo virus through genetic engineering of the 59 noncoding poly(C) tract. *Nature*, v.343, p.474-476, 1990.
- ENGLUND, S.; BOLSKE, G.; BALLAGI-PORDÁNY, A.; JOHANSSON, K.E. Detection of *Micobacterium avian subs paratuberculosis* in tissues samples single, fluorescent and nested PCR based on the IS900 gene. *Veterinary Microbiology*, v.81, n.3, p.257-271, 2001.
- FIELD, D.; WILLS, C. Abundant microsatellite polymorphisms in *S. cerevisiae* and the different distributions of microsatellites in eight prokaryotes and *S. cerevisiae* results from strong mutation pressures and a variety of selection forces. *Proceedings National Academic Science USA*, v.95, n.4, p.1647-1652, 1998.
- FIELD, D.; WILLS, C. Long, polymorphic microsatellites in simple organisms. *Proceedings Biological Science.*, v.263, n.1367, p.209–215, 1996.
- FOSTER, P.L.; TRIMARCHI, J.M. Adaptive reversion of a frameshift mutation in *Escherichia coli* by simple base deletions in homopolymeric runs. *Science* v.265, n.5170, p.407-409, 1994.
- GARCIA-BARRENO, B.; DELGADO, T.; MELERO, J.A. Oligo(A) sequences of human respiratory syncytial virus G protein gene: assessment of their genetic stability in frameshift mutants. *Journal of Virology*, v.68, n.9, p.5460–5468, 1994.

HAHN, H.; PALEMBERG, A.C. Encephalomyocarditis viruses with short poly(C) tracts are more virulent than their mengovirus counterparts. *Journal of Virology*, v.69, n.4, p.2697-2699, 1995.

HAMMERSCHMIDT, W.; LUDWIG, H.; BUHK, H. Short repeats cause heterogeneity at genomic terminus of bovine herpesvirus 1. *Journal of Virology*, v.58, n.1, p.43-49, 1986.

LI, Q.; LIANG, J.; LUAN, G.; ZHANG, Y.; WUANG, K. Molecular beacon-based homogeneous fluorescence PCR assay for the diagnosis of infectious diseases. *Analytical Sciences*, v.16, n.1, p.245-248, 2000.

METZLER, A.E.; MATILE, H.; GASSMANN, U.; ENGELS, M.; WYLER, R. European isolates of bovine herpesvirus 1: a comparison of restriction endonuclease sites, polypeptides, and reactivity with monoclonal antibodies. *Archives of Virology*, v.85, n.1-2, p.57-69, 1985.

MEYER, G.; BARE, O.; THIRY, E. Identification and characterization of bovine herpesvirus type 5 glycoprotein H gene and gene products. *Journal of General Virology*, v.80, n.11, p.2849-2859, 1999.

MOXON, E.; RAINEY, P.; NOWAK, M.; LENSKI, R. Adaptive evolution of highly mutable loci in pathogenic bacteria. *Current Biology*, v.4, n.1, p.24-33, 1994.

PERDUE, M.L., GARCIA, M.; SENNE, D.; FRAIRE, M. Virulence-associated sequence duplication at the hemagglutinin cleavage site of avian influenza viruses. *Virus Research*, v.49, n.2, p.173-186, 1997.

ROIZMAN, B.; DESROSIERS, R.C.; FLECKESNSTEIN, B.; LOPEZ, C.; MINSON, A.C.; STUDDERT, M.J. The family Herpesviridae: an update. The Herpesvirus Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Archives of Virology*, v.123, n.3-4, p.425-449, 1992.

ROS, C.; BELÁK, S. Characterization of the glycoprotein B gene from ruminant alphaherpesviruses. *Virus Genes*, v.24, n.7, p.99-105, 2002.

SILVA, N.; ESCARMIS, C.; SOLANA, A.; CASTRO, J. M. Variabilidad genómica entre cepas del herpesvirus bovino tipo 1 aisladas de casos clínicos de IBR. *Investigación Agraria, producción y sanidad animales*, v.15, n.1-2, p.59-67, 2000.

TAUTZ, D.; SCHLOTTERER, C. Simple sequences. *Current Opinion in Genetics & Development*, v.4, p.832-837, 1994.

WALKER, A.; PETHERAM, S.J.; BALLARD, L.; MURPHY, J.R.; DEMMLER, G.J.; BALLE JR., J.F. Characterization of human Cytomegalovirus Strains by Analysis of Short Tandem Repeat Polymorphisms. *Journal of Clinical Microbiology*, v.39, n.6, p.2219-2226, 2001.

