

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

TÂNIA REGINA PENHA

PRODUÇÃO DE INSUMOS PARA IMUNODIAGNÓSTICO DE HERPESVÍRUS
BOVINO 1 E 5

CURITIBA

2012

TÂNIA REGINA PENHA

PRODUÇÃO DE INSUMOS PARA IMUNODIAGNÓSTICO DE HERPESVÍRUS
BOVINO 1 E 5

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor pelo Programa de Pós-graduação em Processos Biotecnológicos da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vanete T. Soccol

CURITIBA

2012

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à energia positiva do universo que me ronda e envolve todos que estão ao meu lado nos unindo cada vez mais.

AGRADECIMENTOS

Em todos estes anos, sempre tive que agradecer a alguém, nas mais diversas fases de minha vida. Começo enumerando àqueles sem os quais este trabalho jamais teria acontecido:

A meus pais (Thereza e Modesto), meus filhos Alessandra e Guilherme, meus irmãos e todos os meus amigos, os que se foram e os que ainda estão ao meu lado.

A Universidade Federal do Paraná (UFPR), onde tive o prazer de conhecer e trabalhar com uma pessoa maravilhosa, minha orientadora Profa. Dra. Vanete Thomaz Soccol.

Ao Dr. Paulo M. Roehe, por permitir a realização do sequenciamento da amostra de vírus e a produção do anticorpo monoclonal.

A Samuel Cibulski e Ana Paula Materle, do Instituto de Pesquisa Veterinária Desidério Finamor (IPVDF) em Eldorado do Sul, que me acolheram e me ajudaram muito em várias etapas deste trabalho.

A todos da divisão de antígenos do Instituto de Tecnologia do Paraná, que colaboraram diretamente na realização deste trabalho em especial a Jorge Vitor Bacila Agottani, gerente da divisão, por permitir a realização do projeto na divisão. Também expresso meus agradecimentos a Rafael Igreja, Simone Tomás, Marcos, Jandira, Pedro Henrique e Rubens Chaguri, pela colaboração.

Aos funcionários da SPL Evolution Ltda., Dr. Luís Soares, Rodrigo, Brenda, Luciana e Bruna que me auxiliaram na obtenção das Proteínas Recombinantes e pela atenção dispensada todas as vezes que estive trabalhando lá.

Aos meus amigos Dr. Marcelo Ribani, Luciana Pedroso, Carolina Perotoni e Gilberto Delinski Jr. pela ajuda na purificação das proteínas recombinantes por cromatografia no Äkta.

A outros companheiros, que me ajudaram no desenvolvimento deste trabalho, em especial a Cybelle de Souza.

Aos diretores do Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR) que me acolheram na mais de vinte anos e me concederam a chance de realizar o sonho de cursar um Doutorado.

A todos os coordenadores, professores, participantes da banca e funcionários do Programa de Pós-graduação em Processos Biotecnológicos-PPGPB/UFPR.

Mais uma vez agradeço de coração, a todos, principalmente a Deus por mais esta etapa que está se encerrando.

RESUMO

As infecções causadas por herpesvírus bovino tipos 1 (BoHV-1) e 5 (BoHV-5), membros da família *Herpesviridae*, têm sido associadas a apresentações clínicas e subclínicas nesta espécie animal. As similaridades genômica e antigênica entre ambos representam um grande desafio para o diagnóstico laboratorial destas infecções. Os objetivos do presente estudo foram inicialmente identificar duas cepas (A e B), isoladas de casos clínicos, pelas técnicas de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Análise de Enzima de Restrição (REA) utilizando o gene da glicoproteína C (gC) e enzima *Bgl*I, respectivamente. Os amplicons obtidos para as referidas amostras apresentaram bandas em torno de 572 a 575 pb, respectivamente. Na REA, a amostra B apresentou dois fragmentos (333 pb e 239 pb) enquanto que a amostra A permaneceu com um único fragmento de aproximadamente 572 pb. O sequenciamento parcial dos genes da gC revelou 572 nucleotídeos para a amostra A compatível com o BoHV-1 do sub tipo 1.1. A amostra B indicou 575 nucleotídeos e foi agrupada com o BoHV-5. Na segunda etapa deste estudo a amostra B foi utilizada para produzir 61 hibridomas produtores de anticorpos monoclonais (AcMc) anti-BoHV-5 dos quais apenas dois (8E11 e 3B2) reagiram com a cepa BoHV-5 sendo tal reação revelada pelo teste de imunoperoxidase (IPX). A última etapa deste trabalho referiu-se à construção de um plasmídeo recombinante para a expressão da proteína gG126 do envelope da cepa A (BoHV-1). Os *primers* desenhados foram amplificados, clonados e expresso em *E. coli*. A atividade da proteína produzida foi testada frente a soros bovinos positivos, hiperimunes e negativos contra BoHV-1. Soros hiperimune e AcMc anti-BoHV-5 também foram testados. A proteína recombinante mostrou reatividade frente aos soros bovinos positivos e hiperimune anti-BoHV-1, bem como ao soro hiperimune anti-BoHV-5. No entanto, não foi reconhecida quando submetida a soro anti-BoHV-1 negativo e anticorpos monoclonais anti-BoHV-5. Conclui-se, a partir dos resultados obtidos, que as técnicas moleculares são importantes ferramentas para caracterização de cepas de BoHV-1 e BoHV-5. Além disso, os AcMc anti-BoHV-5 e a proteína recombinante gG126 do BoHV-1 produzidos representam potenciais insumos para o desenvolvimento de testes diagnósticos visando estratégias futuras para o controle e prevenção infecções pelos herpesvírus destes tipos.

Palavras-chave: BoHV-1; BoHV-5; glicoproteína C; Análise de Restrição por Endonuclease; anticorpos monoclonais; proteína recombinante; plasmídeo.

ABSTRACT

The infections caused by bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1) e 5 (BoHV-5), *Herpesviridae* Family members, have been associated with clinical and subclinical presentations in this animal species. The genomic and antigenic similarities between both represent a great challenge to the diagnostic laboratory of these infections. Initially, the present study aimed to identify two strains (A and B), isolated from clinical cases, by Polymerase Chain Reaction (PCR) and Restriction Enzyme Analyses (REA) using glycoprotein C (gC) gene and *Bgl*I, respectively. The referred samples had amplicons with bands with 572 to 575 pb, respectively. In REA, the sample B generated two fragments (333 pb and 239 pb), while the sample A had only one fragment of 572 pb. The partial sequencing of gC genes showed 572 nucleotides for the sample A, compatible with BoHV-1 subtype 1.1. The sample B revealed 575 nucleotides and was related with BoHV-5. In the second step of this study the sample B was used to produce 61 anti-BoHV-5 monoclonal antibodies (Mabs) hybridoma producers from which only two (8E11 e 3B2) were reagents with the BoHV-5 strain. This reaction was revealed by immunoperoxidase (IPX). The last step from this work was referred to the recombinant plasmid construction for the strain A (BoHV-1) envelope protein gG126 expression. The designed primers were amplified, cloned and expressed in *E. coli*. The protein activity was tested using positive, hyperimmune and negative bovine sera against BoHV-1. Hyperimmune sera and Mabs anti-BoHV-5 were also tested. The recombinant protein showed reactivity against positive and hyperimmune anti-BoHV-1 sera, and against hyperimmune BoHV-5. However, the recombinant protein wasn't recognized when submitted to the negative anti-BoHV-1 serum and anti-BoHVp-5 Mabs. From these results, it is possible to conclude that molecular techniques are important tools for the BoHV-1 and BoHV-5 strains characterization. Also, the produced anti-BoHV-5 Mabs and the BoHV-1 recombinant gG126 protein represent potential products for the development of diagnostic tests aiming future strategies for the control and prevention of these herpesvirus type infections.

Key words: BoHV-1; BoHV-5, glycoprotein C; Restriction Enzyme Analyses; monoclonal antibodies; recombinant protein, plasmid.

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO I

- FIGURA 1 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE UM VÍRION DE ALPHAHERPESVIRUS(HSV)..... 6
- FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA SEQUÊNCIA PROVÁVEL DOS GENES DAS GLICOPROTEÍNAS G DO GENOMA DOS ALPHAHERPES 7

CAPITULO II

- FIGURA 3 - PRODUTOS DA AMPLIFICAÇÃO POR PCR DO FRAGMENTO DO GENE gC DAS AMOSTRAS VIRAIS ANALISADAS 23
- FIGURA 4 - PRODUTO DA PCR CLIVADO COM A ENZIMA *Bgl*I 24
- FIGURA 5 - SEQUÊNCIA DE DNA DO GENE gC DA AMOSTRA ANALISADA 24
- FIGURA 6 - COMPARAÇÃO DA SEQUÊNCIA DOS GENES DA gG 25

CAPITULO III

- FIGURA 7 – CULTIVO DE CÉLULAS TRAQ. FB EM MONOCAMADAS 38
- FIGURA 8 - EFEITO CITOPÁTICO CAUSADO PELO BoHV-5 EM CULTIVO DE CÉLULA TRAQ. FB 38
- FIGURA 9 - COLÔNIAS DE HIBRIDOMAS APÓS 10 DIAS DE CULTIVO..... 39
- FIGURA 10 – COLÔNIA DE HIBRIDOMAS APÓS 15 DIAS DE CULTIVO 39
- FIGURA 11 – REAÇÃO DE IMUNOPEROXIDASE DO AcMc (HIBRIDOMA 8E11) EM CULTIVO DE CÉLULAS TRAQ. FB INFECTADAS COM BOHV-5 40
- FIGURA 12 - REAÇÃO DE IMUNOPEROXIDASE DO AcMc (HIBRIDOMA 3B12) EM CULTIVO DE CÉLULAS TRAQ. FB INFECTADAS COM BOHV-5 41

CAPITULO IV

FIGURA 13 –	WESTERN BLOTTING DAS FRAÇÕES DE SONICAÇÃO DO CULTIVO DE <i>E. coli</i> APÓS A EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE.....	53
FIGURA 14 –	ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1% MOSTRANDO A <i>vii</i> CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO	56
FIGURA 15 –	FIGURA 15 - WESTERN BLOTTING EM MEMBRANA DE PVDF SENSIBILIZADA COM A AMOSTRA SONICADA CONTENDO A PROTEÍNA RECOMBINANTE.....	56
FIGURA 16	ANÁLISE ELETROFORÉTICA EM GEL DE POLIACRILAMIDA 10% MOSTRANDO BANDAS DE APROXIMADAMENTE 50 kDa	57

LISTA DE QUADROS

CAPITULO II

QUADRO 1 -	HOMOLOGIA ENTRE ISOLADOS DE HERPESVÍRUS BOVINO (AMOSTRAS A e B) EM COMPARAÇÃO COM SEQUÊNCIA DAS CEPAS DO VÍRUS DEPOSITADAS NO GENBANK UTILIZANDO O PROGRAMA BLAST PARA ANÁLISE	26
------------	--	-----------

CAPITULO IV

QUADRO 2 -	CONDIÇÕES AVALIADAS DURANTE A ETAPA DE LISE E SONICAÇÃO	52
------------	---	-----------

LISTA DE SIGLAS

°C	- Grau Celsius
AcMc	- Anticorpo Monoclonal
BAC	- Cromossomos de Bactérias Artificiais
BEK	- Rim de Embrião de Bovino (Bovine Embryonic Kidney)
BoHV	- Herpesvírus bovino
BoHV-1	- Herpesvírus bovino -1
BoHV-5	- Herpesvírus bovino -5
BSE	- Encefalopatia Espongiforme Bovina
BVD	- Vírus da Diarreia Bovina (Bovine Virus Diarrhoeae)
CDME	- Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti
CFK	- Rim de feto de bezerro (Calf Foetal Kidney)
CK	- Rim de bezerro (kidney Calf)
CO ₂	- Dióxido de carbono
CPVDF	- Instituto de Pesquisa Veterinária Desidério Finamor
DNA	- Ácido Desoxiribonucleico
<i>E. coli</i>	- <i>Escherichia coli</i>
ELISA	- Imunoensaio Enzimático (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
F	- Em direção à frente (Forward)
gB, gC, gD, gE, gI, gH, gL, gG, gK e gM	- Glicoproteínas B, C, D, E, I, H, L, G, K e M
IBR	- Rinotraqueíte Infecciosa Bovina
IFI	- Imunoflorescência Indireta
IgG	- Imunoglobulina G
IgM	- Imunoglobulina M
IPB	- Balanopostite Pustular Infecciosa
IPV	- Vulvovaginite Pustular Infecciosa

IPTG	- Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside
IPX	- Imunoperoxidase
KDa	- Kilo Dalton
LB	- Luria-Bertani
mg	- Miligrama
mL	- Mililitro
M	- Molar
mM	- Milimolar
mA	- Miliamper
MDBK	- Célula de Rim Bovino (<i>Madin-Darby Bovine Kidney</i>)
MS	- Mato Grosso do Sul
Ng	- Nanograma
nm	- Nanômetro
OD	- Densidade óptica (<i>Optic density</i>)
OIE	- Organização Internacional Epizootias
OPI	- Oxaloacetato, Piruvato, Insulina
OPD	- <i>O-phenylenediamine Dihydrochloride</i>
pb	- Pares de base
PBS	- Solução Tampão Fosfatada
PCR	- Reação da Cadeia de Polimerase (<i>polymerase chain reaction</i>)
pmol	- Picomol
PNCRH	- Programa Nacional de Controle da raiva em Herbívoros
PR	- Paraná
REA	- Ensaio da Reação Enzimática (<i>Restriction Enzyme assay</i>)
RPM	- Rotação por minuto
RPMI	- Sigla de Roswelt Park Memorial Institute
R	- Em direção contrária (Reverse)

RJ	- Rio de Janeiro
RS	- Rio Grande do Sul
SC	- Santa Catarina
SDS-PAGE	- <i>Sodium Duodecil Sulfate</i> (<i>Poliacrylamide Gel Eletroforese</i>)
SEAB	SEAB - Secretaria da Agricultura e Abastecimento - Soro fetal bovino
SFB	- Soroneutralização
SN	- Sistema Nervoso Central
SNC	- São Paulo
SP	- Livre de agentes patogênicos (<i>Specific</i>
SPF	<i>Patogen Free</i>) - Solução Tampão Fosfatada
TBE	- Solução Tampão Tween Fosfato
TBS	- Instituto de Tecnologia do Paraná
TECPAR	- Célula de Traquéia de Feto Bovino
Traq FB	- Universidade Federal do Paraná
UFPR	- Unidade Internacional
UI	- Micrograma
µg	- Microlitro
µL	- Segmento longo (<i>long unid</i>)
UL	- Segmento curto (<i>short unid</i>)
US	- Western Blotting
WB	- Unidade gravitacional
xg	

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	1
2.OBJETIVOS.....	4
CAPÍTULO I	
4.REVISÃO DE LITERATURA.....	5
4.1.HISTÓRICO DO HERPESVÍRUS	5
4.2.ETIOLOGIA.....	6
4.3.TRANSMISSÃO E PATOGÊNESE.....	7
4.4.LATÊNCIA DO VÍRUS NO HOSPEDEIRO.....	8
4.5.ASPECTOS CLÍNICOS DAS INFECÇÕES ASSOCIADAS AO BoHV-1	9
4.5.1.FORMA RESPIRATÓRIA DA DOENÇA.....	9
4.5.2.FORMA CONJUNTIVAL	9
4.5.3 FORMA GENITAL DA DOENÇA	10
4.6.ASPECTOS CLÍNICOS DAS INFECÇÕES ASSOCIADAS AO BoHV-5	10
4.6.1.FORMA ENCEFÁLICA DA DOENÇA.....	11
4.7.DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA INFECÇÃO EM BOVINOS NO MUNDO E NO BRASIL	11
4.7.1 BoHV-1	12
4.7.2 BoHV-5	13
4.8.DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.....	13
4.8.1.ISOLAMENTO DO VÍRUS EM CULTIVO CELULAR	13
4.8.2.HISTOPATOLOGIA	14
4.8.3.TESTES SOROLÓGICOS	14
4.8.4.DIAGNÓSTICOS BASEADOS NA IDENTIFICAÇÃO DOS GENOMAS	15
CAPÍTULO II	
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE DUAS AMOSTRAS DE VÍRUS ISOLADAS DE BOVINOS NO ESTADO DO PARANÁ	18

CAPÍTULO III

PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS CONTRA ANTÍGENOS DE BoHV-5	33
--	-----------

CAPÍTULO IV

DESENVOLVIMENTO E PRODUÇÃO DE REATIVO RECOMBINANTE PARA DIAGNÓSTICO DA DOENÇA RINOTRAQUEÍTE INFECCIOSA BOVINA (IBR)	46
5. REFERÊNCIA GERAL	61
6.ANEXOS.....	71

1 INTRODUÇÃO

Os herpesvírus bovinos pertencem à Ordem *Herpesvirales*, Família *Herpesviridae*, Subfamília *Alphaherpesvirinae*, Gênero *Varicellovirus*. São descritos os tipos BoHV-1, BoHV-2, BoHV-4, BoHV-5 e BoHV-6 (DELHON *et al.*, 2003; DAVISON *et al.*, 2009).

Os herpesvírus bovino vêm sendo estudados há várias décadas (MEHROTRA *et al.*, 1976; THEODORIDIS, 1985; THIRY *et al.*, 1988; DURHAM *et al.*, 1990; SCHWYZER *et al.*, 1996).

Segundo dados da Organização Internacional Epizootias (OIE), países como Áustria, Dinamarca, Finlândia, Suécia, Itália (Província de Bolzano), Suíça e Noruega conseguiram erradicar este vírus após a implantação de rígido programa de erradicação. Programas de controle têm sido implantados na Austrália, Bélgica, Canadá, Índia, Polônia, Turquia e Estados Unidos (BOELAERT *et al.*, 2000).

No Brasil as herpesviroses também são registradas e causam prejuízos econômicos de grande monta ao país (MUELLER *et al.*, 1981; RAVAZZOLO *et al.*, 1989; VIDOR, 1995; MÉDICI *et al.*, 2000; SANCHES *et al.*, 2000; SOUZA *et al.*, 2002; ASHBAUGH *et al.*, 1997; ESTEVES *et al.*, 2008; HOLZ *et al.*, 2009; GATTI *et al.*, 2010).

São vírus relativamente grandes apresentando tamanho aproximado de 120 a 300nm com capsídeo proteico icosaédrico e envelope lipoproteico, com presença de glicoproteínas virais (ROIZMAN & KNIPE, 2001). O envelope viral é composto por 10 glicoproteínas (gB, gC, gD, gE, gI, gH, gL, gG, gK e gM) as quais apresentam diferenças em suas propriedades antigênicas, moleculares e função biológica durante a interação com a célula hospedeira (SCHWYZER & ACKERMANN, 1996).

O genoma viral é constituído por DNA de fita dupla que codifica cerca de 70 proteínas, das quais 33 são estruturais e em torno de 15 são não estruturais (MUYLKENS *et al.*, 2007).

Os herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e 5 (BoHV-5) são muito semelhantes genômica e antigenicamente (DELHON *et al.*, 2003). O BoHV-1 pode ser diferenciado nos subtipos 1.1, 1.2a e 1.2b. Já o vírus nominado BoHV-1.3 foi reclassificado como BoHV-5 na década de 90 (EDWARDS *et al.*, 1990).

O aspecto clínico da herpesvirose permite diferenciar a patogenia e epidemiologia no rebanho, no entanto, não permite atribuir a etiologia. Os métodos de diagnósticos sorológicos não permitem diferenciar o agente etiológico pois ocorrem reações cruzadas devido a alta homologia existente entre esses dois vírus. As técnicas moleculares vêm preencher esta lacuna, pois as amplificações de genes específicos seguida de análise por restrição enzimática ou sequenciamento vêm permitindo caracterizar as amostras virais (NOODEGRAAFF *et al.*, 2000).

No Brasil, devido ao programa de controle da raiva dos herbívoros (PNCRH) os encéfalos de animais suspeitos são submetidos a exames virológicos e histopatológicas visando apenas os diagnósticos da raiva e da encefalopatia espongiiforme bovina (BSE). Portanto, sugere-se que deste mesmo material enviado para exames seja solicitado o diagnóstico para herpesvirose em bovinos. Atualmente a técnica padrão ouro da OIE é a soroneutralização, que é uma técnica laboriosa e dispendiosa, exige um profissional extremamente habilitado para o cultivo de célula e infecção viral. Em nosso país não há programas nacionais de controle da herpesvirose e dependente de *kits* de origem importada para o diagnóstico.

O presente trabalho visa desenvolver e produzir insumos em larga escala para diagnóstico da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR) e Meningoencefalite Bovina causadas respectivamente pelos agentes BoHV-1 e BoHV-5 e disponibilizar insumos de baixo custo para o diagnóstico desta doença.

Para o desenvolvimento de insumos para o diagnóstico sorológico de infecções causadas pelos herpesvirus, foram utilizados vírus íntegro ou proteína recombinante.

O objetivo geral deste trabalho é caracterizar cepas do herpesvírus pelas técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR), seguidas da análise com enzimas de restrição (REA), sequenciamento. As cepas caracterizadas foram utilizadas na produção de anticorpos monoclonais anti-BoHV-5 e uma proteína recombinante para diagnóstico de IBR (BoHV-1).

O trabalho é apresentado em quatro capítulos: no primeiro, é feita a revisão de literatura; no segundo, são apresentados os dados da caracterização molecular de duas amostras de vírus isoladas de casos clínicos em bovino; o terceiro demonstra o desenvolvimento de um anticorpo monoclonal anti- BoHV-5 para teste diagnóstico por Imunoperoxidase (IPX) e no quarto, são apresentados dados da

construção de um plasmídeo para produção de uma proteína recombinante a partir do vírus BoHV-1, clonando o gene da glicoproteína G126 (gG) de uma região conservada do genoma.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Caracterizar duas cepas de herpesvírus bovino

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar e diferenciar as duas amostras herpesvírus pelas técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR), seguido da análise com enzimas de restrição (REA) e sequenciamento
- Produzir anticorpo monoclonal para identificação do herpesvírus 5 por imunoperoxidase
- Produzir uma proteína recombinante com a cepa do herpesvírus 1

CAPÍTULO I

4. REVISÃO DA LITERATURA

4.1. HISTÓRICO

Os primeiros indícios de herpesvíroses em bovinos ocorreram na África em animais apresentando vaginite, epididimite e infertilidade em áreas onde doenças como Brucelose e Tricomonose estavam sob controle (DAUBNEY *et al.*, 1938).

Na África do Sul, em 1954, McIntosh e colaboradores isolaram herpesvírus em ovo embrionado de uma amostra originária de uma vaca com vaginite.

Nos Estados Unidos, em 1968, Smith e colaboradores isolaram uma cepa de herpesvírus em cultivo de células de traqueia de feto bovino, a partir de tecidos de animais condenados durante inspeção *postmortem*. Sob microscopia eletrônica, a cepa isolada apresentou características morfológicas compatíveis com o gênero. No cultivo celular foram observados efeitos citopáticos e corpúsculos de inclusão intranucleares sugestivos destes agentes virais.

Na década de 70, com o avanço das técnicas moleculares foi possível a identificação de diferentes tipos de herpesvírus. Mohanty *et al.* (1971) identificaram uma cepa denominada de DN599 isolada em células primárias BEK (Bovine Embryonic Kidney) de material de corrimento nasal em bezerro. Tal cepa não foi neutralizada por antissoro contra IBR, no entanto o animal apresentou temperatura elevada, tosse, hiperpneia e dispneia.

Na Tanzânia, Rweyemamu & Loretu (1973) identificaram quatro amostras de herpesvírus em células CK (*Calf Kidney*) e as compararam com outras 16 cepas descritas por Plummer (1967). Os autores identificaram a cepa T877/70 e as outras três foram compatíveis com a cepa "Movar".

Theodoridis (1978) realizou os primeiros estudos relacionados à patogenia de 15 cepas de herpesvírus isolados de casos de vaginite e epididimite bovinas. Foram realizados cultivos celulares em células CFK (*Calf Foetal Kidney*) para a verificação do efeito citopático, testes sorológicos (soroneutralização), determinação das propriedades físico-químicas e características morfológicas por microscopia

eletrônica das amostras analisadas. Três das cepas investigadas foram sorologicamente idênticas ao vírus da Vulvovaginite Pustular Infeciosa-Rinotraqueíte Infeciosa Bovina (IPV-IBR). As demais cepas não foram sorologicamente relacionadas a estes agentes virais.

4.2. ETIOLOGIA

Os herpesvírus bovinos tipos 1 (BoHV-1) e 5 (BoHV-5) são membros da Ordem *Herpesvirales*, Família *Herpesviridae*, Subfamília *Alphaherpesvirinae*, Gênero *Varicellovirus*. Atualmente são descritos os tipos BoHV-1, BoHV-2, BoHV-4, BoHV-5 e BoHV-6 (DAVISON *et al.*, 2002).

O vírus tem tamanho relativamente grande (120-300nm) com capsídeo proteico icosaédrico e envelope lipoproteico com a presença de glicoproteínas virais (ROIZMAN & KNIPE, 2001) (FIGURA 1).

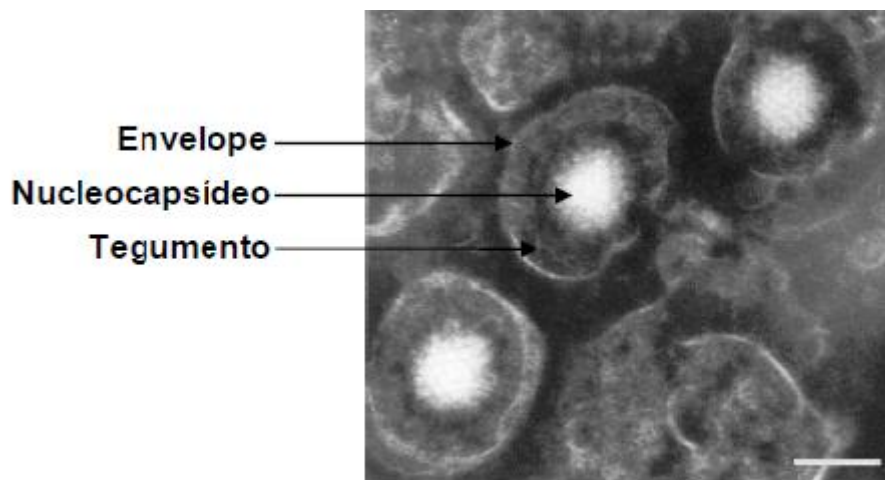


FIGURA 1 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE UM VÍRION DE ALPHAHERPESVIRUS (HSV)
 FONTE: FRANK FENNER, com modificações, JONH CURTIN SCHOOL, Australian National University, NCBI (2012)

O genoma viral é constituído por DNA de fita dupla que codifica cerca de 70 proteínas das quais 33 são estruturais e em torno de 15 são não estruturais (MUYLKENS *et al.*, 2007). O BoHV-1 pode ser diferenciado nos subtipos 1.1, 1.2a e 1.2b. A partir de 1990 o BoHV-1.3 foi reclassificado como BoHV-5 com subtipos a, b e não a/não b (EDWARDS *et al.*, 1990, ROIZMAN *et al.*, 1992).

O envelope viral é composto por pelo menos dez glicoproteínas (gB, gC, gD, gE, gI, gH, gL, gG, gK e gM) (FIGURA 2) as quais apresentam diferenças em suas propriedades antigênicas, moleculares e na função biológica durante a interação com a célula hospedeira (SCHWYZER & ACKERMANN, 1996; DELHON *et al.*, 2003).

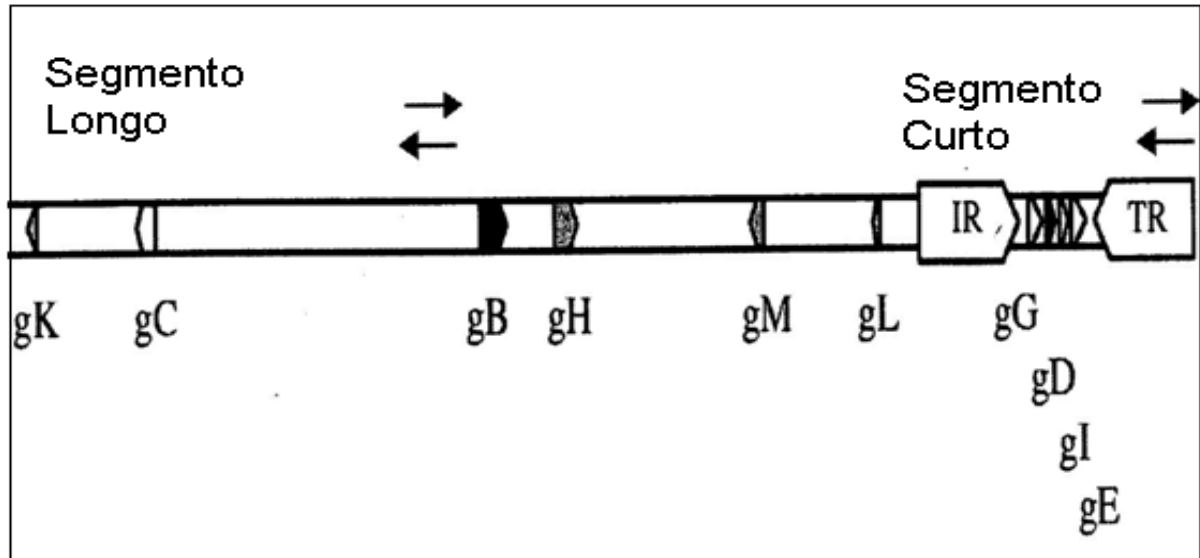


FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA SEQUÊNCIA PROVÁVEL DOS GENES DAS GLICOPROTEÍNAS G DO GÊNOMA DOS ALPHAHERPESVÍRUS.
 FONTE: Adaptado de CAMPOS *et al.* (2010)

4.3. TRANSMISSÃO E PATOGÊNESE

A transmissão dos BoHV-1 e BoHV-5 pode ocorrer de forma direta ou indireta. A primeira ocorre geralmente a partir do contato com secreções nasais de animais infectados. A forma indireta se dá por meio da inalação de aerossóis e pela ingestão de água e alimentos contaminados (MUYLKENS *et al.*, 2007).

A transmissão venérea, pela monta natural ou em procedimentos de inseminação artificial, também pode ocorrer e é importante na cadeia epidemiológica deste vírus (GOMES *et al.*, 2003).

Durante a infecção aguda primária do BoHV-1 altas concentrações virais são excretadas nos fluidos nasais durante 10 a 17 dias. Do quarto ao sexto dia ocorre um pico de eliminação viral (STRAUB, 1990).

O vírus se replica no trato respiratório causando alterações como rinite, laringite e traqueíte, destruindo as microvilosidades traqueais. A infecção por BoHV-

1 prejudica a resistência imunológica do animal levando a infecções bacterianas. Bactérias, especialmente aquelas pertencentes às espécies *Manheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* e *Haemophilus somnis*, se instalam no hospedeiro causando infecções secundárias (LEITE *et al.*, 2002).

As lesões podem se estender do trato nasal aos olhos, através do ducto nasolacrimal, causando conjuntivite e corrimento nasal. O vírus pode também penetrar nos tecidos cerebrais, a partir da mucosa nasal, e causar meningoencefalite. As alterações na placenta e feto podem resultar em aborto. Em bezerros, o vírus pode, ocasionalmente, causar doença sistêmica com alta taxa de mortalidade (YATES, 1982).

Nyaga & Mckercher (1980) demonstraram, por meio de testes *in vitro*, que o BoHV-1 pode infectar monócitos nos quais há replicação limitada do vírus. Além disso, o BoHV-1 é capaz de se adsorver a linfócitos e estes podem servir como veículos, desde que anticorpos neutralizantes não estejam presentes.

A disseminação sistêmica é obtida por meio da invasão de linfonodos e vasos linfáticos seguida por viremia associada aos linfócitos (CAMPOS *et al.*, 2010).

4.4. LATÊNCIA DO VÍRUS NO HOSPEDEIRO

Uma das características das herpesviroses é a capacidade do vírus de permanecer em estado de latência em gânglios periféricos (gânglios trigêmeos), sem se replicar, fazendo com que o animal persista infectado por toda a vida produtiva (ENQUIST *et al.*, 2002). Durante este período não são sintetizadas proteínas virais. Portanto, nestes animais o título de anticorpos neutralizantes tende a diminuir. O BoHV-1 também foi encontrado nos centros germinativos da tonsila faríngea, sangue periférico, linfonodos e baço (MWEENE *et al.*, 1996; FUCHS *et al.*, 1999; WINKLER *et al.*, 2000). Em casos de IPV/IPB o BoHV-1 foi detectado em gânglios espinhais sacrais (HOMAN & EASTERDAY, 1980). O BoHV-5 foi detectado no sistema nervoso central (principalmente no córtex olfatório, cerebelo, tálamo, mesencéfalo e ponte), na mucosa nasal e traqueal (MEYER *et al.*, 2001; PEREZ *et al.*, 2002; VOGEL *et al.*, 2003; HÜBNER *et al.*, 2005).

A reativação da forma latente pode ocorrer a partir de estímulos imunodepressivos, tais como estresse, transporte, tratamentos com glicocorticoides

e partos, resultando em excreção do vírus e aumento dos títulos de anticorpos neutralizantes (JONES, 2003).

4.5. ASPECTOS CLÍNICOS DAS INFECÇÕES ASSOCIADAS AO BOHV-1

As apresentações clínicas de infecções causadas pelo BoHV-1 podem estar associadas a manifestações dos tratos respiratório e genital. A doença é chamada de Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR), mas recebe diferentes denominações de acordo com o órgão infectado. Quando afeta a região genital de vacas é conhecida como Vulvovaginite Pustular Infecciosa (IPV), e nos machos recebe o nome de Balanopostite Pustular Infecciosa (IPB) (GIBBS & RWEYEMANN, 1977). A maioria das infecções associadas ao BoHV-1 e BoHV-5 são subclínicas e o grau de severidade da doença é influenciada por fatores como a virulência da cepa envolvida, *status* imunitário do hospedeiro, idade e presença de infecções bacterianas secundárias (KAASHOEK *et al.*, 1996).

4.5.1. Forma Respiratória da Doença

A IBR pode ocorrer nas formas subclínica, leve ou severa. A morbidade e mortalidade podem alcançar índices de 100% e 10%, respectivamente (D'ARCE *et al.*, 2002). Na forma classificada como leve, os sinais clínicos podem se restringir ao corrimento nasal e ocular. A forma clássica da doença é caracterizada por febre (40 a 42°C), inapetência, aumento da taxa respiratória, dispneia, tosse persistente, depressão e severa queda da produção de leite. O hálito do animal pode ser fétido, com respiração oral, salivação e um profundo ruído brônquico. Os casos agudos não complicados duram de cinco a 10 dias e os animais se recuperam rapidamente, mas permanecem como carreadores e disseminadores do vírus (TIKOO *et al.*, 1995). O aborto pode ser uma consequência da infecção respiratória pelo BoHV-1, dependendo das estruturas envolvidas e do período de gestação, por atravessar a barreira maternal-fetal, podendo ocasionar a morte do feto (HEINLEIN *et al.*, 1993; MILLER, *et al.*, 1995).

4.5.2. Forma Conjuntival da Doença

A conjuntivite pode ser uni ou bilateral e associada com lacrimejamento profundo. Os animais afetados podem apresentar fotofobia e eversão das pálpebras, mas a epífora é o sinal mais característico. Infecções bacterianas secundárias são comuns e o pus pode ser visto no corrimento lacrimal. A córnea normalmente não é afetada, mas se ocorrer simultaneamente infecção bacteriana, quadros de ceratite e ulceração corneal poderão causar lesão cicatricial deste órgão (HOMAN & EASTERDAY, 1980).

4.5.3. Forma Genital da Doença

A Vulvovaginite Pustular Infeciosa (IPV) geralmente se desenvolve de um a três dias após a cobertura. A micção frequente é o sinal mais característico. Os animais afetados apresentam febre, depressão e anorexia. A vulva apresenta-se inchada e hiperêmica com pequenas pústulas (1 a 2 mm de diâmetro), as quais coalescem para formar membranas fibrinosas amareladas, que gradualmente se descolam formando úlceras (TURIN & RUSSO, 2003).

A infecção bacteriana secundária é comum com graus variados de corrimentos purulentos. As lesões normalmente desaparecem de 10 a 14 dias após o estabelecimento da doença, mas alguns animais apresentam corrimento vaginal que persiste durante várias semanas (TURIN & RUSSO, 2003).

Inseminações artificiais com sêmen contaminado podem causar IPV, cervicite com corrimento mucopurulento e endometrite em vacas. Os abortos normalmente ocorrem dentro de quatro a sete meses da gestação após infecção natural ou vacinação (WEIBLEN *et al.*, 1989).

A Balanopostite Pustular Infeciosa (IPB) também se desenvolve após um período de incubação de um a três dias e lesões similares àsquelas do IPV se desenvolvem na mucosa peniana e prepúcio. As infecções secundárias também são frequentes. A resolução de casos não complicados ocorre dentro de 10 a 14 dias. No entanto, alguns animais podem perder a libido, ter dores durante a ereção e ejaculação e só se recuperam várias semanas após (WEIBLEN *et al.*, 1992).

4.6. ASPECTOS CLÍNICOS DAS INFECÇÕES ASSOCIADAS AO BoHV-5

O BoHV-5 é um dos principais agentes etiológicos virais associado à

meningoencefalite nesta espécie animal. No Brasil, devido ao Programa Nacional de Controle da Raiva em Herbívoros (PNCRH), são enviadas as amostras para exames histopatológicos e virológicos para diagnóstico da Encefalopatia Espongiforme Bovina (BSE) e de Raiva, respectivamente. Quando estas amostras são consideradas negativas para estas doenças as mesmas não são encaminhadas para a identificação de outros agentes etiológicos infecciosos como o BoHV-5. (SPILKI *et al.*, 2003).

4.6.1. Forma encefálica da doença

Os animais afetados apresentam inicialmente incoordenação a qual progride para ataxia. Também se observa depressão seguida por excitação caracterizada por tremores, andar cambaleante, movimentos circulares e subsequente queda com espasmos crônicos dos membros, pescoço, músculos lombares e opistótono. Por isolamento em cultivo de células e exame histopatológico também foi encontrado o BoHV-5 nas regiões do tálamo, mesencéfalo e ponte (VOGEL *et al.*, 2003).

A morte ocorre dentro de quatro dias a partir dos distúrbios neurológicos. O BoHV-5 foi detectado no sistema nervoso central na região do córtex olfatório e na região do cerebelo (MEYER *et al.*, 2001; PEREZ *et al.*, 2002).

4.7 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA INFECÇÃO EM BOVINOS NO MUNDO E NO BRASIL

O BoHV-1 está amplamente disseminado em rebanhos bovinos no mundo apresentando-se endemicamente em vários países (TABELA 1). Segundo dados da OIE, apenas a Áustria, Dinamarca, Finlândia, Suécia, Itália (província de Bolzano), Suíça e Noruega conseguiram erradicar este vírus, após a implantação de um rígido programa de erradicação com a eliminação de todos os animais portadores (OIE, 2012).

Programas de controle têm sido implantados na Austrália, Bélgica, Canadá, Índia, Polônia, Turquia e Estados Unidos. Na Grã-Bretanha e na Bélgica os percentuais de rebanhos soropositivos são de 40 a 50% e 62%, respectivamente (ACKERMANN *et al.*, 1990; NOODEGRAAF *et al.*, 2000; BOELAERT *et al.*, 2000).

4.7.1. BoHV-1

No Canadá, 59,5% dos rebanhos estão infectados apesar de contínuos programas imunoproliféricos (DURHAM & HASSARD, 1990).

Estudos da soroprevalência do BoHV-1 nos rebanhos Australianos têm mostrado índices de 15 a 96% (SMITH *et al.*, 1995).

Na África, Straub *et al.* (1990) verificaram a soroprevalência do BoHV-1 variando de 14 a 60%, enquanto nas Américas Central e do Sul esta percentagem é de 36 a 48%.

No Brasil, levantamentos sorológicos têm revelado uma ampla disseminação do BoHV-1 tanto em rebanhos de corte quanto de leite. No sul do país, em 36 anos de trabalho, foram realizadas 6021 necropsias de bovinos seguindo protocolos de necropsia e histopatologia, sendo que foram encontradas três doenças causadas por vírus em 175 dos casos: 151 de raiva (49,5%), 14 de meningoencefalite por herpesvírus (4,59%) e 10 de febre catarral maligna (3,28%) (SANCHES *et al.*, 2000).

Em 1981, no Estado de São Paulo, Mueller *et al.* observaram 42,2% de animais reagentes. Gatti *et al.* (2010) avaliaram os títulos de anticorpos anti-BoHV-1 de bezerras em três rebanhos leiteiros do estado de São Paulo. As amostras de soro, colhidas de animais de zero a 12 meses de idade, foram submetidas ao teste de vírus-neutralização. Naqueles rebanhos com baixa prevalência de BoHV-1, não houve diferença nos títulos de anticorpos entre bezerras de vacas vacinadas e não vacinadas. Nos rebanhos com média e alta prevalências, os títulos foram mais elevados nas bezerras nascidas de vacas positivas e vacinadas.

No Estado de Minas Gerais, três trabalhos avaliam a soroprevalência no rebanho e esta varia de 27 a 66% (ANUNCIAÇÃO *et al.*, 1989, MÉDICE *et al.*, 2000).

No Rio Grande do Sul foram descritas taxas de soropositividade em 81,7% e 71,3% para BoHV-1, nos anos de 1989 e 1995, respectivamente (RAVAZZOLO *et al.*, 1989; VIDOR *et al.*, 1995). Em 2009, Holz *et al.* analisaram 2200 soros pela técnica de soroneutralização, provenientes de 390 propriedades distribuídas em 158 municípios deste estado. Apenas 47 (0,18%) amostras foram sororreagentes para o BoHV-1.

4.7.2 BoHV-5

Holz *et al.* (2009) verificaram a soroprevalência do BoHV-5 em 158 municípios do estado do Rio Grande do Sul. Foram examinados 2.200 soros empregando a técnica de soroneutralização frente a duas diferentes cepas virais. Entre os soros avaliados, 104 (4,7%) amostras foram sororreagentes.

No Paraná, Barros Filho *et al.* (1997) verificaram a soroprevalência do BoHV-1 em casos de IBR. Entre os 240 animais avaliados 65 (27%) foram sororreagentes pelo método de ELISA. No mesmo estado, Médici *et al.* (2000) relataram que 90,5% dos rebanhos leiteiros soropositivos. Em rebanhos de corte a frequência foi de 100%.

4.8. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico laboratorial das infecções pelo BoHV-1 e BoHV-5 pode ser realizado por testes imunológicos que detectam o vírus, componentes virais, bem como anticorpos específicos. Embora a etiologia destas infecções possa ser definida por meio do isolamento viral ou da detecção do DNA pelas técnicas de reação da polimerase em cadeia (PCR), hibridização do ácido nucleico e sequenciamento, estas metodologias exigem uma estrutura laboratorial específica para o processamento das amostras suspeitas. Para as herpesviroses, infelizmente, não há *kits* de testes rápidos disponíveis para o diagnóstico a campo.

4.8.1. Isolamento do Vírus em Cultivo de Células

As amostras enviadas para o diagnóstico laboratorial visando o isolamento dos herpesvírus podem ser obtidas a partir de *swabs* nasais, conjuntivais e vaginais, lavado prepucial, cotilédones placentários de fetos abortados, fígado fetal, pulmão, baço, rins, linfonodos, membranas mucosas do trato respiratório e tonsilas. Estas amostras devem ser colhidas e encaminhadas ao laboratório em meio de transporte adequado (HOMAN *et al.*, 1980). Sêmen fresco ou criopreservado também pode ser colhido para isolamento viral (MEYER *et al.*, 2001).

A maioria dos herpesvírus pode ser isolado em cultivo de células primárias ou secundárias bem como podem ser isolados em linhagens contínuas de células tais como *Madin-Darby Bovine Kidney* (MDBK).

A presença dos BoHV-1 e BoHV-5 é detectada no cultivo celular pelo efeito citopático que geralmente aparece de três a cinco dias pós-inoculação. São visualizados agrupamentos semelhantes a cachos de uva contendo células arredondadas.

4.8.2 Histopatologia

No exame histopatológico pesquisam-se inclusões intranucleares em células epiteliais, especialmente em material de biópsia vaginal, colhido nos estágios iniciais da IPV. Estas inclusões estão também presentes em encéfalo de casos com acometimento neurológico e tecidos de fetos abortados. Uma vez que estas inclusões são transitórias, o uso do exame histopatológico tem um valor limitado (TURIN & RUSSO, 2003).

4.8.3. Testes sorológicos

Os testes sorológicos detectam o aumento dos títulos de anticorpos entre as fases aguda e convalescente da infecção. As respostas imunes primárias são caracterizadas por aumento de IgM e IgG após a infecção. As respostas secundárias estão associadas à detecção de anticorpos IgG2 (TURIN *et al.*, 1999). Amostras de soros pareados indicam infecções recentes, tendo em vista que a resposta humoral se desenvolve duas a três semanas após a infecção.

As técnicas utilizadas para este tipo de diagnóstico são hemaglutinação passiva, fixação de complemento, imunoperoxidase, imunofluorescência, soroneutralização e testes imunoenzimáticos (ELISA) (GIBBS & RWEYEMAMU, 1977). O teste de ELISA indireto utiliza o vírus purificado e detecta anticorpos contra as proteínas do envelope e do capsídeo. Neste teste é possível utilizar a Avidina-Biotina visando o aumento de sua especificidade. O ELISA competitivo pode empregar anticorpos monoclonais contra as glicoproteínas presentes no envelope viral (NANDI *et al.*, 2007).

Os testes de ensaios imunoenzimáticos são práticos, específicos e devem ser altamente sensíveis para a detecção de infecções iniciais, cujos títulos humorais são geralmente baixos.

Os anticorpos monoclonais (AcMc) são produtos imunobiológicos que têm sido usados para o desenvolvimento de teste diferenciais entre BoHV-1 e BoHV-5 por serem altamente específicos (D'ARCE *et al.*, 2002; SÁ e SILVA *et al.*, 2007). Bauermann *et al.* (2010) padronizaram um teste de ELISA para diferenciação ou homologia entre o BoHV-1 e BoHV-5, com base em AcMc pela detecção de anticorpos séricos.

O teste de soroneutralização é considerado o padrão para detecção de anticorpos neutralizantes contra o BoHV-1 e BoHV-5, embora não os diferencie (ROEHE *et al.*, 1997). No entanto, em relação aos testes imunoenzimáticos, é uma técnica mais onerosa devido à necessidade de manutenção de linhagens celulares, além da baixa sensibilidade (PERRIN *et al.*, 1993; KRAMPS *et al.*, 1994).

Em 1996, Kramps *et al.* demonstraram dissonâncias em relação aos resultados dos testes de soroneutralização, ELISA e imunofluorescência, sugerindo a padronização de testes sorológicos para detecção de anticorpos para o BoHV-1. Estes testes imunoenzimáticos têm limitações para diferenciar animais expostos aos vírus daqueles vacinados em propriedades que adotam sistematicamente a profilaxia (BAUERMANN *et al.*, 2010).

4.8.4. Diagnósticos baseados na identificação dos genomas

Técnicas que visam a detecção de DNA passaram a ser possíveis na identificação de tipos e/ou subtipos de herpesvírus. Técnicas como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) seguida da Análise de Restrição Enzimática (REA) e sequenciamento dos genomas virais vêm auxiliando a identificação e os estudos epidemiológicos subsequentes aos focos da infecção (ROS & BELAK, 1999; ESTEVES *et al.*, 2008).

Em estudo realizado com 26 amostras clínicas de doenças neurológicas isoladas de bovinos no sudeste do Brasil, Argentina e Uruguai, no período de 1987 a 2007, empregou-se a técnica de PCR para identificar BoHV-1 e BoHV-5. Em 21 (80,7%) das amostras foram isolados BoHV-5 e em cinco (19,3%) amostras o vírus BoHV-1 (RISSI *et al.*, 2008).

Também foi desenvolvida técnica de PCR multiplex para confirmar o gene da glicoproteína C (gC) em fragmentos do sistema nervoso central (SNC) para o BoHV-5. Foram avaliadas 47 amostras de cérebro de bovinos com sinais clínicos de meningoencefalite, colhidas de 31 rebanhos dos estados do Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Rondônia. Em apenas 18 delas foi possível isolar o vírus, enquanto a técnica de PCR multiplex revelou a presença do genoma viral em 30 amostras (CLAUS *et al.*, 2007).

Em Santa Catarina foram comparadas filogeneticamente 28 cepas de herpesvírus bovino isoladas de diferentes apresentações clínicas. Usando a técnica de PCR com *primers* para os genes da glicoproteína C (gC) e sequenciamento dos DNAs, os autores foram capazes de diferenciar tipos e subtipos desses agentes virais (ESTEVEZ *et al.*, 2008). Os autores sugerem que um número maior de cepas virais, provenientes de animais de diferentes regiões do Brasil, devam ser analisadas para comprovar a eficiência destas ferramentas moleculares.