WEBSTER, R.G.; BEAN, W.; GORMAN, O.T.; CHAMBERS, T.M.; KAWAOKA, Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiology Reviews*, v.56, n.1, p.151-179, 1992.

YAMADA, N.; TANIHARA, K.; TAKADA, A.; YORIHUZI, T.; TSITSUMI, M.; SHIMOMURA, H.; TSUJI, T.; DATE, T. Genetic organization and diversity of the 39 noncoding region of the hepatitis C virus genome. *Virology*, v.223, n.6, p.255-261, 1996.

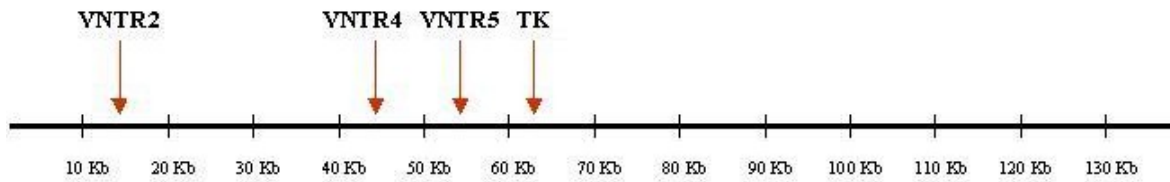


Figure 1: Localization of candidate VNTR regions and TK gene used for identification and characterization of BHV.

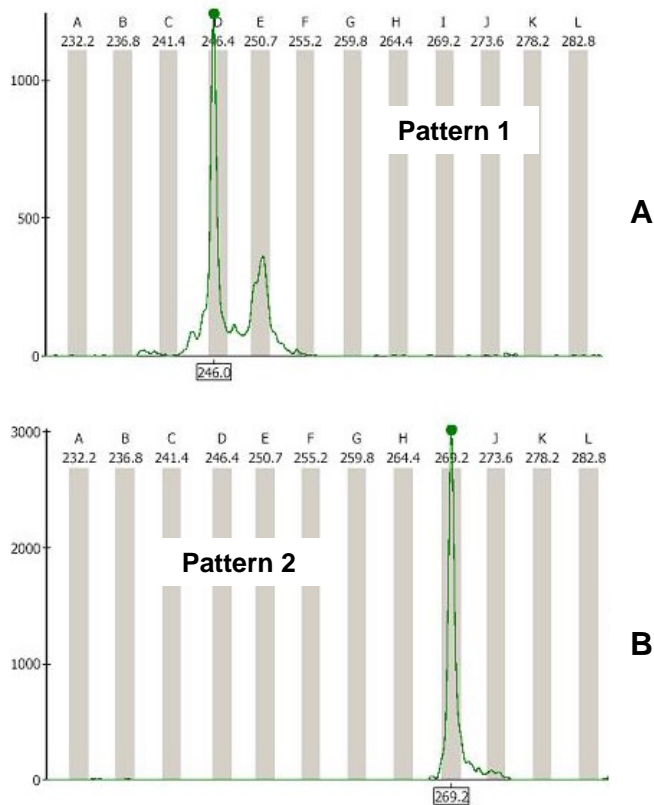


Figure 2: Illustration of peak patterns detected by capillary electrophoresis for TK PCR DNA fragments. A) Pattern 1 (BHV-5) and B) Pattern 2 (BHV-1).