Visando diferenciar os dois tipos virais (BoHV-1 e BoHV-5) foi realizada a PCR seguida de sequenciamento da glicoproteína C (gC). A análise de pareamento de nucleotídeos mostrou uma similaridade de 88,3 a 92% entre os dois vírus. Os autores verificaram que nem sempre a patologia está associada às respectivas síndromes clínicas e podem ser causadas por outros tipos de vírus (SÁ e SILVA *et al.*, 2007; ESTEVEZ *et al.*, 2008).

Em Cuba, amostras de vírus foram isoladas e caracterizadas por REA usando as enzimas de restrição *HindIII*, *HpaI*, *PstI* e *SfiI* e demonstram que a cepa circulante no país é similar com as cepas presentes na Europa (MEDINA *et al.*, 2010).

Na Argentina, um estudo de revisão com enfoque nas características genômicas, patológicas e epidemiológicas do BoHV-5 mostrou que este tipo está muito mais presente na América do Sul do que na Europa, Estados Unidos ou outros continentes (ZAJAC *et al.*, 2010).

A construção de genes para a expressão de proteínas recombinantes em *E.coli*, especialmente as glicoproteínas do envelope viral, tem sido utilizada para a produção de insumos para diagnóstico das herpesviroses (OTSUKA & XUAN, 1996; DONOFRIO *et al.*, 2006).

Na Alemanha, Schumann *et al.* (2004) mostraram que vários fatores podem interferir na expressão das proteínas, tais como a definição de vetores a serem utilizados e o planejamento para otimização do sistema de expressão em *E. coli*.

Na Bélgica, foi construída uma proteína recombinante interespecífica de uma região homóloga de um ponto comum e crucial da sequência dos ácidos nucleicos entre o BoHV-1 e 5. Este antígeno, segundo os autores, possibilita a identificação em casos de coinfeção dos herpesvírus, evidenciando o potencial para testes de diagnóstico de herpesvírus (MEURENS *et al.*, 2004).

CAPÍTULO II

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE DUAS AMOSTRAS DE VÍRUS ISOLADAS DE BOVINOS NO ESTADO DO PARANÁ

Tânia Regina Penha^{1,5}, Ernesto R. Kruger², Paulo M. Roehé^{3,4}, Samuel P. Cibulski³, Ana C. Murterle³, Jorge V.B. Agottani¹, Cybelle Souza,⁵ Vanete Thomaz-Soccol^{6*}

1. Instituto de Tecnologia do Paraná;
 2. Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti;
 3. Instituto de Pesquisa Veterinária Desidério Finamor;
 4. Universidade Federal do Rio Grande do Sul;
 5. Universidade Federal do Paraná;
 6. Programa de Doutorado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.
- * Autor para Correspondência

RESUMO

As infecções pelos herpesvirus em bovinos representam uma grande preocupação devido às perdas decorrente das doenças associadas a estes agentes virais. Os herpesvírus de origem bovina dos tipos 1 (BoHV-1) e 5 (BoHV-5) compartilham características genéticas e antigênicas que só podem ser diferenciadas por meio de técnicas moleculares. O objetivo do presente estudo foi identificar duas cepas (A e B) isoladas de casos clínicos por meio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), amplificando o gene responsável pela expressão da glicoproteína C (gC), seguida da análise de enzima de restrição (REA) utilizando a enzima *Bgl*I. Os isolados também foram submetidos ao sequenciamento dos fragmentos amplificados os quais foram comparados com 27 de cepas virais depositadas no GenBank. Os amplicons obtidos para as amostras A e B apresentaram bandas cujos tamanhos se situaram em torno de 572 a 575 pb, respectivamente. Quando submetida à REA, a amostra B apresentou dois fragmentos após a digestão enzimática, sendo o primeiro com 333 pb e o segundo com 239 pb. A amostra A não foi clivada, mantendo um único fragmento de aproximadamente 572 pb. O sequenciamento parcial dos genes da gC indicou 572 nucleotídeos para a amostra A e 575 nucleotídeos para a amostra B. Tais resultados indicaram que a amostra A foi compatível com a cepa BoHV-1, do subtipo 1.1 com homologias de 96,7% e 94,1% com a cepa uruguaia UY2004 e com a cepa americana COOPER, respectivamente. Em relação à amostra B, a mesma se agrupou com cepas pertencentes ao BoHV-5, apresentando homologia de 86,9% com a cepa americana P160-BRA/RJ. Os resultados deste estudo revelaram a importância da identificação molecular das cepas de herpesvírus bovinas visando estudos epidemiológicos regionais.

Palavras Chave: BoHV-1, BoHV-5, Glicoproteína C, REA, PCR.

1 INTRODUÇÃO

A espécie bovina é suscetível a diferentes agentes infecciosos, tais como bactérias, fungos e vírus (SILVA *et al.*, 2008). Entre os agentes virais as infecções pelos herpesvírus têm sido detectadas principalmente por métodos sorológicos, os quais foram realizados em diversos países do mundo (DURHAM & HASSARD, 1990; BOELAERT *et al.*, 2000; GALIERO *et al.*, 2001; NANDI *et al.*, 2009). As taxas de infecção na África e América Central variam de 14 a 60% e 36 a 48%, respectivamente (SUZAN *et al.*, 1983; MAHMOUD *et al.*, 2009). A taxa de soroprevalência no Brasil varia de 20 a 100% nos rebanhos leiteiros e de corte trazendo preocupação com o prejuízo econômico e bem estar animal tendo em vista o quadro debilitante associado a esta virose (VIDOR, 1995; MÉDICCI *et al.*, 2000; MOREIRA *et al.*, 2001; HOLZ *et al.*, 2009). Os herpesvírus tipo 1 (BoHV-1) e 5 (BoHV-5) estão comumente associados a esta espécie animal. O primeiro afeta o trato respiratório e genital, acarretando doenças conhecidas como Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR) e Balanopostite Infecciosa Pustular (IPB)/Vulvovaginite Infecciosa Pustular (IPV). O BoHV-1 e 5 também podem ser agentes etiológicos de distúrbios nervosos quando em animais jovens (RISSI *et al.*, 2008).

Apesar dos levantamentos epidemiológicos baseados na presença de anticorpos indicarem a infecção, apenas o isolamento viral e a subsequente identificação da cepa, usando técnicas moleculares, poderão revelar o tipo e/ou subtipo presente nos rebanhos.

Nos casos de suspeita clínica de infecções nos tratos respiratórios e reprodutivos, geralmente são encaminhadas amostras apenas para o isolamento de agentes etiológicos bacterianos, subestimando o envolvimento de agentes virais.

Encéfalos de animais com apresentação clínica de distúrbio neurológico são submetidos a exames virológicos e histopatológicos visando os diagnósticos da raiva e da encefalopatia espongiiforme bovina (BSE), respectivamente (SPILKI *et al.*, 2003).

No entanto, resultados negativos para estas duas enfermidades não são investigados quanto à presença de herpesvírus ou de outros agentes infecciosos na massa encefálica.

O objetivo deste trabalho é caracterizar molecularmente duas amostras de

vírus: uma isolada de amostra de encéfalo negativa para Raiva e outra isolada de placenta para diagnóstico diferencial de aborto infeccioso.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ORIGEM DAS AMOSTRAS

As amostras clínicas denominadas A e B, provenientes de uma propriedade rural no Estado do Paraná, foram colhidas a partir de um caso de aborto em vaca e de um caso de distúrbio neurológico em bovino (suspeito de raiva), respectivamente, encaminhadas ao Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti (CDME). As duas amostras eram provenientes de animais nativos no Estado do Paraná.

2.2 ISOLAMENTO VIRAL

As amostras foram submetidas ao isolamento viral em cultivo de células primárias de traqueia de feto bovino (Traç FB) para verificação de efeito citopático. As duas cepas virais isoladas no CDME foram cedidas ao Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR) para um novo isolamento viral e caracterização genética das mesmas.

Estas células foram cultivadas em meio 199/HAM F10 (ANEXO I - 1) em garrafas T25, T75, T150 e *roller*. As mesmas foram incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ de acordo com Theodoridis (1985) e acompanhadas durante um período de 10-12 dias para a observação dos efeitos citopáticos e posterior extração do DNA viral.

Quando 80 a 90% das células apresentavam efeito citopático o material foi recolhido e centrifugado a baixa rotação 800 xg. O sobrenadante foi centrifugado a 10.000 xg por duas horas em gradiente de sacarose 30% (ANEXO I – 5).

2.3 EXTRAÇÃO DO DNA VIRAL

Para a extração do material genético de cada um dos isolados foi utilizado o *kit* Bioscience *AxyPrep* DNA/RNA viral Miniprep (Axygen). Após a extração do DNA,

este material foi concentrado usando 1.500 μL de etanol 70% (ANEXO I - 3), 30 μL de acetato de sódio 3 M (ANEXO I - 4) e mantido a 4°C por 16 horas.

A seguir o material foi centrifugado a 3.700 xg durante 20 minutos. O sobrenadante foi dispensado e o precipitado colocado em estufa a 56°C durante 10 minutos para secagem. A ressuspensão do precipitado foi realizada com 86 μL de água purificada. Os *kits* GFX (GE Healthcare) e Qubit dsDNA HS Assay (Invitrogen) foram utilizados, para a purificação e quantificação do DNA extraído, respectivamente.

2.4 REAÇÃO DA POLIMERASE EM CADEIA (PCR)

Para desenho dos oligonucleotídeos iniciadores ou *primers*, as sequências de herpesvírus foram acessadas no Genbank (acessos Z49223 e Z49224). Os *primers* foram desenhados com base nas sequências de genes das glicoproteínas C de regiões conservadas dos genomas de BoHV-1 e BoHV-5. A sequência do *Primer Reverse* usada foi 5' – C G C C G C C G A G T A C T A C C C - 3' e para *Forward* (2) 5' - C G G C C A C G A C G C T G A C G A - 3', para identificação dos fragmentos com 575 pb (nucleotídeos 873-1447) e fragmentos com 572 pb (nucleotídeos 813-1384) (ESTEVES, 2007).

Foram utilizados 45 μL de Taq platinum supermix (Invitrogen cat.11.306.161 ot. XM681) e para completar o mix foram adicionados: 3 μL de *primers* R e F contendo 15 pmol/mL (ANEXO I - 6); 40 ng de DNA em 5 μL ; 5 μL de DMSO (ANEXO I - 7) e 5 μL de água ultra pura, obtendo-se um volume total de 61 μL .

A amplificação foi feita em termociclador e consistiu em desnaturação inicial a 94°C por cinco minutos, seguido de 35 ciclos de um minuto de desnaturação a 94°C, um minuto para anelamento a 62°C e um minuto para extensão a 72°C. Foi acrescentada uma extensão final por cinco minutos a 72°C.

O produto da amplificação foi avaliado por eletroforese em gel de agarose 1% (Sigma) (ANEXO I - 8) em tampão TBE (ANEXO I - 9) com 2 μL de *loading* (ANEXO I - 10) em cuba horizontal a 90V por duas horas. O marcador de massa molecular utilizado foi DNA Ladder (Invitrogen) com 100 pb (ANEXO I - 11). Após a corrida eletroforética, o gel foi colocado em solução de revelação em brometo de etídio (ANEXO I - 12) por 30 minutos e o fragmento visualizado e fotodocumentado (SAMBROOK & RUSSELL, 2001).

2.5 ANÁLISE COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO (REA)

O produto da PCR também foi utilizado para a análise com a enzima de restrição *Bgl*I. Foram utilizados 5,5 µL de água purificada, 0,5 µL de enzima *Bgl*I (New England Biolabs), 1 µL de tampão de diluição da enzima 10x e 3 µL do produto amplificado (ESTEVES, 2007). A seguir, foi incubado em banho-maria a 37°C por duas horas. A eletroforese foi realizada em gel de agarose 2% (ANEXO I - 13) em tampão TBE (ANEXO I - 9), em cuba de horizontal, adicionando 1 µL de tampão de amostra GLB (Invitrogen) de alta concentração, 7 µL da amostra clivada. O marcador de massa molecular foi de 100 pb (Invitrogen) (ANEXO I - 11). Para coloração do fragmento do DNA amplificado foi acrescentado no gel 1 µL de brometo de etídio (ANEXO I - 12). A corrida eletroforética foi realizada em tampão TBE (ANEXO I - 9) em corrente de 70 mA durante 60 minutos. Os fragmentos de DNA foram visualizados e fotodocumentados.

2.6 SEQUENCIAMENTO

Os fragmentos do DNA genômico amplificado por PCR foram purificados e sua qualidade conferida por eletroforese em gel de agarose a 1% (ANEXO I - 8). Depois de purificadas, as amostras foram preparadas individualmente com o *kit* DYEenamic ET Terminators (GE Healthcare, Giles, United Kingdom) e sequenciadas em sequenciador automático MegaBACE 500 (GE Healthcare) na ACTgene Análises Moleculares Ltda. Cada produto foi submetido ao sequenciamento em ambas as direções usando os mesmos *primers* utilizados para PCR (ESTEVES, 2007).

2.7 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS

A qualidade dos fragmentos sequenciados foi avaliada usando o programa BioEdit 7.0.5 (HALL, 1999). As sequências foram manualmente alinhadas no programa CLUSTAL W (THOMPSON *et al.*, 1994) e submetidas ao programa Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para confirmação dos resultados. Os dados foram analisados no programa MEGA “Molecular Evolutionary Genetics” versão 5 (KUMAR *et al.*, 2004) com base na análise do método de “neighbor-joining” (SAITOU

& NEI, 1987; ESTEVES, 2007). O Fluxograma das etapas descritas nos itens 2.1 a 2.6 está demonstrado no material e métodos (ANEXO II).

3 RESULTADOS

A técnica de PCR permitiu a amplificação dos fragmentos alvos nas amostras isoladas A e B. Os tamanhos das bandas obtidas situaram-se em torno de 572 a 575 pb, como esperado (ESTEVES, 2007) (FIGURA 3).

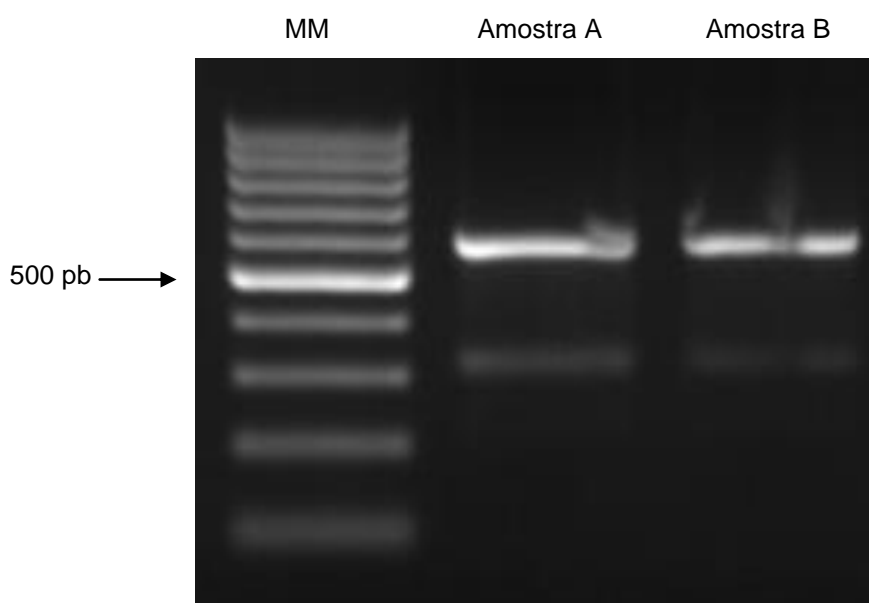


FIGURA 3 - PRODUTOS DA AMPLIFICAÇÃO POR PCR DO FRAGMENTO DO GENE gC DAS AMOSTRAS VIRAIS A E B ANALISADAS
FONTE: O Autor (2012)

NOTA: MM - Marcador de massa molecular 100 pb

A restrição enzimática do produto de PCR utilizando a enzima *Bgl*I permitiu demonstrar a diferença entre os isolados (FIGURA 4).

A amostra A não foi digerida pela enzima *Bgl*I, portanto, manteve um único fragmento de aproximadamente 572 pb característica do vírus BoHV-1 (ESTEVES, 2007).

Na amostra B verificaram-se dois fragmentos após digestão com a enzima *Bgl*I, sendo o primeiro com 333 pb e o segundo com 239 pb. Tal perfil é esperado em amostras de BoHV-5 (ESTEVES, 2007) (FIGURA 4).

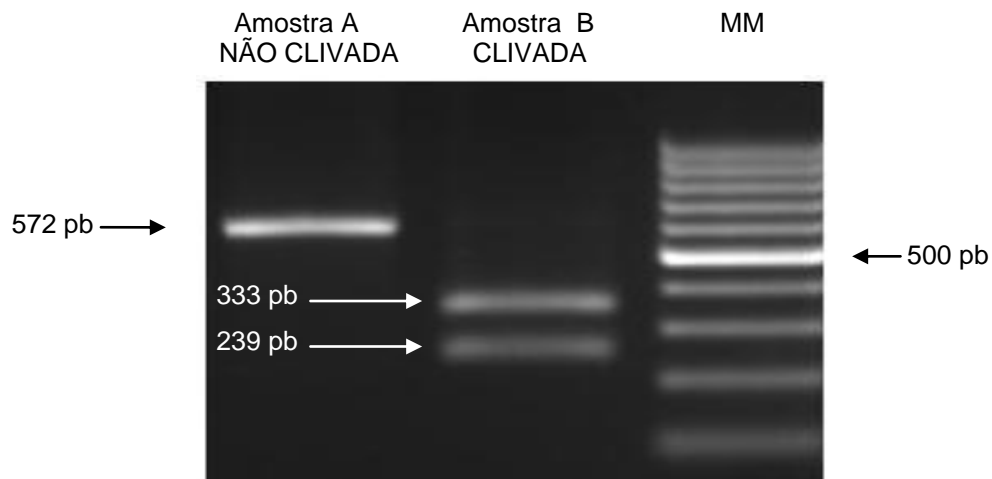


FIGURA 4 - PRODUTO DA PCR CLIVADO COM A ENZIMA *BglI*
 FONTE: O Autor (2012)
 NOTA: MM - Marcador de massa molecular 100 pb

Os genes da gC das amostras virais A e B foram parcialmente sequenciados. Os comprimentos destas regiões são de 572 nucleotídeos para a amostra A de 575 nucleotídeos para a amostra B (FIGURA 5).

<p>Amostra A</p> <p>CACGCGCCTGCACTGGTTCCGCAACGGCTACCCCGTGGAGGCTCGGCACGCGCGGACGCTCTTTACGGTCGACGACTCC GGGCTCTTTTCGCGCACGTCCGTCTTACGCTCGAGGACGCGACGCCAACCGCCACCCGCCAACCTGCGCTGCGACG TCTCCTGGTTCAGAGCGCTAACATGGAGCGCCGCTTTTACGCGGCTGGCACGCCGGCCGTTTACCGCCCGCCGAGCT GCGCGTGTACTTCGAGGGCGGCGAGGCCGTCTGCGAGGCGCGCTGCGTCCCCGAGGGGCGCGTCTCCCTGCGCTGGAC GGTGCGGACGGCATCGCCCCGTCGCGCACTGAGCAGACCGGCGTCTGCGCCGAGCGGCCGGGCTGGTAAACCTGCG CGGCGTGCGCCTGCTTTCTACAACCGACGGGCCCGTCTGACTACACCTGCACCGCCACTGGCTACCCGGCACCGCTGCC GAGTTCTCCGCGACCGCCACGTACGACGCCTCGCCCGCCTAATC</p> <p>Amostra B</p> <p>ACGGCTACCCCGTGGAGGCTCGGCACGCGCGGACGCTCTTTACGGTCGACGACTCCGGGCTCTTTTCGCGCACGTCCGT CCTCACGCTCGAGGACGCGACGCCAACCGCCACCCGCCAACCTGCGCTGCGAGGTTTCTGGTTCAGAGCGCCGAC GTGGAGCGCCGCTTCGCCGCGGCTGCCACGCCGGCCGTCTACCGCCCGCCGAGCTGCGCGTGTCTTCGAGGGCGGC GAGGCTGTCTGCGAGGCGCGCTGCGTCCCCGAGCGCTCTCCCTGCGCTGGACGGTGCAGCGCGCCGCGCCCTCG CGCACCGAGCAGAGCGGCTGCGCTGAGCGGCTGGGCTGGTGAACATGCGCGGCTGCGCCTGCTCTCCGCGATA GACGGGCCCGTCTGACTACACCTGCACTGCCACCGGCTACCCGGCGCCGCTGCCCGAGTTCTCCGCGACCGCCACACAG ACGCCTCGCCAGCCTGATCG</p>
--

FIGURA 5 – SEQUÊNCIA DE DNA DO GENE gC DAS AMOSTRAS ANALISADAS

FONTE: O autor (2012)

As sequências dos genes da gC das amostras investigadas, quando comparadas aos nucleotídeos dos BoHV-1 e BoHV-5 já depositados no GenBank, mostraram alto grau de identidade entre os dois herpesvírus analisados. A árvore construída a partir destas sequências mostrou a presença de dois grupos: BoHV-1 e subtipo 1.1 e outro contendo BoHV-5 (FIGURA 6).

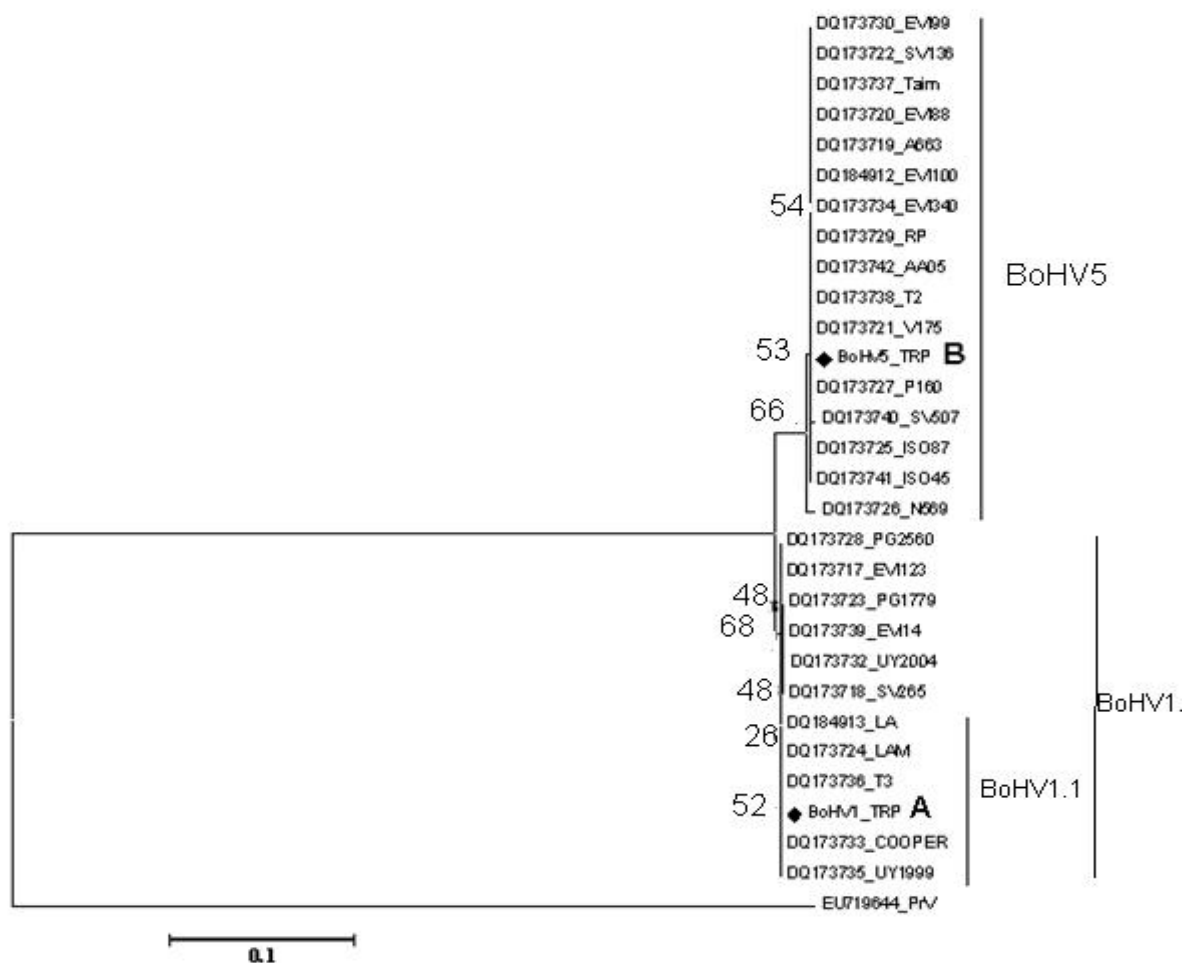


FIGURA 6 – COMPARAÇÃO DA SEQUÊNCIA DOS GENES DA gC.

FONTE: O Autor (2012)

NOTA: A comparação foi realizada entre duas amostras de herpesvírus de bovinos isoladas no Estado do Paraná, com outras cepas depositadas no genbank para o BOHV-1 e BOHV-5. As amostras nominadas A e B estão demonstradas na árvore como ◆BoHV1_TRP A e ◆BoHV5_TRP B, respectivamente. A análise comparativa foi feita com base na análise de neighbor-joining.

Os resultados da sequência de nucleotídeos revelaram que a amostra A está relacionada à cepa de BoHV-1 de diferentes origens de sequências depositadas no GenBank com homologia de 96,7% demonstrando maior identidade com a cepa uruguaia UY2004 (GenBank 173732). Em relação ao subtipo 1.1 houve maior homologia (94,1%) com a cepa americana COOPER (GenBank 173733) (QUADRO 1).

Em relação à amostra B, a mesma se agrupou com cepas pertencentes ao BoHV-5, apresentando homologia de 86,9% com a cepa americana P160-BRA/RJ (GenBank 173727) isolada no Rio de Janeiro (QUADRO 1).

Cepa	Número de acesso (DQ) – País - Ref.	Amostra A	Amostra B
BoHV-1-1.1	184913 LA - USA - Madin et al., 1956	90,6	79,7
	173724 LAM- HOL - van Engelenburg et al., 1994	91,9	85,9
	173736 T3 – URU – FVURU ^a	89,1	81,1
	173733 COOPER - USA - Madin et al., 1956	94,1	89,6
	173735 UY1999 - URU - Alonzo et al., 2002	91,1	88,1
BoHV-1	173728 PG2560 - BRA /RS – IPVDF ^b	90,1	85,6
	173717 EVI123 - BRA/RS - Souza et al., 2002	92,6	83,0
	173723 PG1779 - BRA /RS – IPVDF ^b	95,7	85,2
	173732 UY2004 - URU – FVURU ^a	96,7	84,3
	173718 SV265 - BRA – UFSM ^c	95,6	82,5
	173739 EVI14 - BRA/RS - Souza et al., 2002	93,6	80,4
BoHV-5	173727 P160 - BRA/RJ - Souza et al., 2002	86,9	92,2
	173721 V175 - BRA - Esmeraldino, 1996	85,6	88,4
	173725 ISO87 - BRA/SP - Souza et al., 2002	88,2	90,3
	173738 T2 - URU – FVURU ^a	85,4	90,7
	173742 AA05 - BRA/MS - Souza et al., 2002	69,0	78,8
	173729 RP - BRA/RS - Souza et al., 2002	86,0	88,2
	173740 SV507 - BRA/RS - Delhon et al., 2003	84,4	87,2
	173734 EVI340 - BRA/MS - Souza et al., 2002	85,1	87,3
	184912 EVI100 - BRA/RS - Souza et al., 2002	84,2	86,4
	173719 A663 - ARG - Carrillo et al., 1983	84,3	86,5
	173741 ISO45 - BRA/MG - Souza et al., 2002	80,4	82,2
	173720 EVI88 - BRA/RS - Souza et al., 2002	79,7	81,9
	173737 TAIM - BRA/RS - Souza et al., 2002	83,6	85,8
	173730 EVI99 - BRA/RS - Souza et al., 2002	83,7	85,9
	173722 SV136 - BRA /RS - Souza et al., 2002	86,2	88,4
	173726 N569 - AUS - Brake & Studdert, 1985	83,0	84,6
<p>a- Faculdade del Veterinaria/ Universidad de La republica Del Uruguay. b- Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, Brasil/RS. c- Universidade Federal de Santa Maria, Brasil/RS.</p>			
Médias aritméticas de homologia			
		BoHV-1	BoHV-5
Amostras	A	Xxx	83,5%
	B	84,1%	Xxx

QUADRO 1 - HOMOLOGIA ENTRE ISOLADOS DE HERPESVÍRUS BOVINO (AMOSTRAS A E B) EM COMPARAÇÃO COM SEQUÊNCIA DAS CEPAS DO VÍRUS DEPOSITADAS NO GENBANK, UTILIZANDO O PROGRAMA BLAST PARA ANÁLISE.
FONTE: O Autor (2012)

4 DISCUSSÃO

As infecções causadas pelos herpesvírus bovinos tipos 1 (BoHV-1) e 5 (BoHV-5) vêm sendo descritas no Brasil e em outros países da América do Sul, América do Norte, Europa e Índia (ALFIERI *et al.*, 1998; TAKIUCHI *et al.*, 2001; CLAUS *et al.*, 2007; HOLZ *et al.*, 2009; NANDI *et al.*, 2009). Tais infecções podem estar associadas a doenças conhecidas como IBR, IPV/IPB, bem como abortos e distúrbios neurológicos provocando perdas econômicas tanto na bovinocultura leiteira quanto na de corte (NANDI *et al.*, 2009).

Apesar da similaridade entre os materiais genéticos do BoHV-1 e BoHV-5, aproximadamente 18% do genoma corresponde a regiões não conservadas que explicam as diferenças moleculares e antigênicas (ROEHE *et al.*, 1997; DELHON *et al.*, 2003). Uma dessas regiões corresponde ao gene da glicoproteína C (gC) a qual faz parte da estrutura do envelope, sendo responsável pelas funções de adsorção e fusão durante a infecção (JONES *et al.*, 2008). O alto grau de variabilidade da sua região N-terminal permite utilizá-la para a diferenciação das cepas de herpesvírus por meio de técnicas moleculares (ESTEVES *et al.*, 2007). A análise de restrição enzimática (REA) é uma das ferramentas que tem sido empregada para diferenciação de tipos e subtipos de herpesvírus bovino (D'ARCE *et al.*, 2002).

Neste estudo foram utilizadas as técnicas de PCR e REA para a análise de duas amostras (A e B) provenientes de bovinos com suspeita de infecções pelo herpesvírus. A técnica de PCR permitiu a amplificação dos fragmentos alvo revelando bandas com tamanhos que se situaram em torno de 572 a 575 pb para as amostras A e B, respectivamente. Esteves *et al.* (2008) amplificaram os genes da glicoproteína C do BoHV-1 e BoHV-5 de 23 cepas sul americanas e obtiveram bandas em torno de 388 a 567 pb revelando um alto grau de identidade entre as cepas analisadas. Em relação à REA, utilizando a enzima *BglI*, a amostra A não foi clivada, portanto manteve o fragmento de 575 pb, o qual mostrou-se compatível com o BoHV-1. A amostra B foi clivada em dois fragmentos de 333 pb e 239 pb, correspondendo ao BoHV-5. Tais padrões demonstraram que a REA permitiu a diferenciação de ambas das amostras A e B. D'Arce *et al.* (2002) investigaram 12 isolados brasileiros e três cepas de referência de herpesvírus bovino por meio da técnica de REA empregando *BamHI*, *BstEII*, *EcoRI*, *HindIII* e *PstI*. Todas as enzimas

tiveram a capacidade de diferenciar o BoHV-1 do BoHV-5. No entanto, os subtipos não foram identificados pelas enzimas *Bam*HI, *Eco*RI e *Pst*I. Além disso, os autores verificaram que a *Bst*EII foi a única enzima capaz de distinguir os subtipos do BoHV-5.

Em relação ao sequenciamento parcial de uma região conservada do gene da gC do BoHV-1 e BoHV-5 foram obtidos fragmentos cujos tamanhos variaram 426 a 572 nucleotídeos e 410 a 575 nucleotídeos para as amostras A e B, respectivamente. Ao analisar uma região parcialmente sequenciada da gC de cepas de BoHV-1 e BoHV-5, Esteves *et al.*(2008) obtiveram tamanhos que variaram entre 388 a 565 nucleotídeos. Tais discrepâncias de resultados podem estar relacionadas à origem geográfica das cepas investigadas neste estudo.

A análise filogenética baseada na sequência de nucleotídeos dos genes da gC da amostra A mostrou ser compatível com tipo BoHV-1 e subtipo BoHV-1.1 apresentando, respectivamente, similaridade com a cepa uruguaia UY2004 (96,7%) e com a cepa americana COOPER (94,1%). Com relação à amostra B houve maior homologia com a cepa americana P160BRA/RJ, isolada no Brasil, apresentando um índice de 92,2% compatível com o tipo BoHV-5. No Rio Grande do Sul, Esteves *et al.* (2008), ao investigarem 28 cepas de herpesvírus e verificaram que 12 delas pertenceram ao BoHV-1 e a dois diferentes *clusters*: um relacionado ao BoHV-1. 1 e o outro ao BoHV-1.2. Entre as cepas de BoHV-5, de origem sul americana estas estiveram mais estreitamente relacionadas à cepa australiana N569.

A partir dos resultados obtidos neste estudo, empregando técnicas moleculares, foi possível identificar as amostras como BoHV-1, pertencente ao subtipo 1.1, e BoHV-5. No entanto, a escassez de dados referentes ao isolamento e caracterização das cepas provenientes do Estado do Paraná, revela a necessidade de uma maior preocupação com a real prevalência destas infecções nos rebanhos bovinos.

5 CONCLUSÃO

A amostra A, isolada de caso clínico de aborto, foi caracterizada por PCR/REA e sequenciamento demonstrando compatibilidade com a cepa BoHV-1 do subtipo 1.1.

A amostra B, isolada de cérebro bovino com distúrbios neurológicos, foi caracterizada por PCR/REA e seqüenciamento demonstrando compatibilidade com a cepa BoHV-5. As cepas foram identificadas e armazenadas como BoHV/BR/79/MEAT e BoHV/BR/79/MEBT.

REFERÊNCIAS

ALFIERI, A.A.; ALFIERI, A.F.; MÉDICI, K.C. Consequências da infecção pelo herpesvirus bovino tipo 1 sobre o sistema reprodutivo de bovinos. **Semina: Ciências e Agronomia Londrina**, v. 19, n. 1, p. 86-93, 1998.

BOELAERT, F.; BIRONT, P.; SOUMARE, B.; DISPAS, M.; VANOPDENBOSCH, E.; VERMEERSCH, J.P.; RASKIN, A.; DUFEY, J.; BERKVEN, D.; KERKHOFS, P. Prevalence of bovine herpesvirus 1 in Belgian cattle population. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 45, p. 285-295, 2000.

CLAUS, M.P.; ALFIERI, A.F.; MÉDICI, K.C.; LUNARDI, M.; ALFIERI, A.A. Bovino herpesvírus 5 detection by vírus isolation in cell culture and multiplex-PCR in central nervous systems from cattle with neurological disease in Brazilian herds. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 485-490, 2007.

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 herpesviruses types 1 e 5. **Veterinary Microbiology**, v. 88, p. 315-324, 2002.

DELHON, G.; MORAES, M.P.; LU, Z.; AFONSO, C.L.; FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; KUTISH, G.F.; ROCK, D.L. Genome of bovine herpesvirus 5. **Journal Virology**, v. 77, n. 19, p. 10339-10347, 2003.

DURHAM, P.J.K.; HASSARD, L.E. Prevalence of antibody to infectious bovine rhinotracheitis, parainfluenza 3, bovine respiratory syncytial and bovine viral diarrhea viruses in cattle in Saskatchewan and Alberta. **Canadian Veterinary Journal**, v. 31, p. 815-820, 1990.

ESTEVES, P.A. **Análise da região carboxi-terminal da glicoproteína C (gC) e sua utilização na diferenciação entre herpesvírus bovinos tipos 1 (BoHV-1) e 5 (BoHV-5)**. 86 p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

ESTEVES, P.A.; DELLAGOSTIN, O.A.; PINTO, L.S.; SILVA, A.D.; SPILKI, F.R.; CIACCI-ZANELLA, J.R.; HÜBNER, S.O.; PUENTES, R.; MAISONNAVE, J.; FRANCO, A.C.; RIJSEWIJK, F.A.M.; BATISTA, H.B.C.R.; TEIXEIRA, T.F.; DEZEN, D.; OLIVEIRA, A.P.; DAVID, C.; ARNS, C.W.; ROEHE, P.M. Phylogenetic comparison of the carboxy-terminal region of glycoprotein C (gC) of bovine herpesviruses (BoHV)1.1, 1.2 e 5 from South America (AS). **Virus Research**, v. 131, p. 16-22, 2008.

GALIERO, G.; GIORDANELLI, M.P.; FRAULO, P. Infections bovine Rhinotracheitis (IBR). Serum

epidemiological serotype in buffalo herds of Southern Italy. **Bulbalus-bulbalis**, v. 7, p. 69-74, 2001.

HALL, T.A. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. **Nucleic Acid Symp.**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HOLZ, C.L.; Cibulski, S.P.; TEIXEIRA, T.F.; BATISTA, H.B.C.R.; CAMPOS, F.S.; SILVA, J.R., VARELA, A.P.M.; CENCI, A.; FRANCO, A.C.; ROEHE, P.M. Soroprevalência de herpesvírus bovinos tipos 1 e/ou 5 no Estado do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 9, p. 767-773, 2009.

JONES, C.; CHOWDHURY, S. A review of the biology of bovine herpesvirus type 1 (BHV-1), its role as cofactor in the bovine respiratory disease complex and development of improved vaccines. **Animal Health Research Reviews**, v. 8, n. 2, p. 187-205, 2008.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA 3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequences alignment. **Brief Bioinformatics**, v. 5, p. 150-163, 2004.

MAHMOUD, M.A.; MAHMOUD, N.A.; ALLAM, A.M. Investigations on Infectious Bovine Rhinotracheitis in Egyptian Cattle and Buffaloes, **Global Veterinaria** v. 3, n. 4, p. 335-340, 2009.

MÉDICI, K.C.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A. Prevalência de anticorpos neutralizantes contra o herpesvírus bovino tipo 1 decorrente de infecção natural em rebanhos com distúrbios reprodutivos. **Ciência Rural**, v. 30, n. 2, p. 347-350, 2000.

MOREIRA, S.P.G.; SAMARA, S.I.; ARITA, G.M.M.; FERREIRA, F.; PEREIRA, G.T. Monitoração de anticorpos neutralizantes para o vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina em bezerros. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**. v. 38, n. 3, p. 127-130, 2001.

NANDI, S.; PANDEY, A.B.; SHARMA, K.; CHAUHAN, R.S. Seroprevalence of infectious bovine rhinotracheitis in cattle of an organized farm by indirecty ELISA. **The Indian Cow**, v. 7, p. 50-53, 2007.

NANDI, S.; KUMAR, M.; MANOHAR, M. and CHAUHAN, R.S. Bovine herpes virus infections in cattle. **Animal Health Research Reviews**, v. 10, p. 85-96, 2009.

RISSI, D.R.; PIEREZAN, F.; SILVA, M.S.; FLORES, E.F.; BARROS, C.S.L.N Neurological disease in cattle in southern Brazil associated with bovine herpesvirus infection. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 20, p. 346-349, 2008.

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

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, p. 406-425, 1987.

SAMBROOK, J. & RUSSELL, D. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SILVA, L.A.F.; COELHO, K.O.; MACHADO, P.F.; SILVA, M.A.M.; MOURA, M.I.; BARBOSA, V.T.; BARBOSA, M.M.; GOULART, D.S. Causas de descarte de vacas da raça holandesa confinadas em uma população de 2083 bovinos (200-2003). **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, p. 383-389, 2008.

SPILKI, F.R.; FRANCO, A.C.; TEIXEIRA, M.B.; ESTEVES, P.A.; SCHAEFER, R.; SCHMIDT, E.; LEMOS, R.A.; ROEHE, P.M. Bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) in a calf with rabies. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 23, n. 1, p. 1-4, 2003.

SUSAN, V.M.; OSUMA, M.; AGUILAR, R.E.; MURAKAMI, Y. Prevalence of Bovine herpesvirus-1, Parainfluenza-3, Bovine Rotavirus, Bovine Viral Diarrhea, Bovine Adenovirus-7, Bovine Leukemia Virus and Bluetongue Virus Antibodies in cattle in Mexico. **Japan Journal Veterinary Research**, v.31, 125-132, 1983.

TAKIUCHI, E.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A. Herpesvírus tipo 1: Tópicos sobre a infecção e métodos de diagnóstico. **Semina: Ciências Agrárias Londrina**, v. 22, n. 2, p. 203-209, 2001.

THEODORIDIS, A. Studies on bovine Herpesviruses, Part 1. Isolation and Characterization of viruses isolates from the genital tract of cattle. **Onderstepoort Journal Veterinary Research**, v. 52, p. 239-254, 1985.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

VIDOR, T. Herpes bovino tipo 1 (BHV-1): I. Sorologia de rebanhos com problemas reprodutivos. **Ciência Rural**, v. 25, n. 3, p. 421-424, 1995.

CAPÍTULO III

PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS CONTRA ANTÍGENOS DE HERPESVÍRUS

Tania Regina Penha^{1,4}, Ernesto R. Kruger^{2,4}, Paulo M. Roehé³, Samuel P. Cibulski³, Ana C. Marteski³, Jorge V.B. Agottani¹, Cybelle de Souza⁴, Vanete Thomaz-Soccol^{5*}

1. Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR);
2. Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti (CDME);
3. FEPAGRO Saúde Animal, Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF);
4. Universidade Federal do Paraná;
5. Programa de Doutorado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia (PPGEBB)

* Autor para Correspondência

RESUMO

Cepas de herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) têm sido associadas a quadros de meningoencefalite, principalmente em animais jovens. Nestes casos é importante que se estabeleça o diagnóstico diferencial com quaisquer apresentações clínicas neurológicas infecciosas. O objetivo deste trabalho é produzir anticorpos monoclonais (AcMc) para a caracterização de uma cepa de BoHV-5, isolada de encéfalo, empregando o teste de imunoperoxidase (IPX). 61 hibridomas foram obtidos após cinco fusões, dos quais apenas dois (8E11 e 3B2) reagiram com a cepa BoHV-5 investigada. Para confirmar este resultado também se utilizou o AcMc conhecido como 3B12 obtendo-se a mesma resposta. No entanto, não houve reatividade quando esta foi submetida aos AcMc anti-BoHV-1 (2G5). Portanto, os AcMc anti-BoHV-5 produzidos representam potenciais insumos para produção de testes diagnósticos por IPX.

Palavras chave: anticorpos monoclonais, herpesvírus bovino 5, meningoencefalite, imunoperoxidase.

1 INTRODUÇÃO

O herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) pertence a Ordem Herpesvirales, família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae* e gênero *Varicellovirus* (ROIZMANN & PELLET, 2007; DAVISON *et al.*, 2009). Estudos epidemiológicos têm mostrado que este agente infeccioso tem maior prevalência na América do Sul (CARRILLO *et al.*, 1983; SANCHES *et al.*, 2000; GOMES *et al.*, 2002). No Brasil, as infecções causadas por este vírus já foram detectadas nos estados do Rio Grande do Sul, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Pará e São Paulo (SANCHES *et al.*, 2000; COLODEL *et al.*, 2002; DE PAULA *et al.*, 2005; RIET-CORREA *et al.*, 2006; AQUINO NETO *et al.*, 2009). A principal doença associada ao BoHV-5 é a meningoencefalite que acomete mais comumente animais com até 8 meses de idade (RISSI *et al.*, 2007). No entanto, tais afecções também podem ser associadas ao BoHV-1, induzindo reações cruzadas nos testes sorológicos de rotina devido à homologia antigênica entre eles (FURUOKA *et al.*, 1995; ELY *et al.*, 1996; SOUZA *et al.*, 2002, ESTEVES, 2007). Na tentativa de evitar tais reações, anticorpos monoclonais (AcMc) têm sido utilizados como insumos para o desenvolvimento de testes sorológicos por serem altamente específicos ao epítipo alvo (MILSTEIN, 1984; D'ARCE *et al.*, 2002; SÁ E SILVA *et al.*, 2007). O objetivo deste estudo é produzir anticorpos monoclonais para identificar o BoHV-5 pela técnica de imunoperoxidase.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ORIGEM DAS AMOSTRAS DE VÍRUS

A amostra de BoHV-5 foi isolada a partir de encéfalo de um caso de distúrbio neurológico em bovino (suspeito de raiva) de uma propriedade rural no Estado do Paraná e foi gentilmente cedida pelo Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti (CDME) ao Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR).

2.2 CULTIVO DO VÍRUS E PREPARAÇÃO DO ANTÍGENO USADO PARA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS (AcMc)

Primeiramente foi realizado o cultivo primário de células de Traqueia de Feto Bovino (Traq. FB) as quais foram cultivadas em monocamada, em garrafas T25. O meio de cultivo usado foi o 199/HAM F10 (ANEXO I - 1) contendo 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e antimicrobianos (penicilina 50.000 UI/mL, estreptomicina 50.000 UI/mL e anfotericina B 1,25 µg/mL). Visando o escalonamento da quantidade celular foram realizados repiques para garrafas T75, T150 e depois para garrafas *roller* de 850 cm³.

A cepa de BoHV-5 foi utilizada para infecção das células de Traq. FB e verificação de efeito citopático. O meio usado foi o 199/HAM F10 (ANEXO I - 1) contendo 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e antimicrobianos (penicilina 50.000 UI/mL, estreptomicina 50.000 UI/mL e anfotericina B 1,25 µg/mL) em garrafas T25, T75, T150 e *roller*. As garrafas foram incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ durante cinco dias (THEODORIDIS, 1985).

Após observação do efeito citopático, o sobrenadante foi coletado e a amostra centrifugada a 3.700 xg por 15 minutos a 4°C visando a clarificação.

Para obtenção do vírus semipurificado foi realizada centrifugação em gradiente de sacarose 30% (ANEXO I – 5) a 24.400 xg durante 60 minutos em ultracentrífuga.

As titulações do BoHV-5 e do conjugado (Sigma-Aldrich) anti-IgG Bovino foram realizadas pela técnica de ensaio imunoenzimático indireto (ELISA), obtendo-se 10⁷ e 3.200, respectivamente.

2.3 PRODUÇÃO DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS

2.3.1 Camundongos

Para as imunizações foram utilizados camundongos da linhagem Balb/c, *specific pathogen free* (SPF).

2.3.2 Protocolo de imunizações dos camundongos

Dez camundongos foram imunizados, via intraperitoneal, em três etapas: primeira dose com uma solução contendo 50 µL de partícula viral e 50 µL de adjuvante de Freund completo. As outras duas doses subsequentes foram administradas com as mesmas concentrações, no entanto com adjuvante de Freund incompleto em volume final de 100 µL. A emulsão (antígeno mais adjuvante) foi homogeneizada até não haver mais formação de gotículas de água. As doses foram realizadas com intervalos de 21 dias.

Ao término das imunizações, foi coletado o sangue total de um camundongo para obtenção de soro positivo a ser usado na avaliação da imunidade humoral em teste de ELISA indireto (GOHAN *et al.*, 2004). Todos os camundongos foram mantidos em observação durante o cumprimento do protocolo de imunizações.

Os animais foram sacrificados por deslocamento da coluna vertebral (aprovado previamente pelo comitê de ética do TECPAR – ANEXO III). O baço foi extraído por processo cirúrgico e colocado em placa de Petri com meio de cultivo para células 199/HAM F10 (ANEXO I - 1). A seguir, o baço foi cortado com bisturi e macerado com pistilo ambos estéreis para liberação dos linfócitos B os quais foram transferidos para um tubo de centrifuga e deixados em repouso por dois minutos para separação dos debris maiores. O sobrenadante obtido foi centrifugado a 800 xg a 4°C por 10 minutos. O precipitado foi ressuspensão em meio de cultivo para células (ANEXO I - 1) e a contagem foi realizada em câmara de Neubauer, obtendo-se uma quantidade de 10^8 por mL (PENHA *et al.*, 2010).

2.3.3 Fusão

Uma suspensão de 10^8 /mL de linfócitos B foi adicionada a uma suspensão contendo 10^7 /mL de células SP2O-ag14, previamente cultivadas em meio de cultivo RPMI (ANEXO I - 26) com 8-azaguanina mantendo uma proporção de 10:1.