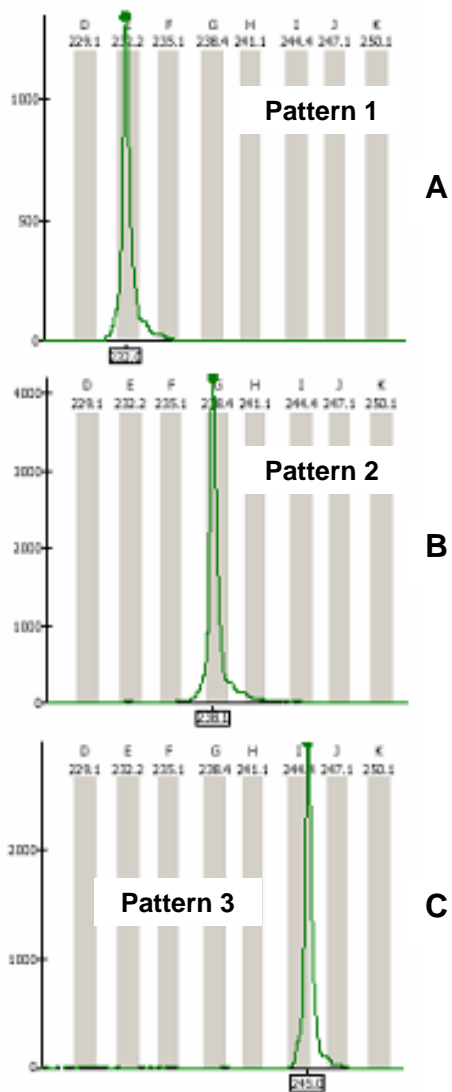


Figure 3: Illustration of peak patterns detected by capillary electrophoresis for VNTR2 PCR DNA fragments. A) Pattern 1; B) Pattern 2 and C) Pattern 3.

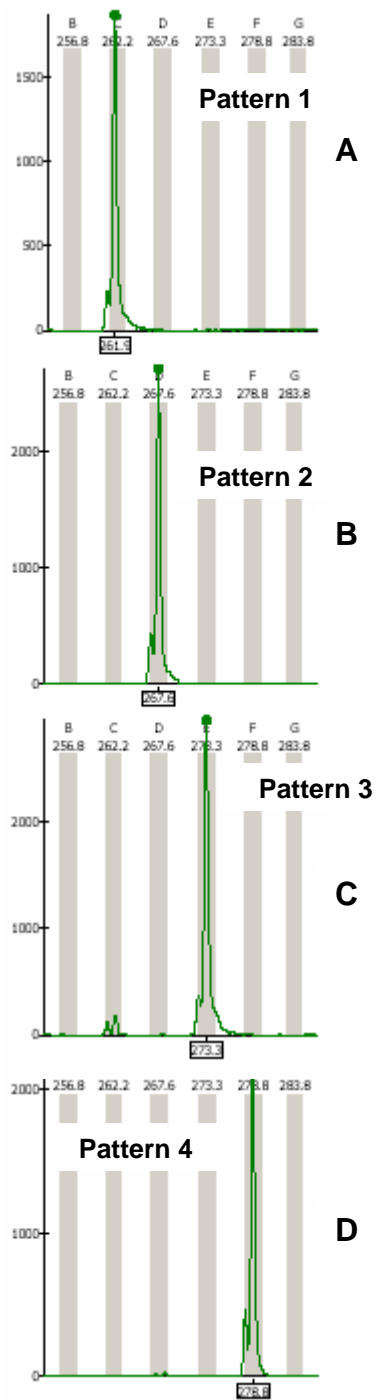


Figure 4: Illustration of peak patterns detected by capillary electrophoresis for VNTR4 PCR DNA fragments. A) Pattern 1; B) Pattern 2; C) Pattern 3 and D) Pattern 4.

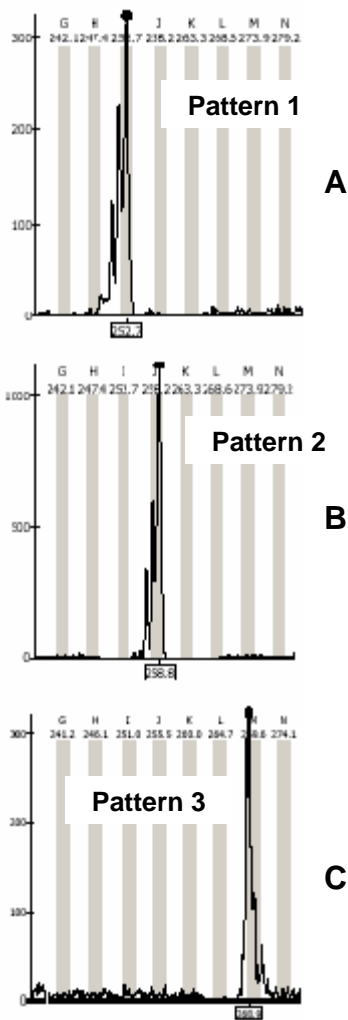


Figure 5: Peak patterns detected by capillary electrophoresis for VNTR2 PCR DNA fragments.

A) Pattern 1; B) Pattern 2 and C) Pattern 3.