A suspensão linfócito-mieloma foi centrifugada a 3.700 xg por 10 minutos. O precipitado foi dissolvido por homogeneização suave e foi adicionado um mL do PEG 6000 (ANEXO I - 27), agitando com movimentos leves e suaves por um minuto. Em seguida, foi adicionado um mL do meio de cultivo RPMI (ANEXO I - 26), sob agitação leve por mais um minuto; após mais dois mL de meio de cultivo RPMI (ANEXO I - 26) foram adicionados, sob agitação, por mais dois minutos. Outra adição de sete mL de meio de cultivo RPMI (ANEXO I - 26) foi realizada agitando-se

suavemente por mais dois minutos obtendo-se assim 10 mL aos quais, finalmente, foram acrescentados mais 10 mL de meio de cultivo RPMI (ANEXO I - 26) totalizando 20 mL. Esta suspensão de células fusionadas foi centrifugada a 800 xg durante dez minutos e ressuspenso com meio de cultivo de células RPMI (ANEXO I - 26), enriquecido com meio de cultivo HAT (ANEXO I - 29) e 100 µL foram distribuídos em cada poço das dez placas de cultivo de células de fundo plano com 96 poços. Este procedimento se repetiu em cada uma das cinco fusões realizadas, obtendo-se 50 placas.

As placas foram incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ e foram observadas diariamente em microscópio invertido. Após o quinto dia, 50% do meio de cultivo foi renovado até que fossem observadas as primeiras colônias de hibridomas e, a partir deste estágio, o meio de cultivo foi substituído por RPMI enriquecido com meio HT (ANEXO I - 30). Em seguida, a troca de meios de cultivo foi realizada a cada 48 horas até o preenchimento de 80% do poço com as células de hibridomas e novamente o meio de cultivo foi substituído por RPMI (ANEXO I - 24) até a coleta para testes de imunoperoxidase (IPX).

Dez dias depois da fusão, foram observadas as primeiras colônias de hibridomas e após todas as fusões completas obteve-se um total de 61 colônias de hibridomas (PENHA, 2007). Estas colônias foram ampliadas e os sobrenadantes testados pela técnica de imunoperoxidase frente ao antígeno BoHV-5, utilizando-se como referência os AcMc anti-BoHV-5 2G5 e 3B12 previamente cedidos pelo IPVDF (ROEHE *et al.*, 1997).

2.4 IMUNOPEROXIDASE (IPX) DAS COLÔNIAS DE HIBRIDOMA

Os procedimentos para o teste de imunoperoxidase foram realizados segundo Souza *et al.* (2002). Em síntese, o cultivo das células MDBK foi tripsinizado (ANEXO I - 14), ressuspenso em PBS pH 7,2 (ANEXO I - 21). A contagem celular foi realizada em câmara de Neubauer. Posteriormente, o restante das células foi ressuspenso em meio de cultivo 199/HAM F10 (ANEXO I - 1) enriquecido com 10% de SFB e antimicrobianos (penicilina 50.000 UI/mL, estreptomicina 50.000 UI/mL e anfotericina B 1,25 µg/mL). Uma suspensão contendo 2,5 X10⁴ células/mL foi produzida para sensibilização das placas de cultivo de células de fundo chato com 96 poços. Em cada poço foram adicionados 100 µL da suspensão. Vinte e quatro horas após,

estas placas foram infectadas com BoHV-5 diluído a 10^{-3} em tampão de bloqueio (ANEXO I - 32). Foram adicionados 100 μ L desta suspensão em cada poço.

Como controle negativo e crescimento celular uma coluna foi mantida com oito poços (coluna 12A a 12H) sem inoculação viral.

As placas foram incubadas a 37°C por 90 minutos em estufa com 5% de CO₂. O inóculo foi removido e foram acrescentados 100 μ L de meio de crescimento HAM F10/199 (ANEXO I – 1) com 10% de SFB e antimicrobianos (penicilina 50.000 UI/mL, estreptomicina 50.000 UI/mL e anfotericina B 1,25 μ g/mL) e novamente as placas foram incubadas a 37°C durante aproximadamente 16 horas. Em seguida, o meio de cultivo foi descartado e as placas foram lavadas três vezes com 200 μ L de PBS (ANEXO I - 21) por poço. As monocamadas infectadas foram fixadas com solução de acetona 20% (ANEXO I - 34) e incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente. A solução de acetona foi descartada e as placas foram secas a mesma temperatura.

Para testar a reatividade dos AcMc foram realizados testes em duplicata com o sobrenadante de cada hibridoma. Em cada poço foram adicionados 100 μ L do sobrenadante de cada hibridoma. Como controles positivos foram adicionados 100 μ L de cada anticorpo monoclonal 2G5 anti-BoHV-1 e 3B12 anti-BoHV-5. Como controle negativo foi adicionado soro de camundongo não imunizado com BoHV-5. A placa foi incubada por 90 minutos em estufa a 37°C.

O conjugado anti-*mouse* IgG-Peroxidase (Sigma) foi diluído a 1:3.200 em tampão de bloqueio (ANEXO I - 32) e adicionado 100 μ L por poço. As placas foram incubadas por 60 minutos em estufa a 37°C. O conjugado foi removido com três lavagens contendo 100 μ L por poço de tampão de lavagem TBS 0,3% (ANEXO I - 36). A revelação foi realizada de acordo com Caixeta (2008). Com a adição de 100 μ L por poço do substrato carbozale 4% (ANEXO I – 55) que confere uma coloração vermelha ao complexo antígeno-anticorpo específico nas células infectadas pelo vírus.

No momento da leitura foram adicionados 50 μ L de PBS por poço (ANEXO I – 21). As placas foram lidas em microscópio invertido.

O Fluxograma das etapas descritas nos itens 2.3 a 2.4 está demonstrado no material e métodos (ANEXO II).

3 RESULTADOS

3.1 CULTIVO DE CÉLULAS DE TRAQUEIA DE FETO BOVINO (TRAQ. FB) E INFECÇÃO POR E BoHV-5

As células de traqueia de feto bovino (Traç. FB) cresceram adequadamente em 24 horas formando a monocamada fechada (FIGURA 7).

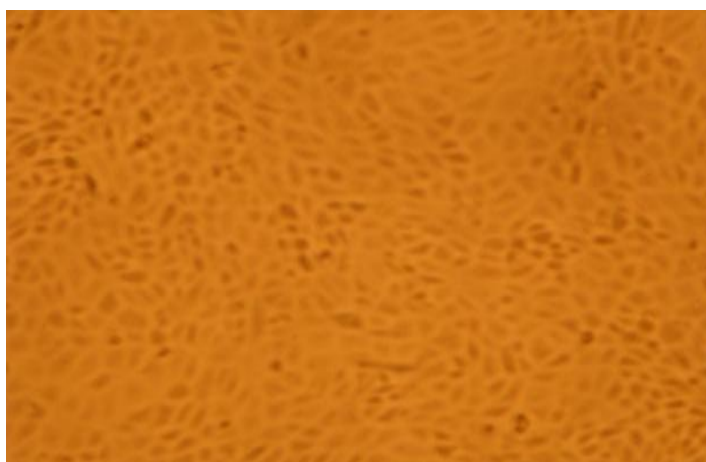


FIGURA 7 - CULTIVO DE CÉLULAS DE TRAÇ. FB EM MONOCAMADA
FONTE: O Autor (2012)

Nas células infectadas com a cepa de BoHV-5 analisada o efeito citopático foi verificado após cinco dias (FIGURA 8).

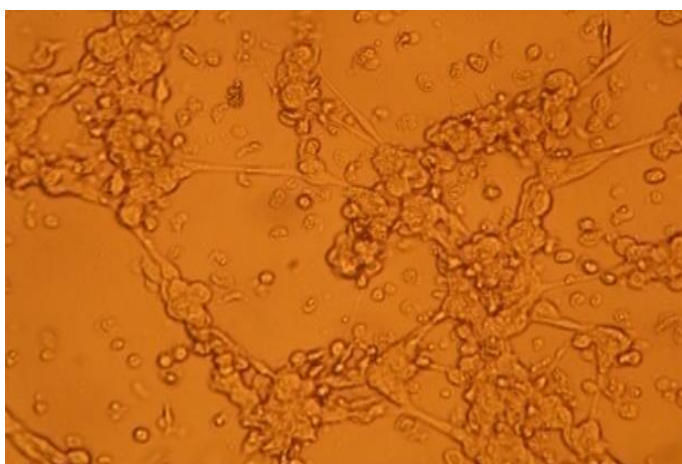


FIGURA 8 - EFEITO CITOPÁTICO CAUSADO PELO BoHV-5 EM CULTIVO DE CÉLULA TRAÇ. FB
FONTE: O Autor (2012)

3.2 PRODUÇÃO DO HIBRIDOMA

Após 10 dias foram obtidas, de cada uma das cinco fusões, 61 colônias de hibridomas as quais foram ampliadas (FIGURA 9).

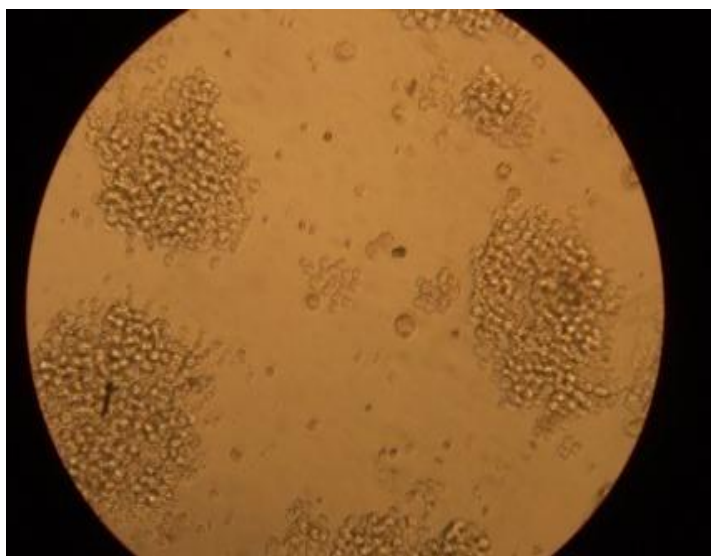


FIGURA 9 - COLÔNIAS DE HIBRIDOMAS APÓS 10 DIAS DE CULTIVO
FONTE: O autor (2012)

Quinze dias após a fusão foram observados os primeiros hibridomas completando o poço (FIGURA 10).



FIGURA 10 - COLÔNIA DE HIBRIDOMAS APÓS 15 DIAS DE CULTIVO
FONTE: O autor (2012)

3.3 IMUNOPEROXIDASE

Para comprovação da reatividade dos anticorpos monoclonais obtidos, células Traq. FB foram cultivadas e infectadas com o BoHV-5.

Dos 61 hibridomas produtores de AcMc anti-BoHV-5 obtidos dois responderam positivamente frente ao BoHV-5 e foram denominados 8E11 e 3B2.

A ligação dos AcMc produzidos pelos hibridomas 8E11 e 3B2 foi revelada pela peroxidase apresentando coloração avermelhada (FIGURA 11).

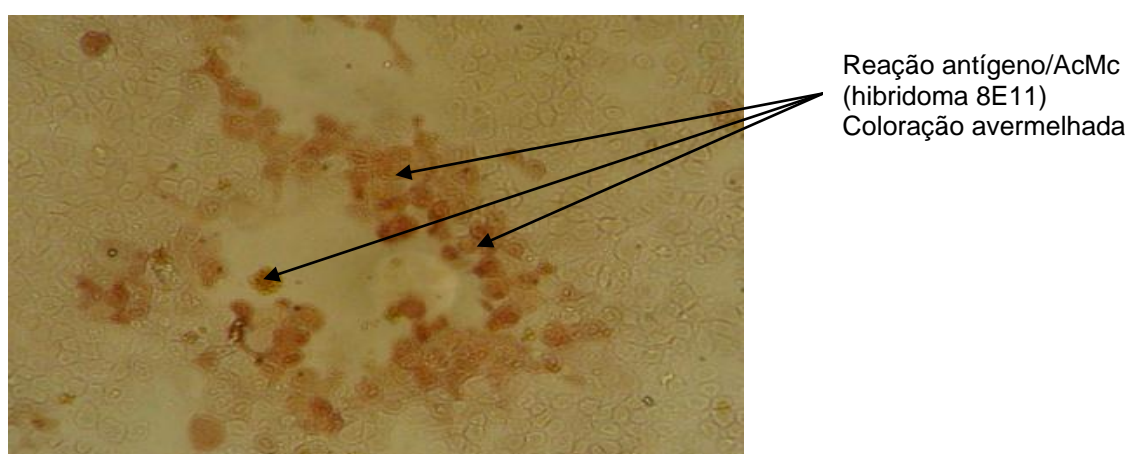


FIGURA 11 – REAÇÃO DE IMUNOPEROXIDASE DO AcMc (HIBRIDOMA 8E11) EM CULTIVO DE CÉLULAS TRAQ. FB INFECTADAS COM BOHV-5
FONTE: O Autor (2012)

Como controle positivo foi utilizado o hibridoma 3B12 anti-BoHV-5 (FIGURA 12). Como controle negativo foi utilizado um cultivo de células infectadas com BoHV-1 não reativo com os AcMc produzidos pelo hibridomas 8E11 e 3B2 o qual se manteve com a coloração normal da célula infectada, mostrando apenas o efeito citopático.

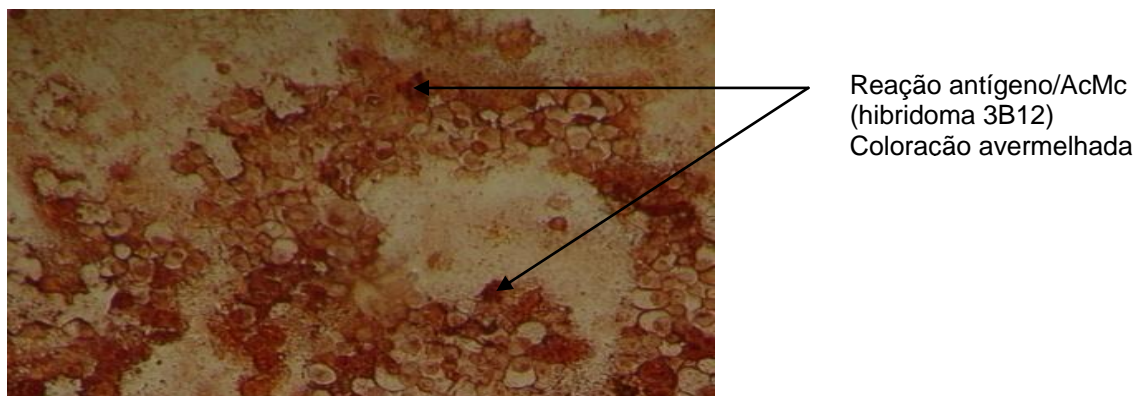


FIGURA 12 - REAÇÃO DE IMUNOPEROXIDASE DO AcMc (HIBRIDOMA 3B12) EM CULTIVO DE CÉLULAS TRAQ. FB INFECTADAS COM BOHV-5
FONTE: O Autor (2012)

4 DISCUSSÃO

Entre os agentes infecciosos causadores de neuropatias em bovinos o herpesvírus tipo 5 (BoHV-5) tem sido isolado em rebanhos de vários estados brasileiros (RIET-CORREA *et al.*, 2006; AQUINO NETO *et al.*, 2009). No Rio Grande do Sul, Sanches *et al.* (2000) verificaram que este patógeno foi a segunda principal causa de distúrbios nervosos entre 305 encéfalos analisados.

Testes sorológicos imunoenzimáticos e de soroneutralização têm sido utilizados para a detecção de animais infectados (TEIXEIRA *et al.*, 1998; HOLZ *et al.*, 2009; BAUERMANN *et al.*, 2010). No Brasil, até o momento, não há produção comercial de insumos para realização de tais técnicas. No entanto, a produção de antígenos para estes fins tem sido realizada de forma restrita às pesquisas no âmbito acadêmico dificultando sua utilização para o diagnóstico executado por técnicos e profissionais da área.

O presente estudo foi realizado com o objetivo de produzir AcMc anti-BoHV-5 como insumos para testes sorológicos empregando a técnica de imunoperoxidase (IPX).

Nas células Traq. FB infectadas com a cepa de BoHV-5 analisada o efeito citopático foi verificado após cinco dias. Em seguida, os camundongos foram sensibilizados com tal cepa para a produção de linfócitos B, os quais foram fusionados com mielomas SP2O-Ag14, para obtenção dos hibridomas produtores de

AcMc. No total, após cinco fusões, foram obtidas 61 colônias de hibridomas das quais apenas duas responderam positivamente ao BoHV-5 sendo denominadas 8E11 e 3B2. No entanto, não houve reatividade frente ao AcMc 2G5 anti-BoHV-1. Apesar da não definição do epítipo proteico viral para o qual os AcMc foram direcionados, foi possível a diferenciação entre o BoHV-1 e BoHV-5.

No Rio Grande do Sul, Souza *et al.* (2002) caracterizaram 26 cepas de BoHV-5 frente a um painel de dez AcMc anti-BoHV-5 (BD10, 2B6, 2C3, 2C5, 3A2, 3B12, 3D11, 6A2, 3D2 e 5E2) e quatro AcMc anti-BoHV-1 (2G5, 5A5, 7F12 e 11H6). Os autores obtiveram os seguintes padrões de reatividade à IPX: todas as amostras analisadas foram reativas frente ao primeiro painel, no entanto, as mesmas foram responsivas à apenas ao 2G5 do segundo painel. Interessante observar que, ao contrário dos resultados acima citados, a cepa de BoHV-5 investigada neste estudo não apresentou reatividade frente ao AcMc 2G5 anti-BoHV-1, ou seja, pode-se inferir que para as cepas de BoHV-5 isoladas de casos de meningoencefalite no estado do Paraná, tais hibridomas (2G5 anti-BoHV-1) sejam importantes para uma precisa diferenciação entre estes dois tipos virais. Para confirmação desta hipótese é necessário que um maior número de amostras, de diferentes rebanhos, seja analisada.

D'Arce *et al.* (2002) investigaram o perfil antigênico de 14 herpesvírus bovino, sendo quatro de BoHV-1 e o restante de BoHV-5, frente a um painel de AcMc por IPX. Três AcMc anti-BoHV-1 foram capazes de diferenciar estes dois tipos de herpesvírus reagindo apenas com o BoHV-1, enquanto que cinco diferentes AcMc reconheceram epítomos comuns entre ambos os tipos de herpesvírus 1 e 5.

A reatividade dos AcMc produzidos também foi avaliada por teste imunoenzimático indireto (dados não publicados) sob as mesmas condições estabelecidas na técnica de IPX, obtendo-se resultados negativos. A explicação deste fato pode estar relacionada a apresentação linear dos antígenos virais a qual ocorre de maneira conformacional no teste de IPX, permitindo a exposição dos epítomos-alvo.

Os resultados deste estudo demonstram que os AcMc representam um grande potencial como insumos para a caracterização e diferenciação do BoHV-1 e BoHV-5.

5 CONCLUSÃO

Após cinco fusões foram obtidos 61 hibridomas produtores de AcMc dos quais apenas dois foram reativos frente ao BoHV-5 utilizando teste de IPX. No entanto, a cepa investigada não mostrou reatividade quando submetida a um AcMc anti-BoHV-1.

REFERÊNCIAS

AQUINO NETO, H.M.; CARVALHO, A.U.; FACURY FILHO, E.J.; FERREIRA, P.M.; BARBOSA-STANCIOLI, E.F.; LOBATO, Z.I.P.; ALVARENGA, M.R.; SERRANO, A.L.; MARTINS, R.A.; AFONSO, D.A.F. Meningoencefalite por Herpesvirus bovino 5 em Minas Gerais: relato de caso clínico. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n.1, p.1-5, 2009.

BAUERMANN, F.V.; BRUM, M.C.S.; WEIBLEN, R.; FLORES, E.F. Teste imunoenzimático com base em anticorpo monoclonal para detecção de anticorpos contra herpesvírus bovino 1-5. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 5, p. 1-10, 2010.

CAIXETA, S.P.M.B. **Análise antigênica de herpesvírus bovino tipos 1 (BoHV-1) e 5 (BoHV-5) com anticorpos monoclonais**. 63 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

CARRILLO, B.J.; AMBROGI, A.; SCHUDEL, A.A.; VASQUEZ, M.; DAHME, E.; POSPISCHIL, A. Meningoencephalites caused by IBR virus in calves in Argentina. **Zentralbl Veterinarmed B** v. 30, n. 5, p. 327-332, 1983.

COLODEL, E.M.; NAKAZATO, L.; WEIBLEN, R.; MELLO, R.M.; SILVA, R.R.P.; SOUZA, M.A.; FILHO, J.A.O.; CARON, L. Meningoencefalite necrosante em bovinos causada por Herpesvírus bovino no estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v.32, p. 293-298, 2002.

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 herpesviruses types 1 e 5. **Veterinary Microbiology**, v. 88, p. 315-324, 2002.

DAVISON, A.J.; EBERLE, R.; EHLERS, B.; HAYWARD, G.S.; McGEOCH, D.J.; MINSON, A.C.; PELLETT, P.E.; ROIZMAN, B.; STUDDERT, M.J.; THIRY, E. The order Herpesvirales. **Archives of Virology**, v.154, p. 171-177, 2009.

DE PAULA, R.R.; SOUZA, M.A.; COLODEL, E.M.; HÜBNER, S.O.; BRUM, K.B.; JORGE, K.B.C.;

DAMASCENO, A.D. Meningoencefalite causada pelo BHV-5 em um bovino no Estado de Goiás. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, p.2, 2005.

ELY, R.W.; D'OFFEI, J.M.; RUEFER, A.H. & CASH, C.Y. Bovine herpesviral encephalitis: a retrospective study on archived formalin-fixed, paraffin-embedded brain tissue. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 9, p. 487-492, 1996.

ESTEVEZ, P.A. Análise **da região carboxi-terminal da glicoproteína C (gC) e sua utilização na diferenciação entre herpesvírus bovinos tipos 1 (BoHV-1) e 5 (BoHV-5)**. Tese (Doutorado em Ciências veterinárias), 88 p., Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto alegre, 2007.

FURUOKA, H.; IZUMIDA, N.; HORIUCHI, M.; OSAME, S. & MATSUI, T. Bovine herpesvirus meningoencephalitis association infectious bovine rhinotracheitis (IBR) vaccine. **Acta Neuropathology**, v. 90, p. 565-571, 1995.

GOHAN, I.; KNOWLES, L.H. and PASTORET, PP. Manual of Diagnostic Test and vaccines for terrestrial Animals, **OIE, 5th edition**, v. 2, chapter I, 1.8, 2004.

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. Detecção de herpesvírus bovino 5 (BoHV-5) em bovinos do sudeste brasileiro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 54, p.217-220, 2002.

HOLZ, C.L.; Cibulski, S.P.; TEIXEIRA, T.F.; BATISTA, H.B.C.R.; CAMPOS, F.S.; SILVA, J.R., VARELA, A.P.M.; CENCI, A.; FRANCO, A.C.; ROEHE, P.M. Soroprevalência de herpesvírus bovinos tipos 1 e/ou 5 no Estado do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 9, p. 767-773, 2009.

MILSTEIN, C. From the structure of antibodies to the diversification of the immune response. **Bioscience Reports**, v. 4, p. 275-297, 1984.

PENHA, T.R. **Produção e Caracterização de Anticorpos Monoclonais anti fragmento Fc de IgG de bovino**. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

PENHA, T.R.; KRÜGER, E.R.; SOCCOL, V.T.; AGOTTANI, J.V.B.; ITANO, F.H.; TROIANO, L,D,C.; BRODZINSKI, J. Production and Characterization of Monoclonal Antibodies Anti Fragment Fc of Bovine IgG. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 1, p. 105-114, 2010.

RIET-CORREA, G.; DUARTE, M.D.; BARBOSA, J.D.; OLIVEIRA, C.M.C.; CERQUEIRA V.D.; BRITO, M.F.; RIET-CORREA, F. Meningoencefalite e poliencefalomacia causadas por Herpesvírus bovino-5 no Estado do Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.26, n. 1, p. 44-46, 2006.

RISSI, D.R.; RECH, R.R.; FLORES, E.F.; KOMMERS, G.D.; BARROS, C.S.L. Meningoencefalite por herpesvírus bovino-5. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 7, p. 251-260, 2007.

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

ROIZMANN, B. & PELLET, P.E. The family Hesperiviridae, a brief introduction, **Field's Virology**, In: Knipe, M.D. & Howley, P.M., 5^a th ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, p. 2480-2497, 2007.

SÁ E SILVA, M.; BRUM, M.C.S.; WEIBLEN, R.; FLORES, E. Identificação e diferenciação de herpesvírus bovino tipos 1 e 5 isolados de amostras clínicas no Centro-Sul do Brasil, Argentina e Uruguai (1987-2006) **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 10, p. 403-408, 2007.

SANCHES, A.W.D.; LANGOHR, L.M.; STIGGER, A.L. Doenças do Sistema nervoso central em bovinos no Sul do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, p. 113-118, 2000.

SOUZA, V.F.; MELO, S.V.; ESTEVES, P.A.; SCHMIDT, C.S.; GONÇALVES, D.A.; SCHAEFER, R.; SILVA, T.C.; ALMEIDA, R.S.; VICENTINI, 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 tipo 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5) com anticorpos monoclonais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 22, n. 1, p. 13-18, 2002.

TEIXEIRA, M.B.; ESTEVES, P.A.; COELHO, C.S.S.; SILVA, T.C.; OLIVEIRA, L.G.; ROEHE, P.M. Diferenças em níveis de anticorpos neutralizantes contra herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e 5 (BoHV-5) por testes de soroneutralização. **Pesquisa Veterinária Gaúcha**, v. 4, n. 1, p. 61-65, 1998.

THEODORIDIS, A. Studies on bovine Herpesviruses, Part 1. Isolation and Characterization of viruses isolates from the genital tract of cattle. **Orderstepoort Journal Veterinary Research**, v. 52, n. 4, p. 239-254, 1985.

CAPÍTULO IV

DESENVOLVIMENTO E PRODUÇÃO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE PARA DIAGNÓSTICO DA RINOTRAQUÍTE INFECCIOSA BOVINA (IBR)

Tania Regina Penha^{1,3}, Luís R. Soares², Jorge V.B. Agottani¹, Gilberto Delinski Junior³, Cybelle de Souza⁴, Vanete Thomaz-Soccol^{3*}

1. Instituto de Tecnologia do Paraná;

2. SPL Evolution Ltda;

3. Programa de Doutorado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Federal do Paraná

4. Universidade Federal do Paraná

* Autor para Correspondência

RESUMO

As infecções pelo BoHV-1 têm sido detectadas no território nacional principalmente em rebanhos leiteiros. Com o objetivo de contribuir com a produção de insumos de diagnóstico específico para o BoHV-1, um plasmídeo recombinante foi produzido para síntese da proteína gG126 do envelope viral. A partir dos *primers* desenhados, o fragmento gênico *US4* da glicoproteína foi amplificado e clonado em plasmídeo utilizando o vetor pET 28b+ o qual foi expresso em *E. coli*. A atividade da proteína produzida foi testada frente a soros bovinos positivos, hiperimunes e negativos contra BoHV-1. Soros hiperimune e AcMc anti-BoHV-5 também foram testados. A proteína recombinante mostrou reatividade frente aos soros bovinos positivos e hiperimune anti-BoHV-1, bem como ao soro hiperimune anti-BoHV-5. No entanto, não foi reconhecida quando submetida a soro anti-BoHV-1 negativo e anticorpos monoclonais anti-BoHV-5. Os resultados obtidos sugerem que a proteína recombinante gG126 poderá ser utilizada como insumo em *kits* diagnóstico, mas estudos adicionais são necessários para verificar a imunogenicidade de tal antígeno.

Palavras Chave: BoHV-1, proteína recombinante, IBR, western blotting, plasmídeo.

1 INTRODUÇÃO

Entre os agentes infecciosos virais, o herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) representa uma das principais causas de doenças respiratórias, genitais, conjuntivais e neurológicas. No entanto, a maioria dos animais infectados apresenta a forma latente sem sinais clínicos (NANDI *et al.*, 2009).

O diagnóstico laboratorial das infecções por este tipo viral pode ser realizado de maneira indireta por meio de testes sorológicos, sendo a soroneutralização (SN) considerada o método padrão (OIE, 2002). No Brasil, levantamentos sorológicos têm revelado uma ampla disseminação do BoHV-1, tanto em rebanhos de corte como de leite. No Rio Grande do Sul foram descritas taxas de soropositividade de 81,7% e 71,3% nos anos de 1989 e 1995, respectivamente (RAVAZZOLO *et al.*, 1989; VIDOR *et al.*, 1995). Em 2009, Holz *et al.* analisaram 2200 soros provenientes de 390 propriedades distribuídas em 158 municípios deste estado. Apenas 47 (0,18%) amostras foram sororreagentes para o BoHV-1.

A SN depende da existência de um estoque de vírus e de cultivos celulares primários, secundários ou de linhagem (HOLZ *et al.*, 2009; NANDI *et al.*, 2009). Técnicas de DNA recombinante, especialmente empregando cepas de *Escherichia coli* (*E. coli*), têm sido utilizadas para a expressão de proteínas virais visando à produção de insumos para o desenvolvimento de *kits* de diagnóstico, antígenos vacinais, entre outros (SCHUMANN & FERREIRA, 2004; DONOFRIO *et al.*, 2006). O BoHV-1 possui 10 glicoproteínas em seu envelope, das quais a glicoproteína G (gG) é responsável pela transmissão de célula a célula durante a infecção viral (NAKAMICHI, 2002).

O objetivo do presente trabalho foi a construção e a produção de uma proteína recombinante a partir do gene *US4* da glicoproteína gG do BoHV-1 como insumo para *kits* de diagnóstico sorológico

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 CULTIVO DE VÍRUS E PREPARAÇÃO DO ANTÍGENO

Primeiramente foi realizado o cultivo primário de células de Traqueia de Feto Bovino (Traq. FB), as quais foram cultivadas em monocamada, em garrafas T25. O meio de cultivo usado foi o 199/HAM F10 (ANEXO I - 1) contendo 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e antimicrobianos (penicilina 50.000 UI/mL, estreptomicina 50.000 UI/mL e anfotericina B 1,25 µg/mL). Visando o escalonamento da quantidade celular foram realizados repiques para garrafas T75, T150 e depois para garrafas *roller* de 850 cm³.

A cepa de BoHV-1 foi utilizada para infecção das células Traq. FB e verificação de efeito citopático. O meio usado foi o 199/HAM F10 (ANEXO I - 1) contendo 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e antimicrobianos (penicilina 50.000 UI/mL, estreptomicina 50.000 UI/mL e anfotericina B 1,25 µg/mL) em garrafas T25, T75, T150 e *roller*. As garrafas foram incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ durante cinco dias (THEODORIDIS, 1985).

Após observação do efeito citopático, o sobrenadante foi coletado e a amostra centrifugada a 3.700 xg por 15 minutos a 4°C, visando a clarificação.

Para obtenção do vírus semipurificado foi realizada centrifugação em gradiente de sacarose 30% (ANEXO I – 5) a 24.400 xg durante 60 minutos em ultracentrífuga.

As titulações do BoHV-5 e do conjugado (Sigma-Aldrich) anti-IgG Bovino foram realizadas pela técnica de ensaio imunoenzimático indireto (ELISA), obtendo-se 10⁷ e 3.200, respectivamente.

2.2 EXTRAÇÃO DE DNA E CLONAGEM POR PCR

O DNA da amostra foi extraído utilizando o *kit* Bioscience AxyPrep DNA/RNA viral Miniprep (Axygen), conforme instruções do fabricante.

Os *kits* GFX (GE Healthcare) e Qubit dsDNA HS Assay (Invitrogen) foram utilizados, respectivamente, para a purificação de bandas do gel de agarose e quantificação do DNA extraído.

2.3 DESENVOLVIMENTO DE UM ANTÍGENO RECOMBINANTE PARA O DIAGNÓSTICO DA RINOTRAQUEÍTE INFECCIOSA BOVINA (IBR)

Os dados do genoma do BoHV-1 foram obtidos em banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI), número 045369.1, cepa K22 com 140.000 pb.

A escolha da região a ser clonada foi feita com base no parâmetro de uso de uma região conservada do genoma do BoHV-1 correspondente à glicoproteína G126 (gG126), localizada entre os nucleotídeos 117337 a 118671 do genoma. A partir destas informações foram desenhados os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) para a clonagem por PCR cujas sequências foram: **F** (1) 5'-A T G C C T G C C G C C C G G A C C G G C-3' e o **R** (2) 5'-G A C G C T G A G C A T C G G C T C G T A C G-3' contendo 1334 pb. Utilizou-se 1 µL da enzima *Pfu* para evitar erros de amplificação garantindo a fidelidade da cópia amplificada. Os seguintes ciclos foram usados: um inicial a 95°C por um minuto, 35 ciclos de desnaturação a 95°C por um minuto cada, anelamento a 58°C por um minuto e dois ciclos de extensão, um a 72°C por um minuto e uma extensão final a 72°C por sete minutos.

O produto amplificado foi avaliado por eletroforese em gel de agarose 1% (ANEXO I - 8). A banda obtida no gel foi recortada e purificada com *kit* GFX (GE Healthcare) seguindo o protocolo do fabricante para purificação.

A banda amplificada foi usada como molde para a segunda PCR em dois tempos visando facilitar a introdução de sítios de restrição para clonagem proporcionando a estabilidade das pontas soltas na fita de DNA.

A PCR em dois passos foi realizada com 1 µL da enzima *Pfu* e os seguintes ciclos foram usados: um inicial a 92°C por um minuto, 35 ciclos de desnaturação a 92°C por um minuto cada, anelamento a 64°C por um minuto e dois ciclos de extensão, um a 72°C por um minuto, e uma extensão final a 72°C por sete minutos.

A região amplificada da PCR em dois tempos também foi purificada com *kit* GFX (GE Healthcare) e digerida com duas enzimas de restrição, em reação única, contendo: 1 µL da enzima *Nco*I (CCATGGTG), 3 µL do tampão-3 (10x), 1 µL enzima *Not*I (GCGGCCGC), 3,4 µL do tampão SH, 1 µL BSA, para estabilização da enzima de corte, 15 µL de DNA purificado do BoHV-1 e 9 µL de água purificada. A reação foi incubada por duas horas a 37°C. O produto amplificado e digerido foi mantido a -20°C até o uso.

2.3 PRODUÇÃO DO INÓCULO EM *E. coli* BL21 TOP 10'

De uma colônia semeada em ágar LB (Luria-Bertani, Sigma-Aldrich) (ANEXO I - 37) foi preparado o inóculo contendo a bactéria quimiocompetente *E. coli* BL21 TOP 10' (Invitrogen, ref. C303003). Inoculou-se uma colônia em 5 mL caldo LB (Luria-Bertani, Sigma-Aldrich) (ANEXO I - 38) em tubo de 50 mL contendo 50 mM de canamicina. A incubação foi realizada a 37°C durante 16 horas a 200 xg de agitação. No dia seguinte foi transferido 1 mL do inóculo para 100 mL de caldo LB (ANEXO I - 38) em Erlenmeyer de 250 mL, incubado-se novamente seguindo a mesma condição acima.

O cultivo foi retirado da estufa, colocado em banho de gelo durante dez minutos e submetido a centrifugação durante três minutos a 6000 xg. O precipitado foi colhido e ressuspenso em 10 mL de cloreto de cálcio 0,1M (ANEXO I - 39) e incubado novamente em banho de gelo durante 20 minutos. Quando retirado do banho de gelo foi centrifugado nas mesmas condições anteriores, descartando-se o sobrenadante e ressuspendendo-se o precipitado em 5 mL da solução de cloreto de cálcio 0,1M (ANEXO I - 39) com 15% de glicerol. Para armazenar, foram feitas alíquotas de 300µL por microtubos e conservadas a -80°C.

Para a reação de ligação utilizaram-se 2,5 µL do produto amplificado por PCR do fragmento gênico de interesse, 1 µL da enzima ligase, 4 µL de plasmídeo pET28b+ (Novagen), 4 µL do tampão de diluição da enzima ligase e 8,5 µL de água purificada. A reação de ligação foi mantida a 4°C por aproximadamente 16 horas. Após este período, a reação foi submetida à eletroforese de gel de agarose 1% (ANEXO I - 8) em tampão TBE (ANEXO I - 9) para verificação da ligação do inserto no vetor a qual foi confirmada pela presença da banda.

A seleção do clone de interesse foi realizada com a adição de 2 µL do produto ligado e semeado em caldo LB (ANEXO I - 38) contendo a bactéria quimiocompetente *E. coli* BL21 TOP 10', onde ocorreu a inserção do produto ligado na bactéria de expressão da gG126 recombinante. Tal banda foi purificada utilizando o *kit* GFX (GE Healthcare) e a proteína quantificada em por espectrofotometria

2.4 CONTROLE DO INSERTO DE BoHV-1 NO PLASMÍDEO

Após a clonagem no plasmídeo foram realizados dois testes para confirmação

da inserção. No primeiro teste foram utilizados 1 µg/µL da amostra, 1 µL de cada uma das enzimas NcoI e NotI, 2 µL de tampão das enzimas, 2 µL de BSA e 8 µL de água purificada. No segundo teste foi repetido tal protocolo, no entanto foi utilizado apenas 1 µL da enzima NcoI. As reações foram incubadas a 37°C durante 60 minutos. Para verificar a restrição para separar o inserto do plasmídeo e a visualização do inserto ligado a apenas um ponto deste foi realizada eletroforese em gel de agarose 1% (ANEXO I - 8) com corrente de 70 mA durante duas horas, corado em brometo de etídio 20% (ANEXO I - 12) por 15 minutos e revelado em transiluminador.

2.5 TRANSFORMAÇÃO DA CEPA *E.coli* BL21 TOP 10' QUIMIOCOMPETENTE E EXPRESSÃO DO PLASMÍDEO RECOMBINADO

Para realizar a transformação foram utilizados 2 µL do produto de ligação (BoHV-1/pET28b+) os quais foram inoculados em 50 µL da cultura com a cepa *E. coli* quimiocompetente BL21 TOP 10' a qual foi colocada durante 30 minutos em banho de gelo. Após, a mesma foi mantida por 30 segundos em banho-maria a 45°C e novamente mais 30 minutos em banho de gelo. Tal procedimento visava o choque térmico para a formação de poros na membrana bacteriana. Ao tubo contendo a cultura com o clone foram adicionados 250 µl de meio SOC (ANEXO I - 31a) e incubado a 37°C durante 14 horas, sob agitação de 200 xg. Para seleção das bactérias contendo o plasmídeo insertado foram semeados 50 µL em placa contendo ágar LB (ANEXO I - 37) a qual foi incubada a 37°C por 14 horas.

Uma nova colônia isolada foi inoculada em 10 mL de caldo LB (ANEXO I - 38) e incubada a 37°C por 14 horas, sob agitação de 200 xg.

A técnica de Western Blotting foi empregada para avaliar a melhor temperatura de cultivo para expressão mediante a utilização de soluções para lise com Tris 50 mM ou SDS 0,1%, visando a melhor solução de solubilização.

Uma nova suspensão foi preparada com 2 mL de inóculo em 98 mL de caldo LB (ANEXO I - 38) com 0,3 de absorbância inicial, a qual foi incubada por aproximadamente três horas a 37°C sob agitação de 200 xg, até atingir 0,8 de absorbância. A avaliação da absorbância foi verificada em espectrofotômetro na faixa de 600 nm, a cada trinta minutos nas duas primeiras horas, e a partir da terceira hora, a cada dez minutos.

Após atingir a absorvância de 0,8 foi adicionada uma solução de 80 mM de IPTG (ANEXO I - 41), análogo da lactose, na concentração final de 0,6 mM para 100 mL de caldo LB (ANEXO I - 38). A suspensão já induzida foi colocada novamente em agitação durante três horas a 37°C. Por diferença aritmética foi calculado o rendimento de biomassa do produto fermentado e centrifugado a 5000 xg durante dez minutos a 4°C em frascos previamente pesados.

O sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspendido em 100 mL de PBS (ANEXO I - 21). Para lavagem, o precipitado foi centrifugado novamente na mesma condição, desprezando o sobrenadante. O precipitado foi pesado e ressuspendido em 10 mL de tampão de lise, adicionando-se 100 µL do inibidor de protease na proporção de 1:100 e 10 µL de benzonase (DNase) 1:10.000 sob agitação, durante trinta minutos a 4°C.

Foram realizados diferentes protocolos visando estabelecer as melhores condições de temperatura e sonicação para a lise bacteriana, e de temperatura e tampão de lise para a liberação da proteína recombinante do corpo de inclusão. De cada amostra expressa foram utilizados 100 mg os quais foram solubilizados em 10 mL de ureia 8M (ANEXO I - 54). ou SDS 0,1% (ANEXO I - 58). (QUADRO 2).

Fração	Volume Ressuspendido	Tampão de lise	Temperatura de Lise	Sonicação
A	0,2 ML	Uréia 8 M	4°C	4 vezes/15 s
B	0,5 mL	Tris 50 mM e Uréia 8 M	4°C	4 vezes/15 s
C	0,5 mL	Tris 50 mM e Uréia 8 M	30°C	4 vezes/15 s
D	0,2 mL	Tris 50 mM e Uréia 8 M	30°C	4 vezes/15 s
E	0,2 mL	Tris 50 mM e Uréia 8 M	4°C	4 vezes/15 s
F	0,2 mL	Tris 50 mM e Uréia 8 M	30°C	Sem
G	0,5 mL	Tris 50 mM e Uréia 8 M	30°C	Sem
H	0,2 mL	Tris 50 mM e Uréia 8 M	4 °C	Sem
I	0,5 mL	Tris 50 mM e Uréia 8 M	4 °C	Sem
J	0,2 mL	Tris 50 mM e SDS 0,1%	30 °C	Sem
K	0,2 mL	Tris 50 mM e Uréia 8 M	30 °C	Sem
L	0,5 mL	Tris 50 mM e Uréia 8 M	30 °C	Sem
M	0,5 mL	Tris 50 mM e SDS 0,1%	30 °C	Sem
N	0,2 mL	Tris 50 mM e SDS 0,1%	30 °C	4 vezes/15 s
O	0,2 mL	Tris 50 mM e Uréia 8 M	30 °C	4 vezes/15 s
P	0,5 mL	Tris 50 mM e Uréia 8 M	30 °C	4 vezes/15 s
Q	0,5 mL	Tris 50 mM e SDS 0,1%	30 °C	4 vezes/15 s

QUADRO 2 – CONDIÇÕES AVALIADAS DURANTE A ETAPA DE LISE E SONICAÇÃO
 FONTE: O autor (2012)

Após avaliar as melhores condições para lise bacteriana e liberação da

proteína recombinante do corpo de inclusão, concluiu-se que o protocolo mais adequado foi aquele obtido no item Q, em que a proteína foi ressuspensa em solução SDS 0,1% (ANEXO I - 58), acrescida de 50 mM de tris a 30°C e sonicada 4 vezes por 15 segundos e 70% de potência com sonda de 2mm. (FIGURA 13).

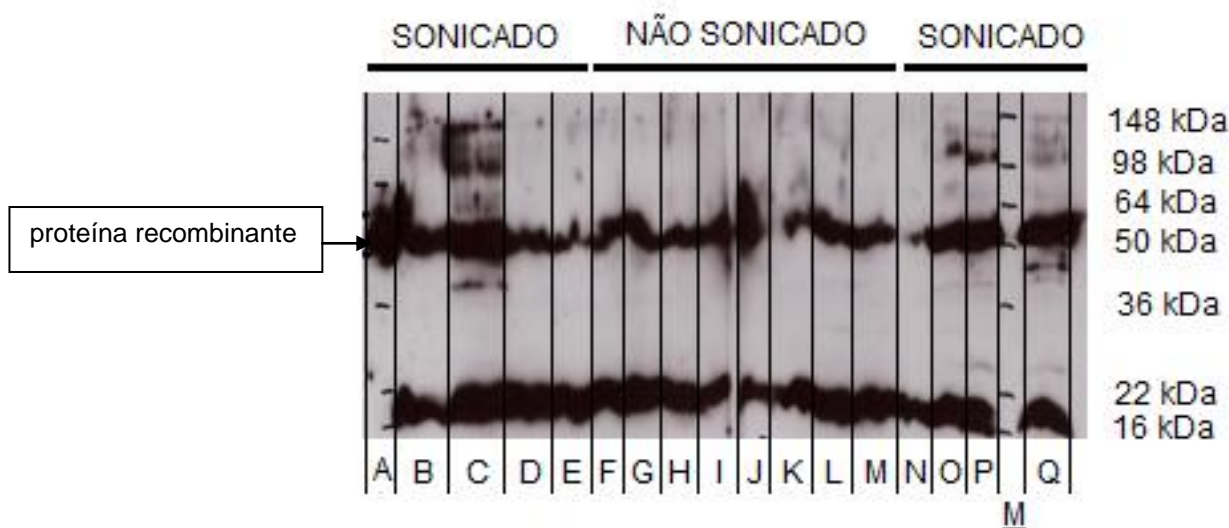


FIGURA 13 – WESTERN BLOTTING DAS FRAÇÕES DE SONICAÇÃO DO CULTIVO DE *E. coli* APÓS EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE
 FONTE: O autor (2012)
 NOTA: A fração Q está descritas no QUADRO 2

A suspensão obtida pelo protocolo selecionado foi centrifugada a 15.000 xg a 4°C durante dez minutos para clarificação. Coletou-se o sobrenadante para controle de perda do material e depois ressuspendeu-se o precipitado em PBS (ANEXO I - 21), repetindo-se o procedimento mais duas vezes.

O precipitado foi mantido à temperatura de -70°C até o uso. O material descongelado foi ressuspenso e homogeneizado em vórtex.

As amostras foram aplicadas em gel de acrilamida 10% (ANEXO I - 45) e logo após transferidas para uma membrana de PVDF Immobilon 0,2 m x 3,75 m e filtro de 0,45 µm (Millipore). A membrana e os filtros foram lavados três vezes com tampão de transferência (ANEXO I - 49) em sistema de transferência Semi Dry Blotter-Pierce, Thermo Scientific durante 25 minutos, conforme instruções do fabricante.

A membrana foi bloqueada com uma solução de bloqueio (ANEXO I - 32) em TBS (ANEXO I - 36) durante 60 minutos, sob agitação, em câmara escura e logo após lavada 3 vezes com TBS (ANEXO I - 36) durante 10 minutos cada vez.

Foi adicionado 1 µL do anticorpo primário α-His diluído 1:1000 (Sigma) em

tampão de bloqueio (ANEXO I - 32) e a incubação foi realizada durante 16 horas a 4°C, sob agitação em câmara escura.

O material foi retirado da câmara fria e colocado por trinta minutos em temperatura ambiente. O anticorpo primário foi descartado e a membrana lavada três vezes em TBS (ANEXO I - 36) a cada dez minutos, em câmara escura e sob agitação.

O anticorpo secundário anti-IgG de camundongo (Sigma-Aldrich) diluído 1:3.200 em tampão de bloqueio (ANEXO I - 32) foi adicionado e incubado novamente durante uma hora em câmara escura, em temperatura ambiente, sob agitação.

A membrana foi lavada novamente com TBS (ANEXO I - 36), conforme descrito acima, e a revelação foi realizada utilizando *kit* Plus Western Blotting Detection System (Ref.RPN2132OL/AK-Novagem), conforme orientação do fabricante. O filme foi revelado em equipamento de raio X por quimioiluminescência.

A amostra Q também foi submetida à corrida em outro gel de acrilamida 10% (ANEXO I - 45) e uma nova transferência para membrana de PVDF revelada pela técnica de Immunoblot. A membrana contendo a proteína recombinante foi retirada da cuba de transferência, mapeada, recortada em tiras e colocadas em cuba com canaletas separadas para Immunoblot. O bloqueio foi realizado com 5 mL de tampão de bloqueio (ANEXO I - 32) por 16 horas. A membrana foi lavada com tampão de lavagem TBS (ANEXO I - 36) por 3 vezes, com intervalos de cinco minutos cada vez. Os soros utilizados foram diluídos em tampão de lavagem 1:50 e adicionados na seguinte ordem: soro bovino positivo para BoHV-1; soro hiperimune para BoHV-1; soro negativo, soro hiperimune BoHV-5; anticorpo monoclonal 3B2 anti-BoHV-5 e anticorpo monoclonal 8E11 anti-BoHV-5. A incubação foi realizada durante 60 minutos a 37°C. As tiras foram novamente lavadas três vezes, na mesma condição, e o conjugado anti-IgG bovino peroxidase (Sigma-Aldrich) diluído 1:3.200 foi adicionado em cada canaleta. Para os monoclonais foi utilizado o conjugado anti-IgG mouse peroxidase (Sigma-Aldrich) diluído 1:3.200 em tampão de bloqueio (ANEXO I - 17). As canaletas foram novamente incubadas durante 60 minutos a 37°C e depois lavadas como descrito acima.