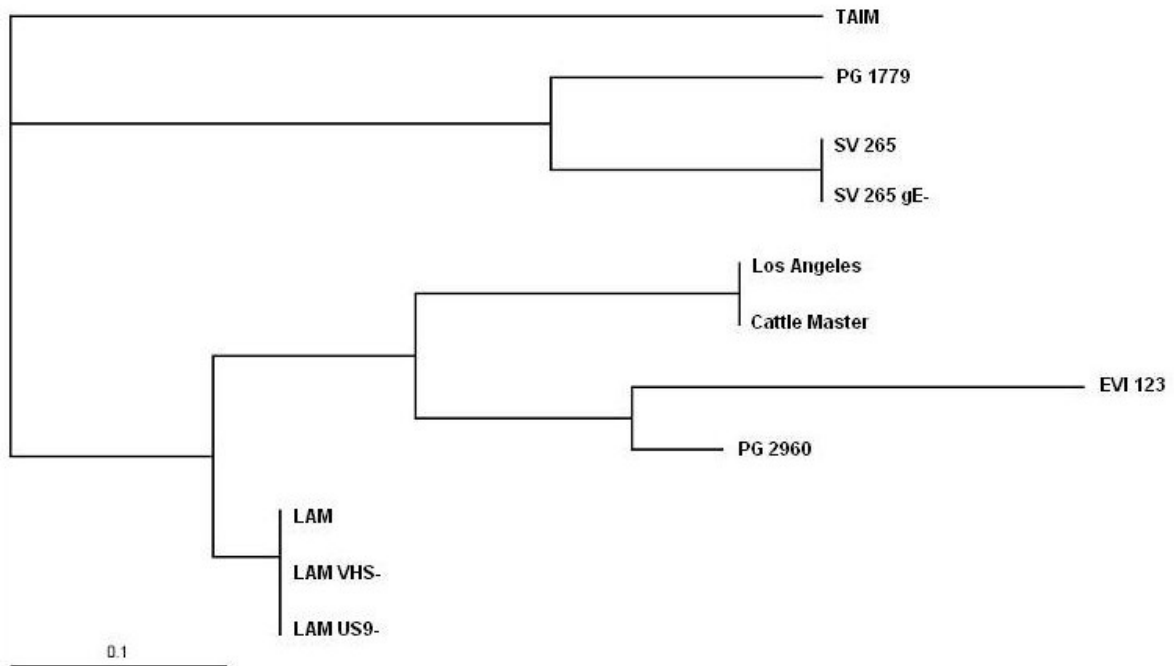


Figure 6: Phylogenetic grouping generated by VNTR region analysis using Populations and TreeView softwares.

Table 1: Putative VNTR candidates in BHV-1 genome generated by *in silico* analysis.

Position in BHV-1 genome (bp)	Period Size	Estimated Copy Number
235--437	14	14.5
15662--15692^a	6	5.2
15905--16089	60	3.1
16254--16287	6	5.7
29482--29516	18	1.9
38497--38579	27	3.1
38770--38951	21	8.5
38945--39001	12	4.8
39037--39112^b	6	12.7
39037--39112^b	18	4.2
39403--39570	27	6.2
39920--40035	12	9.7
44383--44416^a	6	5.7
53894--53928^a	9	3.9
58468--58503	18	2.0
74423--74455	12	2.6
91715--91792	6	13.0
98764--98861^b	6	16.3
98756--98857^b	12	8.5
101253--101287	6	5.8
102256--102320	18	3.6
103109--103133	6	4.2
103351--103421	3	24.0
105405--105433	3	9.7
105490--105574^b	9	9.4
105490--105598^b	3	36.3
105851--105887	15	2.5
106013--106039	14	1.9
106993--107031	18	2.2
107060--107134	39	1.9
107388--107495	33	3.3
108971--109160	94	2.0
111362--111412	17	3.0
111808--111863	21	2.7
112072--112370	5	59.8
112486--112611	13	11.2
112478--112611	22	6.1
113845--113879	17	2.1
113877--114109^b	9	25.9
113877--114111^b	18	13.1
116147--116192^b	6	7.7
116144--116192^b	12	4.1
116144--116192^b	18	2.7
117287--117322	10	3.4
124109--124341^b	9	25.9
124107--124341^b	18	13.1
124339--124373	17	2.1
125607--12574^b	22	6.1
125607--12573^b	13	11.2
125848--126146	5	59.8
126355--126410	21	2.7
126792--126847	17	3.3
129058--129247	94	2.0
130723--130830	33	3.3
130807--130884	18	4.5
131084--131158	39	1.9
131187--131225^b	18	2.2
132179--13220^b	14	1.9
132338--132367	15	2.0

132644--132728 ^b	9	9.4
132620--132728 ^b	3	36.3
132785--132813	3	9.7
134797--134867	3	24.0
135085--135109	6	4.2

^a VNTR candidate regions analyzed in this study

^b VNTR candidate regions showing different period size in the same location

Table 2: Primer sets for BHV-1/BHV-5 identification and characterization. TK1 and TK2: primers used in first PCR round for BHV-1/BHV-5 identification. TK3 and TK4: primers used in nested fluorescent PCR for BHV-1/BHV-5 identification. Primer sets VNTR2, VNTR4 and VNTR5 (F and R) were used for VNTR analysis.