O substrato-cromógeno utilizado foi 4-Cloro-1-naftol (2 mg em 10 mL de metanol) e a esta solução foram adicionados 60 mL de Tampão Tris 50 mM (ANEXO I - 16) e 25 µL de peróxido de hidrogênio incubado por 15 minutos, em câmara

escura a 37°C. A reação foi interrompida adicionando em cada canaleta o mesmo volume de PBS (ANEXO I - 21).

2.6 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE

A proteína expressa com His-Tag foi quantificada para a purificação em coluna de alta resolução por afinidade com capacidade de 1 mL por minuto (His-Pur Niquel/Cobalt Chromathography Cartridges) no equipamento de cromatografia FLPC Äkta purifer. A capacidade de retenção da coluna era de 40 mg/mL da proteína expressa e seguiu-se o protocolo sugerido pelo fornecedor: na primeira fase, 5 mL do tampão de equilíbrio (ANEXO I - 50) foram passados durante cinco minutos; na segunda fase, 1 mL da amostra foi injetada para ligação na coluna e logo após foram passados 5 mL de tampão de lavagem (ANEXO I - 50); na terceira fase, foram utilizados 5 mL de tampão de eluição (ANEXO I - 51) para a retirada da proteína ligada na coluna; finalmente, foram passados 5 mL do tampão de lavagem (ANEXO I - 50) e, para preservação da coluna, foram passados 5 mL de etanol 20% (ANEXO I - 52) e a mesma foi acondicionada a 4°C.

A qualidade da proteína recombinante purificada foi comprovada em de gel de Acrilamida 10% (ANEXO I - 45) corado com Comassie (ANEXO I - 42) e descorado com solução descorante para Comassie (ANEXO I - 43) para a visualização da banda purificada.

O Fluxograma das etapas descritas nos itens 2.1 a 2.6 está demonstrado no material e métodos (ANEXO II).

3 RESULTADOS

Após a corrida eletroforética foram comprovados os tamanhos do fragmento alvo amplificado pela PCR e do vetor obtendo-se 1.270 pb e 5.368 pb, respectivamente, os quais foram utilizados para construção do plasmídeo com 6.908 pb (FIGURA 14).

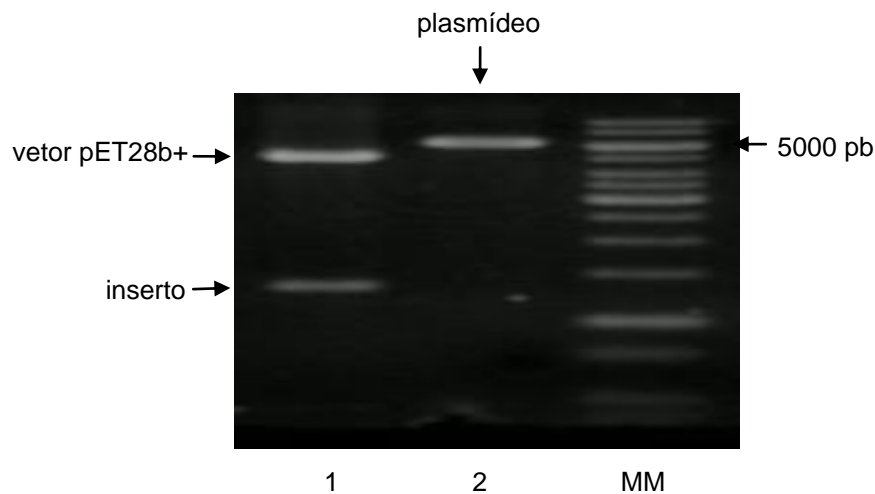


FIGURA 14 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1% MOSTRANDO A CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO

FONTE: O autor (2012)

NOTA: 1 – Plasmídeo clivado com enzimas de restrição *NcoI* e *NotI*; 2 – Plasmídeo clivado com a enzima de restrição *NcoI*; MM - Marcador de massa molecular de 1 kb

A proteína recombinante produzida, não purificada, correspondente à gG apresentou massa molecular de aproximadamente 50 Kda. Ao ser submetida frente a soros bovinos comprovadamente positivo, hiperimune e negativos contra BoHV-1, a proteína foi reativa apenas com os dois primeiros soros. Quando avaliada com soro hiperimune anti-BoHV-5 e anticorpos monoclonais anti-BoHV-5 houve apenas reatividade com o primeiro soro (FIGURA 15).

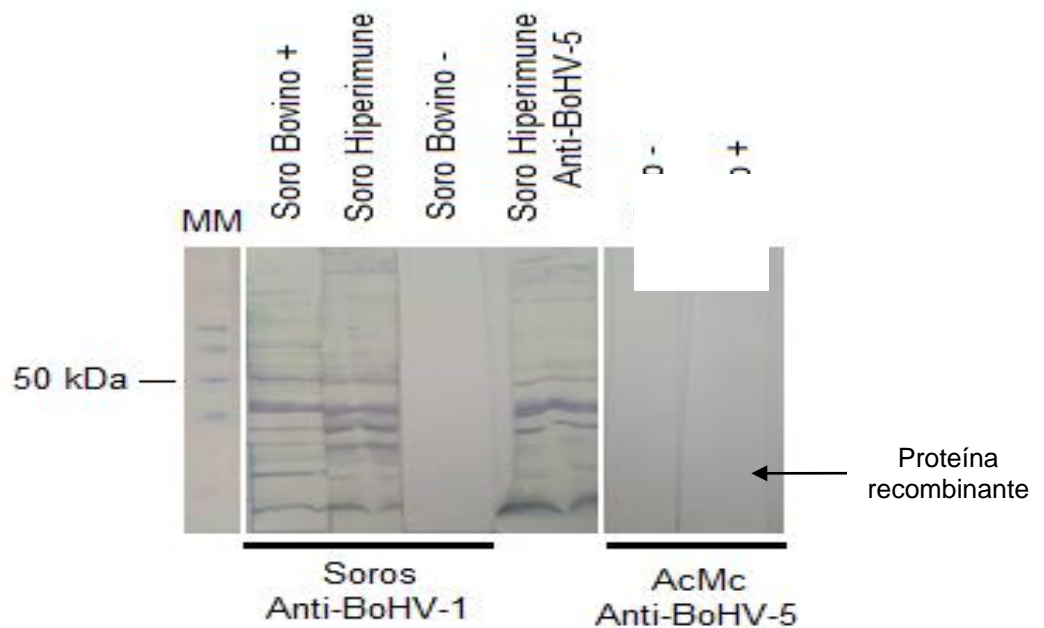


FIGURA 15 – WESTERN BLOTTING EM MEMBRANA DE PVDF SENSIBILIZADA COM A AMOSTRA SONICADA CONTENDO A PROTEÍNA RECOMBINANTE

FONTE: O Autor (2012)

NOTA: MM - Marcador de massa molecular See Blue (Sigma Aldrich).

Após o processo de purificação e da corrida eletroforética, foi observada uma banda de aproximadamente 50 kDa nas frações eluídas da coluna cromatográfica mostrando a presença da proteína recombinante (FIGURA 16).

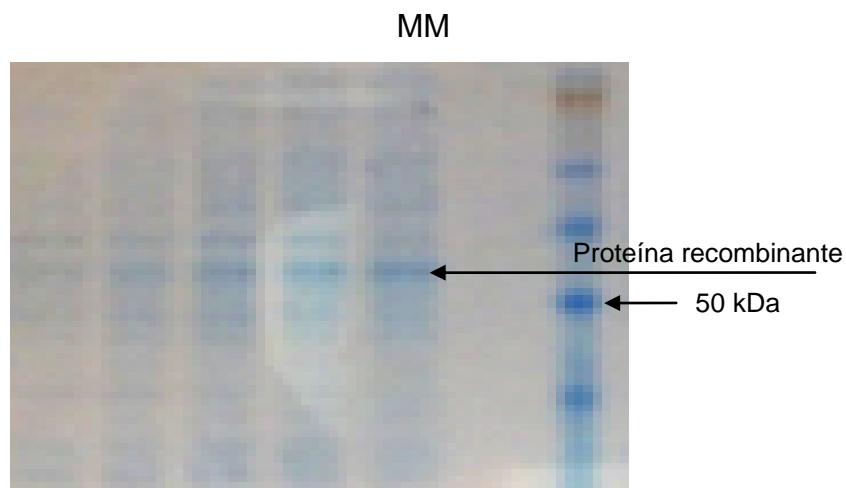


FIGURA 16 – ANÁLISE ELETROFORÉTICA EM GEL DE POLIACRILAMIDA 10% MOSTRANDO BANDAS DE APROXIMADAMENTE 50 kDa.
FONTE: O autor (2012)
NOTA: MM - Marcador de massa molecular see blue (4 a 250 kDa)

4 DISCUSSÃO

No Brasil, levantamentos sorológicos realizados em rebanhos de diferentes regiões geográficas têm mostrado que o cenário das infecções pelo BoHV-1 revela grandes preocupações sanitárias (MÉDICI *et al.*, 2000; SÁ E SILVA *et al.*, 2007; HOLZ *et al.*, 2009; GATTI *et al.*, 2010).

A biotecnologia vem se mostrando promissora ao empregar técnicas de engenharia genética principalmente no desenvolvimento de imunógenos para a prevenção das infecções pelos herpesvírus bovinos. No entanto, poucas contribuições têm sido feitas neste campo visando à produção de antígenos como insumos para o diagnóstico laboratorial (CHUNG & HSU, 1996; KAASHOEK *et al.*, 1998; DONOFRIO *et al.*, 2006; JONES *et al.*, 2008).

Schumann & Ferreira em 2004 mostraram que vários fatores podem interferir na expressão das proteínas, como definição de vetores a serem utilizados,

planejamento para otimização do sistema de expressão em *E.coli* com a variação de vários parâmetros.

O plasmídeo construído contendo com 6.908 pb e gene *US4* da glicoproteína gG126 do BoHV-1 visando a expressão da proteína recombinante em *E. coli*. foi confirmada após a corrida eletroforética a qual revelou os tamanhos do inserto e do vetor de 1.270 pb e 5.368 pb, respectivamente. Donofrio *et al.* (2006) investigaram a possibilidade de utilizar o BoHV-4 como vetor para a expressão da gD do BoHV-1 utilizando coelhos como modelo experimental. Títulos satisfatórios de anticorpos neutralizantes contra a proteína analisada foram obtidos e ausência desta atividade neutralizante contra o vetor BoHV-4. Segundo os autores, o modelo apresentado mostrou resultados encorajadores, no entanto são necessários estudos de desafio *in vivo* em bovinos com cepas patogênicas de BoHV-1 para confirmação destes dados.

No presente estudo a reatividade da proteína recombinante obtida foi testada, por Western Blotting, frente a um banco de soros bovinos policlonais positivo, hiperimune e negativo contra o BoHV-1. Esta atividade também foi testada utilizando soros hiperimune policlonal e anticorpos monoclonais anti-BoHV-5. Como esperado, a proteína recombinante foi reativa apenas com os soros positivo e hiperimune anti-BoHV-1. Quando avaliada com soro hiperimune anti-BoHV-5 e anticorpos monoclonais anti-BoHV-5 houve apenas reatividade com o primeiro soro. Neste caso, a provável explicação para este achado refere-se à grande homologia genômica e antigênica entre ambos os tipos o que justifica tal reação (DELHON *et al.*, 2003). A ausência de resposta frente aos anticorpos monoclonais pode ser explicada pela alta especificidade dos hibridomas produtores de AcMc anti BoHV-5 que não reconheceram os epítomos apresentados pela proteína recombinante produzida neste estudo.

Em síntese, o plasmídeo construído permitiu a produção da proteína recombinante gG126 do BoHV-1, a qual foi reconhecida antigênicamente por soros policlonais anti-BoHV-1 e BoHV-5. No entanto, melhores padrões de purificação e um maior número de amostras de soros são necessários garantir a fidedignidade de futuros estudos visando a produção de *kits* de diagnóstico ou como potencial imunógeno em vacinas para prevenção por BoHV-1.

5 CONCLUSÃO

A construção do plasmídeo e a produção da proteína foram bem-sucedidas e confirmadas por meio da corrida eletroforética.

A proteína recombinante mostrou reatividade frente aos soros bovinos positivos e hiperimune anti-BoHV-1, bem como ao soro hiperimune anti-BoHV-5. No entanto, não foi reconhecida quando submetida a soro anti-BoHV-1 negativo e anticorpos monoclonais anti-BoHV-5.

REFERÊNCIAS

CHUNG, Y.T.; HSU, W. Functional expression of the bovine herpesvirus 1 alkaline desoxyribonuclease (UL12) in *Escherichia coli*. **Archives Virology**, v. 141, n. 12, p. 2457-2464, 1996.

DELHON, G.; MORAES, M.P.; LU, Z.; AFONSO, C.L.; FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; KUTISH, G.F.; ROCK, D.L. Genome of bovine herpesvirus 5. **Journal Virology**, v. 77, n. 19, p. 10339-10347, 2003.

DONOFRIO, G.; CAVIRANI, F.; VANDERPLASSEN, A.; GILLET, L.; FLAMMINI, C.F. Recombinant Bovine Herpesvirus 4 (BoHV-4) Expressing Glycoprotein D of BoHV-1 is Immunogenic and Elicits Serum-Neutralizing Antibodies against BoHV-1 in Rabbit Model. **Clinic Vaccine Immunology**, v. 13, n. 11, p. 1246-1254, 2006.

GATTI, S.P.; AFFONSO, I.B.; DIAS, F.C.; MEDEIROS, A.S.R.; FERREIRA F.; SAMARA, S.I. Títulos de Anticorpos anti-herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) de Bezerra em três rebanhos leiteiros do estado de São Paulo, Brasil. **ARS Veterinária**, v. 26, n. 3, p. 147-152, 2010.

HOLTZ, C.L.; CIBULSKI, S.P.; TEIXEIRA, T.F.; BATISTA, H.B.C.R.; CAMPOS, F.S.; SILVA, J.R.; VARELA, A.P.M.; CENCI, A.; FRANCO, A.C.; ROEHE, P.M. Soroprevalência de Herpesvírus bovinos tipos 1 e/ou 5 no Estado do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 9, p. 767-773, 2009.

JONES, C.; CHOWDHURY, S. A review of the biology of bovine herpesvirus type 1 (BHV-1), its role as cofactor in the bovine respiratory disease complex and development of improved vaccines. **Animal Health Research Reviews**, v. 8, n. 2, p. 187-205, 2008.

KAASHOEK, M.J.; FIJSEWIJK, F.A.M.; RUULS, R.C.; KEIL, G.M.; THIRY, E., PASTORET, P.P.; van OIRSCHOT, J.T. Virulence, immunogenicity and reactivation of bovine herpesvirus 1 mutants with a deletion in the gC, gG, gI, gE, or in both the gI and gE gene. **Vaccine**, v.16, p. 802-809, 1998.

MÉDICI, K.C.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A. Prevalência de anticorpos neutralizantes contra o herpesvírus bovino tipo 1 decorrente de infecção natural em rebanhos com distúrbios reprodutivos. **Ciência Rural**, v. 30, n. 2, p. 347-350, 2000.

NAKAMICHI, K.; MATSUMOTO, Y.; OTSUKA, H. Bovine herpesvirus 1 glicoprotein G is necessary for maintaining cell-to-cell junctional adherence among infected cells. **Virology**, v. 294, n. 1, p. 22-30, 2002.

NANDI, S.; KUMAR, M.; MANOHAR, M. and CHAUHAN, R.S. Bovine herpes virus infections in cattle. **Animal Health Research Reviews**, v. 10, p. 85-96, 2009.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). **Imagem**. Disponível em: <http://www.ncbi.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB.html>. Acesso em: 12/08/2012.

OIE – Office International des Epizooties, International Animal Health code. WAHID, dados de 2010, site www.web.oie.int/wahis. disponível em 8 de agosto de 2012.

RAVAZZOLO, A.P.; PIZZOL, M.D.; MOOJEN, V. Evidência da presença de anticorpos para o vírus da Rinotraqueíte Infecciosa dos Bovinos em alguns Municípios do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, v. 17, p. 89-95, 1989.

SÁ e SILVA, M.; BRUM, M.C.S.; WEIBLEN, R.; FLORES, E. Identificação e diferenciação de herpesvírus bovino tipos 1 e 5 isolados de amostras clínicas no Centro-Sul do Brasil, Argentina e Uruguai (1987-2006) **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 10, p. 403-408, 2007.

SCHUMANN, W. and FERREIRA, L.C. Production of Recombinant proteins in *Escherichia coli*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, n. 3, p. 442-453, 2004.

THEODORIDIS, A. Studies on bovine Herpesviruses, Part 1. Isolation and Characterization of viruses isolates from the genital tract of cattle. **Orderstepoort Journal Veterinary Research**, v. 52, n. 4, p. 239-254, 1985.

VIDOR, T.; HALFER, D.C.; LEITE, T.E. Herpes bovino tipo 1 (BHV-1): I. Sorologia de rebanhos com problemas reprodutivos. **Ciência Rural**, v. 25, n. 3, p. 421-424, 1995.

REFERÊNCIA GERAL

ACKERMANN, M.; BELAK, S.; BITSCH, V.; EDWARDS, S.; MOUSSA, A.; ROCKBORN, G. & THIRY, E. Round table on infectious bovine rhinotracheitis/infectious vulvovaginitis virus infection diagnosis and control. **Veterinary Microbiology**, v. 23, p. 361-363, 1990.

ALFIERI, A.A.; ALFIERI, A.F.; MÉDICI, K.C. Consequências da infecção pelo herpesvirus bovino tipo 1 sobre o sistema reprodutivo de bovinos. **Semina: Ciências e Agronomia Londrina**, v. 19, n. 1, p. 86-93, 1998.

ANUNCIAÇÃO, A.V.M.; LEITE, R.C.; MOREIRA, E.C. Presença de anticorpos para o Herpesvírus Bovino 1 (HVB-1) em bovinos nos Estados de Minas Gerais, Goiás e Rio de Janeiro, através da prova de hemoaglutinação passiv. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 41, n. 5, p. 433-441, 1989.

AQUINO NETO, H.M.; CARVALHO, A.U.; FACURY FILHO, E.J.; FERREIRA, P.M.; BARBOSA-STANCIOLI, E.F.; LOBATO, Z.I.P.; ALVARENGA, M.R.; SERRANO, A.L.; MARTINS, R.A.; AFONSO, D.A.F. Meningoencefalite por Herpesvirus bovino 5 em Minas Gerais: relato de caso clínico. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n.1, p.1-5, 2009.

ASHBAUGH, S.E.; THOMPSON, K.E.; BELKNAP, E.B. Specific detection of shedding and latency of bovine herpesvirus 1 and 5 using a nested polymerase chain reaction. **Journal Veterinary Diagnostic investigation**, v. 4, p. 387-394, 1997.

BARROS FILHO, I.R.; KRÜGER, E.R.; SOUZA, J.F.; RICKLI JÚNIOR W. Incidência de bovinos soropositivos para o vírus da Rinotraqueíte no município de Palotina-PR, In Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 25., Gramado. Anais...Gramado: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, p. 171, 1997.

BAUERMANN, F.V.; BRUM, M.C.S.; WEIBLEN, R.; FLORES, E.F. Teste imunoenzimático com base em anticorpo monoclonal para detecção de anticorpos contra herpesvírus bovino 1-5. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 5, p. 1-10, 2010.

BOELAERT, F.; BIRONT, P.; SOUMARE, B.; DISPAS, M.; VANOPDENBOSCH, E.; VERMEERSCH, J.P.; RASKIN, A.; DUFEY, J.; BERKVEN, D.; KERKHOFS, P. Prevalence of bovine herpesvirus 1 in Belgian cattle population. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 45, p. 285-295, 2000.

CAMPOS, F.S.; DEZEN, D.; ANTUNES, D.A.; SANTOS, H.F.; ARANTES, T.S.; CENCI, A.; GOMES, F.; LIMA, F.E.S.; BRITO, W.M.E.D.; BATISTA, B.B.C.R.; SPILKI, F.R.; FRANCO, A.C.; RIJSEWIJK, F.A.M.; ROEHE, P.M. Efficacy of an inactivated, recombinant bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) vaccine. **Veterinary Microbiology**, v. 148, n. 1, p. 18-26, 2010.

CARRILLO, B.J.; AMBROGI, A.; SCHUDEL, A.A.; VASQUEZ, M.; DAHME, E.; POSPISCHIL, A. Meningoencephalites caused by IBR virus in calves in Argentina. **Zentralbl Veterinarmed B** v. 30, n. 5, p. 327-332, 1983.

CLAUS, M.P.; ALFIERI, A.F.; MÉDICI, K.C.; LUNARDI, M.; ALFIERI, A.A. Bovino herpesvírus 5 detection by vírus isolation in cell culture and multiplex-PCR in central nervous systems from cattle with neurological disease in Brazilian herds. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 485-490, 2007.

COLODEL, E.M.; NAKAZATO, L.; WEIBLEN, R.; MELLO, R.M.; SILVA, R.R.P.; SOUZA, M.A.; FILHO, J.A.O.; CARON, L. Meningoencefalite necrosante em bovinos causada por Herpesvírus bovino no estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v.32, p. 293-298, 2002.

CHUNG, Y.T.; HSU, W. Functional expression of the bovine herpesvirus 1 alkaline desoxyribonuclease (UL12) in *Escherichia coli*. **Archives Virology**, v. 141, n. 12, p. 2457-2464, 1996.

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 herpesviruses types 1 e 5. **Veterinary Microbiology**, v. 88, p. 315-324, 2002.

DAUBNEY, R.; HUDSON, J.R. & ANDERSON, T. Sterility. Preliminary description on a form of sterility in cattle associated with vaginitis in female stock in with chronic changes in the epididymis and in the testicles of bulls. **East African Agricultural Journal**, v. 4, p. 31-34, 1938.

DAVISON, A.J. Evolution of the herpesviruses. **Veterinary Microbiology**, v. 86, p. 69-88, 2002.

DAVISON, A.J.; EBERLE, R.; EHLERS, B.; HAYWARD, G.S.; McGEOCH, D.J.; MINSON, A.C.; PELLETT, P.E.; ROIZMAN, B.; STUDDERT, M.J.; THIRY, E. The order Herpesvirales. **Archives of Virology**, v.154, p. 171-177, 2009.

DELHON, G.; MORAES, M.P.; LU, Z.; AFONSO, C.L.; FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; KUTISH, G.F.; ROCK, D.L. Genome of bovine herpesvirus 5. **Journal Virology**, v. 77, n. 19, p. 10339-10347, 2003.

DE PAULA, R.R.; SOUZA, M.A.; COLODEL, E.M.; HÜBNER, S.O.; BRUM, K.B.; JORGE, K.B.C.; DAMASCENO, A.D. Meningoencefalite causada pelo BHV-5 em um bovino no Estado de Goiás. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, p.2, 2005.

DONOFRIO, G.; CAVIRANI, F.; VANDERPLASSEN, A.; GILLET, L.; FLAMMINI, C.F. Recombinant Bovine Herpesvirus 4 (BoHV-4) Expressing Glycoprotein D of BoHV-1 is Immunogenic and Elicits Serun-Neutralizing Antibodies against BoHV-1 in Rabbit Model. **Clinic Vaccine Immunology**, v. 13, n. 11, p. 1246-1254, 2006.

DURHAM, P.J.K.; HASSARD, L.E. Prevalence of antibody to infectious bovine rhinotracheitis, parainfluenza 3, bovine respiratory syncytial and bovine viral diarrhoea viruses in cattle in Saskatchewan and Alberta. **Canadian Veterinary Journal**, v. 31, p. 815-820, 1990.

EDWARDS, S.; WHITE, H.; NIXON, P. A Study of the predominant genotypes of BHV-1 found in UK. **Veterinary Microbiology**, v. 22, p. 213-223, 1990.

ELY, R.W.; D'OFFEI, J.M.; RUEFER, A.H. & CASH, C.Y. Bovine herpesviral encephalitis: a retrospective study on archived formalin-fixed, paraffin-embedded brain tissue. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 9, p. 487-492, 1996.

ENQUIST, L.W.; TOMISHIMA, M.J.; GROSS S.; SMITH, G.A. Directional spread of an α -herpesvirus in the nervous system. **Veterinary Microbiology**, v. 86, p. 5-16, 2002.

ESTEVEZ, P.A. Análise da região carboxi-terminal da glicoproteína C (gC) e sua utilização na diferenciação entre herpesvírus bovinos tipos 1 (BoHV-1) e 5 (BoHV-5). Tese para Título de Doutorado na **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, 2007.