Primer Name	GENOME POSITION	PRIMER SEQUENCE
TK1	63403- 63420 bp	5' GTACTGGCGCACGATGTT 3'
TK2	64063- 64081 bp	5' GTAGAGCTCGCGGCACTTG 3'
TK3	63403- 63420 bp	5' GTACTGGCGCACGATGTT 3'
TK4	63701- 63721 bp	HEX- 5' GTAGAGCTCGCGGCACTTG 3'
VNTR2F	15599- 15616 bp	5' GCTGCCCGCAGAGTCTGG 3'
VNTR2R	15836- 15854 bp	HEX- 5' CCCTCGCCTTCGTTTTTCGT 3'
VNTR4F	44276- 44293 bp	5' CTTTGGGTGCGGGCGTGG 3'
VNTR4R	44547- 44566 bp	HEX- 5' TCGTCAGCAGGGGAGGAGGC 3'
VNTR5F	53833- 53854 bp	5' AGCTATGCAGCGTGGGCCAGTA 3'
VNTR5R	54090- 54110 bp	NED- 5' CGCCGACGAGGACATCCAGAA 3'

HEX – 4,7,2',4',5',7'-hexafluoro-6-carboxyfluorescein

NED - 7'8'-benzo-5'fluoro-2',4,7-trichloro-5- carboxyfluorescein

Table 3: VNTR2, VNTR4 and VNTR5 variants found after capillary electrophoresis analysis, expected repeat sequence composition, number and size of observed variants.

VNTR Locus	Expected Repeat Sequence from BHV-1 reference strain number of repeats	Number of Observed Variants (size of PCR fragments – bp)
VNTR2	(CGGGCT) ⁵	3 (232 ^a / 238 ^b / 245 ^c)
VNTR4	(GCTCTC) ⁵	4 (262 ^a / 268 ^b / 272 ^c / 278 ^d)
VNTR5	(GGCGGCGCT) ⁴	3 (253 ^a / 259 ^b / 273 ^c)

^a Fragment size corresponding to Pattern 1.

^b Fragment size corresponding to Pattern 2.

^c Fragment size corresponding to Pattern 3.

^d Fragment size corresponding to Pattern 4.

Table 4: BHV-1 and BHV-5 strains peak patterns capillary electrophoresis analysis generated by TK, VNTR2, VNTR4 and VNTR5 PCR.

STRAINS*	PRIMER SETS			
	TK	VNTR2	VNTR4	VNTR5
LOS ANGELES^a	2	2	1	2
CATTLE MASTER^d	2	2	1	2
LAM^a	2	1	2	2
LAM US9-^c	2	1	2	2
LAM VHS-^c	2	1	2	2
SV 265^b	2	1	4	1
SV 265 GE-^c	2	1	4	1
PG 1779^b	2	1	4	3
EVI 123^b	2	3	3	2
PG 2960^b	2	3	1	2
TAIM^e	1	1	-	2

^aBHV-1 Reference strain, ^bBHV-1 field isolate, ^cBHV-1 field isolate with gene deletions, ^dCommercial attenuate BHV-1 vaccine, ^eBHV-5 field isolate.

CONCLUSÕES

É possível detectar BHV-1 em amostras de leucócitos e diferenciar a presença de BHV-1 e BHV-5 em amostras de gânglios trigeminiais de fêmeas bovinas abatidas em frigorífico da Região Noroeste do Estado de São Paulo, com histórico de não vacinação, sendo o nested PCR de DNA de leucócitos uma ferramenta a ser explorada para aplicação em estudos epidemiológicos do BHV-1.

Existem regiões VNTR distribuídas no genoma do BHV-1 e do BHV-5 que podem ser utilizadas como ferramenta de identificação e caracterização genética de estirpes de referência e isolados virais, com potencial aplicação em estudos evolutivos e epidemiológicos de ambos os vírus.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.
This page will not be added after purchasing Win2PDF.