ESTEVEZ, P.A.; DELLAGOSTIN, O.A.; PINTO, L.S.; SILVA, A.D.; SPILKI, F.R.; CIACCI-ZANELLA, J.R.; HÜBNER, S.O.; PUENTES, R.; MAISONNAVE, J.; FRANCO, A.C.; RIJSEWIJK, F.A.M.; BATISTA, H.B.C.R.; TEIXEIRA, T.F.; DEZEN, D.; OLIVEIRA, A.P.; DAVID, C.; ARNS, C.W.; ROEHE, P.M. Phylogenetic comparison of the carboxy-terminal region of glycoprotein C (gC) of bovine herpesviruses (BoHV) 1.1, 1.2 e 5 from South America (AS). **Virus Research**, v. 131, p. 16-22, 2008.

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

FURUOKA, H.; IZUMIDA, N.; HORIUCHI, M.; OSAME, S. & MATSUI, T. Bovine herpesvirus meningoencephalitis association infectious bovine Rhinotracheitis (IBR) vaccine. **Acta Neuropathology**, v. 90, p. 565-571, 1995.

GALIERO, G.; GIORDANELLI, M.P. and FRAULO, P. Infections bovine Rhinotracheitis (IBR). Serum epidemiological serotype in buffalo herds of Southern Italy. **Bulbalus-Bulbalis**, v. 7, p. 69-74, 2001.

GATTI, S.P.; AFFONSO, I.B.; DIAS, F.C.; MEDEIROS, A.S.R.; FERREIRA F.; SAMARA, S.I. Títulos de Anticorpos anti-herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) de Bezerra em três rebanhos leiteiros do estado de São Paulo, Brasil. **ARS Veterinária**, v. 26, n. 3, p. 147-152, 2010.

GIBBS, E.P.J.; RWEYEMAMU, M.M. Bovine herpesviruses. Part I. Bovine herpesvirus 1. **Veterinary Bulletin**, v. 47, p. 317-318, 1977.

GOHAN, I.; KNOWLES, L.H. and PASTORET, P.P. Manual of Diagnostic Test and vaccines for terrestrial Animals, **OIE, 5th edition**, v. 2, chapter I, 1.8, 2004.

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. Detecção de herpesvírus bovino 5 (BoHV-5) em bovinos do sudeste brasileiro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 54, p.217-220, 2002.

GOMES, L.I.; ROCHA, M.A.; SOUZA, J.G.; COSTA, E.A.; BARBOSA-STANCIOLI, E.F. Bovine herpesvirus 5 (BoHV-5) in bull semem: amplification and sequence analysis of the US4 gene. **Veterinary Research Communications**, v. 27, p. 495, 2003.

HALL, T.A. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. **Nucleic Acid Symp.**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HEINLEIN, A.S.; METZLER, A.E.; WEIBLEN, R.; BERRIOS, P.; SCHUDEL, A.A.; RODRIGUEZ, M. Molecular characterization of South American Bovine herpesvirus-1 isolates with monoclonal antibodies and SDS-PAGE. **Zentralbl Veterinarmed B**, v.40, p. 125-130, 1993.

HOLZ, C.L.; CIBULSKI, S.P.; TEIXEIRA, T.F.; BATISTA, H.B.C.R.; CAMPOS, F.S.; SILVA, J.R.; VARELA, A.P.M.; CENCI, A.; FRANCO, A.C.; ROEHE, P.M. Soroprevalência de Herpesvírus bovinos tipos 1 e/ou 5 no Estado do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 9, p. 767-773, 2009.

HOMAN, E.J.; EASTERDAY, B.C. Isolation of bovine herpesvirus 1 from trigeminal ganglia of clinically normal cattle. **American Journal of Veterinary Research**, v. 41, p. 1212-1213, 1980.

HÜBNER, S.O.; OLIVEIRA, A.P.; FRANCO, A.C.; ESTEVES, P.A.; SILVA, A.D.; SPILKI, F.R.; RIJSEWIJK, F.A.M.; ROEHE, P.M. Experimental infection of calves with a gl, gE, US9 negative bovine herpesvirus type 5. **Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 28, p. 187-196, 2005.

JONES, C. Herpes simplex vírus type 1 and bovine herpesvirus 1 latency. **Clinical Microbiology Review**, v. 16, p. 79-95, 2003.

JONES, C.; CHOWDHURY, S. A review of the biology of bovine herpesvirus type 1 (BHV-1), its role as cofactor in the bovine respiratory disease complex and development of improved vaccines. **Animal Health Research Reviews**, v. 8, n. 2, p. 187-205, 2008.

KAASHOEK, M.J.; STRAVER, P.H.; QUAK, J.; van OIRSCHOT, J.T. Virulence, immunogenicity and reactivation of seven bovine herpesvirus 1.1 strains: clinical and virological aspects. **Veterinary Record**, v. 139, p. 416-421, 1996.

KAASHOEK, M.J.; FIJSEWIJK, F.A.M.; RUULS, R.C.; KEIL, G.M.; THIRY, E.; PASTORET, P.P.; van OIRSCHOT, J.T. Virulence, immunogenicity and reactivation of bovine herpesvirus 1 mutants with a deletion in the gC, gG, gl, gE, or in both the gl and gE gene. **Vaccine**, v.16, p. 802-809, 1998.

KRAMPS, J.A.; MAGDALENA, J.; QUAK, J.; WEERDMEESTER, K.; KAASHOEK, M.J.; MARISVELDHUIS, M.A.; KEIL, G.; VAN OIRSCHOT, J.T. A simple, specific and highly sensitive blocking enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to bovine herpesvirus 1. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 9, p. 2175-2181, 1994.

KRAMPS, J.A.; PERRIN, B.; EDWARDS, S.; VAN OIRSCHOT, J.T. A European inter-laboratory trial to evaluate the reliability of serological diagnosis of bovine herpesvirus 1 infectious. **Veterinary Microbiology**, v. 53, p. 153-161, 1996.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA 3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequences alignment. **Brief Bioinformatics**, v. 5, p. 150-163, 2004.

LEITE, F.; SYLTE, M.J.; O'BRIEN, S.; SCHULTZ, R.; PEEK, S.; van REETH, K.; CZUPRYNSKI, C.J. Effect of experimental infections of cattle with bovine herpesvirus (BHV-1) on the *ex vivo* interaction of bovine leukocytes with *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* leukotoxin. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 84, p. 97-100, 2002.

McINTOSH, B.M.; HAIG, D.A. & ALEXANDER, R.A. Isolation in mice and embryonated hen's eggs of associated with vaginitis of cattle. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 26, p. 479-484, 1954.

MAHMOUD, M.A; MAHMOUD, N.A.; ALLAM, A.M. Investigations on Infectious Bovine Rhinotracheitis in Egyptian Cattle and Buffaloes, **Global Veterinaria** v. 3, n. 4, p. 335-340, 2009.

MÉDICI, K.C.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A. Prevalência de anticorpos neutralizantes contra o herpesvírus bovino tipo 1 decorrente de infecção natural em rebanhos com distúrbios reprodutivos. **Ciência Rural**, v. 30, n. 2, p. 347-350, 2000.

MEDINA, M.R.; VALLE, M.B.; ENGELS, M.; ACKERMANN, M. Molecular Characterization of a Herpesvirus bovino 1 Cuban Strain. **Revista Salud Animal**, v. 32, n. 1, p. 42-47, 2010.

MEHROTRA, M.L.; RAJYA, B.S. and KUMAR, S. IBR keratoconjunctivitis in calves. **Indian Journal of Veterinary Pathology**, v. 1, p. 70-73, 1976.

MEURENS, F.; KEIL, G.M.; MYULKENS, B.; GOGEV, S.; SCHYNTS, F.; NEGRO, S.; WIGGERS, L. and THIRY, E. Interspecific Recombination between two ruminants Alphaherpesviruses, Bovine Herpesviruses 1 and 5. **Journal of Virology**, v. 78, n. 18, p. 9828-9836, 2004.

MEYER, G.; LEMAIRE, M.; ROS, C.; BELAK, K.; GABRIEL, A.; CASSART, D.; COIGNOUL, F.; BELAK, S.; THYRY, E. Comparative pathogenesis of acute and latent infections of calves with bovine herpesvirus types 1 and 5. **Archives Virology**, v. 146, n. 4, p. 633-652, 2001.

MILLER, J.M.; WHETSTONE, C.A.; BELLO, L.J.; LAWRENCE, W.C.; WHITBECK, J.C. Abortion in heifers inoculated with a thymidine kinase-negative recombinant of bovine herpesvirus 1. **American Journal of Veterinary Research**, v. 56, p. 870-874, 1995.

MILSTEIN, C. From the structure of antibodies to the diversification of the immune response. **Bioscience Reports**, v. 4, p. 275-297, 1984.

MOHANTY S.B.; HAMMOND, R.C. and LILLIE, M.G. A new Bovine Herpesvirus and Its effect on Experimentally Infected Calves. **Archiv für Gesamte Virusforschung**, v. 34, p. 394-395, 1971.

MOREIRA, S.P.G.; SAMARA, S.I.; ARITA, G.M.M.; FERREIRA, F.; PEREIRA, G.T. Monitoração de anticorpos neutralizantes para o vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina em bezerros. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v. 38, n. 3, p. 127-130, 2001.

MUELLER, S.B.K.; IKUNO, A.A.; MACHADO, J.S.; LIMA, R.M.A. Prevalência de anticorpos contra o vírus da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina/Vulvovaginite Pustular Infecciosa (IBR/IPV) em bovinos do Estado de São Paulo. **Instituto Biológico de São Paulo**, v. 47, n. 2, p. 55-59, 1981.

MUYLKENS, B.; THIRY, J.; KIRTEN, P.; SCHYNTS, F.; THIRY, E. Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. **Veterinary Research**, v. 38, p. 181-209, 2007.

MWEEME, A.S.; OKAZAKI, 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, p. 165-174, 1996.

NAKAMICHI, K.; MATSUMOTO, Y.; OTSUKA, H. Bovine herpesvirus 1 gliciprotein G is necessary for maintaining cell-to-cell junctional adherence among infected cells. **Virology**, v. 294, n. 1, p. 22-30, 2002.

NANDI, S.; PANDEY, A.B.; SHARMA, K.; CHAUHAN, R.S. Seroprevalence of infectious bovine rhinotracheitis in cattle of an organized farm by indirectly ELISA. **The Indian Cow**, v. 7, p. 50-53, 2007.

NANDI, S.; KUMAR, M.; MANOHAR, M. and CHAUHAN, R.S. Bovine herpes virus infections in cattle. **Animal Health Research Reviews**, v. 10, p. 85-96, 2009.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). **Imagem**. Disponível em: <http://www.ncbi.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB.html>. Acesso em: 12/08/2012.

NOORDEGRAAF, A.V.; JALVINGH, A.W.; de JONG, M.C.M.; FRANKEN, P.; DIJKHUIZEN, A.A. Evaluating control strategies for outbreaks in BHV-1 free areas including stochastic end spatial simulation. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 44, p. 21-42, 2000.

NYAGA, P.N.; MCKERCHER, D.G. Pathogenesis of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) infections: interactions of the virus with peripheral bovine blood cellular components. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 2, p. 587-602, 1980.

OIE – Office International des Epizooties, International Animal Health code. WAHID, dados de 2010, site www.web.oie.int/wahis disponível em 8 de agosto de 2012.

OTSUKA, H.; XUAN, X. Construction of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) recombinants which express pseudorabies virus (PRV) glycoproteins gB, gC, gD and gE. **Archives of Virology**, v. 141, n. 1, p. 57-71, 1996.

PENHA, T.R.; KRUGER, E.R.; SOCCOL, V.T. **Produção e Caracterização de Anticorpos Monoclonais anti fragmento Fc de IgG de bovino**. Dissertação para obtenção do grau de Mestrado no Programa de Pós-graduação em Processos Biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná, 2007.

PENHA, T.R.; KRUGER, E.R.; SOCCOL, V.T.; AGOTTANI, J.V.B.; ITANO, F.H.; TROIANO, L.D.C.; BODZINSKI, J. Production and Characterization of Monoclonal Antibodies Anti Fragment Fc of Bovine IgG. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 1, p. 105-114, 2010.

PEREZ, S.E.; BRETSCHNEIDER, G.; LEUNDA, M.R.; OSORIO, F.A.; FLORES, E.F.; ODEON, A.C. Primary infection, latency and reactivation of bovine herpesvirus type 5 in the bovine nervous system. **Veterinary Pathology**, v. 39, p. 437-444, 2002.

PERRIN, B.; BITSCH, V.; CORDIOLI, P.; EDWARDS, S.; ELOIT, M.; GUÉRIN, B.; LENINHAN, P.; PERRIN, M.; RONSHOLT, L.; VAN OIRSCHOT, J.T.; VANOPDENBOSCH, E.; WELLEMANS, G.; WIZIGMANN, G. and THIBIER, M. A European comparative study of serological methods for the

diagnosis of infectious bovine rhinotracheítis. **Review Science Technology Office International Epizooties**, v. 12, n. 3, p. 969-984, 1993.

RAVAZZOLO, A.P.; PIZZOL, M.D.; MOOJEN, V. Evidência da presença de anticorpos para o vírus da Rinotraqueíte Infecçiosa dos Bovinos em alguns Municípios do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, v. 17, p. 89-95, 1989.

RIET-CORREA, G.; DUARTE, M.D.; BARBOSA, J.D.; OLIVEIRA, C.M.C.; CERQUEIRA V.D.; BRITO, M.F.; RIET-CORREA, F. Meningoencefalite e poliencfalomacia causadas por Herpesvírus bovino-5 no Estado do Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.26, n. 1, p. 44-46, 2006.

RISSI, D.R.; RECH, R.R.; FLORES, E.F.; KOMMERS, G.D.; BARROS, C.S.L. Meningoencefalite por herpesvírus bovino-5. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 7, p. 251-260, 2007.

RISSI, D.R.; PIEREZAN, F.; SILVA, M.S.; FLORES, E.F.; BARROS, C.S.L.N Neurological disease in cattle in southern Brazil associated with bovine herpesvirus infection. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, p. 346-349, 2008.

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

ROIZMANN, B.; DESROSIERS, R.C.; FLECKENSTEIN, B.; LOPEZ, C.; MINSON, A.C.; STUDDERT, M.J. The Family Herpesviridae: an up date. **Archives Virology**, v. 123, p. 425-448, 1992.

ROIZMANN, B. & KNIPE, M.D. Herpes simplex virus and their replication. **Field's Virology**, 4th Ed., United States: Lippincott Williams and Wilkins publishers, v. 1 and 2, 2001.

ROIZMANN, B. & PELLET, P.E. The family Hesperviridae, a brief introduction, **Field's Virology**, In: Knipe, M.D. & Howley, P.M. 5^a th ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, p. 2480-2497, 2007.

ROS, C. & BELÁK, S. Studies of Genetic Relationship between Bovine, Caprine, Cervine, and Rangiferine Alpha herpesviruses and Improved Molecular Methods for Virus Detection and Identification. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 5, p. 1247-1253, 1999.

RWEYEMAMU, M.M.; and LORETU, K. Isolation of "Non-syncytia forming" Herpes viruses from cattle in Tanzânia. **Journal Compendy Pathology**, v. 83, p. 377-386, 1973.

SÁ e SILVA, M.; BRUM, M.C.S.; WEIBLEN, R.; FLORES, E. Identificação e diferenciação de herpesvírus bovino tipos 1 e 5 isolados de amostras clínicas no Centro-Sul do Brasil, Argentina e Uruguai (1987-2006) **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 10, p. 403-408, 2007.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, p. 406-425, 1987.

SAMBROOK, J. & RUSSELL, D. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. **Cold Spring Harbor**

Laboratory Press, 3rd ed., 2001.

SANCHES, A.W.D.; LANGOHR, L.M.; STIGGER, A.L. Doenças do Sistema nervoso central em bovinos no Sul do Brasil. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 20, p. 113-118, 2000.

SCHUMANN, W. and FERREIRA, L.C. Production of Recombinant proteins in *Escherichia coli*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, n. 3, p. 442-453, 2004.

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

SILVA, L.A.F.; COELHO, K.O.; MACHADO, P.F.; SILVA, M.A.M.; MOURA, M.I.; BARBOSA, V.T.; BARBOSA, M.M.; GOULART, D.S. Causas de descarte de vacas da raça holandesa confinadas em uma população de 2083 bovinos (200-2003). **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, p. 383-389, 2008.

SMITH, P.C.; CUTLIP, R. C.; RITCHIE, A.E.; YONG, J.K. A Bovine Herpesvirus Associated with a Disease of the Upper Respiratory Tract of Feedlot Cattle. **Journal American Veterinary Microbiolgy**, v. 161, n. 10, p. 1134-1141, 1968.

SMITH, G.A.; YOUNG, P.L.; REED, K.C. Emergence of a new bovine herpesvirus 1 strain in Australian feedlots. **Archives of Virology**, v.140, p. 599-603, 1995.

SOUZA, V.F.; MELO, S.V.; ESTEVES, P.A.; SCHMIDT, C.S.R.; GONÇALVES, D.; SHAEFER, R.; SILVA.T.C.; ALMEIDA, R.S.; VICENTINI, F.K.; FRANCO, A.C.; OLIVEIRA, E.A.S.; SPILKI, F.R.; WEIBLEN, R.; FLORES, E.F.; LEMOS, R.A.; ALFIERI, A.A.; PITUCO, E.M.; ROEHE, P.M. Monoclonal antibody characterization of bovine herpesviruses types 1 (BHV-1) and 5 (BHV-5) **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 22, n. 1, p. 13-18, 2002.

SPILKI, F.R.; FRANCO, A.C.; TEIXEIRA, M.B.; ESTEVES, P.A.; SCHAEFER, R.; SCHMIDT, E.; LEMOS, R.A.; ROEHE, P.M. Bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) in a calf with rabies. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 23, n. 1, p. 1-4, 2003.

STRAUB, O.C. Infections bovine rhinotracheitis virus. In: Dinter, Z.; Morein, B. Virus Infections of Ruminants. Amsterdam: **Elsevier Science Publishers**, p. 71-108, 1990.

SUSAN, V.M.; OSUMA, M.; AGUILAR, R.E.; MURAKAMI, Y. Prevalence of Bovine herpesvirus-1, Parainfluenza-3, Bovine Rotavirus, Bovine Viral Diarrhea, Bovine Adenovirus-7, Bovine Leukemia Virus and Bluetongue Virus Antibodies in cattle in Mexico. **Japan Journal Veterinary Research**, v.31, 125-132, 1983.

TAKIUCHI, E.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A. Herpesvírus tipo 1: Tópicos sobre a infecção e métodos de diagnóstico. **Semina: Ciências Agrárias Londrina**, v. 22, n. 2, p. 203-209, 2001.

TEIXEIRA, M.B.; ESTEVES, P.A.; COELHO, C.S.S.; SILVA, T.C.; OLIVEIRA, L.G.; ROEHE, P.M. Diferenças em níveis de anticorpos neutralizantes contra herpesvírus bovino tipo 1(BoHV-1) e 5 (BoHV-5) por testes de soroneutralização. **Pesquisa Veterinaria Gaúcha**, v. 4, n. 1, p. 61- 65, 1998.

THEODORIDIS, A. Preliminary characterization of viruses isolated from cases of epididymitis and vaginitis in cattle. **Orderstepoort Journal Veterinary Research**, v. 45, p. 187-195, 1978.

THEODORIDIS, A. Studies on bovine Herpesviruses, Part 1. Isolation and Characterization of viruses isolates from the genital tract of cattle. **Orderstepoort Journal Veterinary Research**, v. 52, n. 4, p. 239-254, 1985.

TIKOO, S.K.; CAMPOS, M.; BABIUK, L.A. Bovine herpesvirus 1(BHV-1): biology, pathogenesis and control. **Advances in Virus Research**, v. 45, p. 191-223, 1995.

THIRY, E.; MEERSSCHAERT, C.; PASTORET, P.P. Epizootiologie des infections à herpesvirus chez les ruminants sauvages. I. Le virus de la rhinotrachéite Infectieuse bovine et les virus antigéniquement apparentés. **Revue d'Élevage Médecine Vétérinaire des Pays Tropical**, v. 41, n. 2, p. 113-120, 1988.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

TURIN, L.; RUSSO, S.; POLI, G. BHV-1: new molecular approaches to control a common and widespread infection. **Molecular Medicine**, v. 5, p. 261-284, 1999.

TURIN, L.; RUSSO, S. BHV-1 infections in cattle: an update. **Veterinary Bulletin**, v. 73, p. 16-21, 2003.

VIDOR, T. Herpes bovino tipo 1 (BHV-1): I. Sorologia de rebanhos com problemas reprodutivos. **Ciência Rural**, v. 25, n. 3, p. 421-424, 1995.

VOGEL, F.S.F.; CARON, L.; FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; WINKELMANN, E.R.; MAYER, S.V.; BASTOS, R.G. Distribution of bovine herpesvirus type 5 DNA in the central nervous systems of latently experimentally infected calves. **Journal Clinical Microbiology**, v. 41, n. 10, p. 4512-4520, 2003.

WEIBLEN, R.; BARROS, C.S.L.; CANABARRO, T.F. & FLORES, E.F. Bovine Meningoencephalitis from IBR virus. **Veterinary Research**, v. 124, p. 666-667, 1989.

WEIBLEN, R.; KREUTZ, L.C.; CANABARRO, T.F.; SCHUSC, L.F.; REBELATTO, M.C. Isolation of bovine herpesvirus 1 from preputial swabs and semen of bulls with balanoposthitis. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 4, n. 3, p. 341-343, 1992.

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, p. 5337-5346, 2000.

YATES, D.W.G. A review of infectious bovine rhinotracheitis, shipping fever pneumonia and viral-bacterial synergism in respiratory disease of cattle. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 46, p. 225-263, 1982.

ZAJAC, M.P.D.M.; LADELFA, M.F.; KOTSIAS, F.; MUYLKENS, B.; THIRY, J.; THIRY, E.; ROMERA, S.A. Biology of bovine herpesvirus 5. **The Veterinary Journal**, v. 184, p. 138-145, 2010.

ANEXOS I

1. Meio de Crescimento de Células em Meio 199/HAM F10

Meio 199	10,6 g
HAM F10	9,8 g
Água purificada	1000 mL

2. Solução de sacarose 0,34 M

Sacarose	11,6 g
Água purificada	100 mL

3. Solução de precipitação etanol 70%

Etanol P.A	70 mL
Água purificada estéril	30 mL

4. Acetato de sódio 3 M

Acetato de sódio	24,60 g
Água purificada estéril	100 mL

5. Solução de sacarose 30%

Sacarose	30 g
Água purificada q.s.p	100 mL

6. Preparo de *Primer* com 15pmol

<i>Primer</i>	7,5 µL
Água purificada estéril	42,5 mL

7. Preparo do DMSO

DMSO (Dimetilsulfóxido)	1,5 mL
Água purificada estéril	15 mL

8. Gel de agarose 1%

Agarose ultrapura	0,3 g
Tampão TBE	30 mL

9. Solução Tampão TBE

Tris 10 mM	140 µL
EDTA (Etilenodiaminatetracético) 1Mm	40 µL
Ácido Bórico	20 g
pH 7,2	

10. Solução de Loading

Sacarose	40 g
Azul de Bromofenol	6,5 g
Água purificada qsp	100 mL
Agitar até dissolver completamente o Azul de Bromofenol	
Corrigir o pH $7,0 \pm 0,2$ com Tris	

11. Preparação do Marcador de Massa Molecular

Tris 10 mM	140 µL
Azul de Bromofenol	40 µL
Marcador Massa Molecular (100pb, 1 kb e See Blue, Invitrogen)	20 µL

12. Solução de Revelação para gel de agarose

Brometo de Etídio	20 g
Água purificada	100 mL
Para utilizar direto no gel adicionar 0,5µL/mL	

13. Gel de agarose 2%

Agarose ultrapura	0,6 g
Tampão TBE	30 mL

14. Solução Trypsina

Trypsina	0,1 g
EDTA 10%	0,25 mL
PBS	95,75 mL

15. Solução Tampão de Adsorção

Bicarbonato de Sódio	2,93 g
Carbonato de Sódio	1,59 g
Água purificada	1000 mL
Estocar em temperatura de 2 a 8 °C	

16. Solução de Tampão TRIS

Cloreto de Sódio	8,7 g
EDTA	0,372 g
TRIS	6,05 g
Água purificada	1000 mL
Corrigir o pH para 7,4 com HCl	
Manter em temperatura de 2 a 8°C.	

17. Solução de Bloqueio (diluyente de amostra)

Albumina Bovina	30 g
Tween 20	1,5 mL
Tampão TRIS	1000 mL
pH 7,4	
Manter em temperatura de -20 °C.	

18. Solução de Tampão Citrato

Ácido cítrico	5,11 g
Fosfato de Sódio monobásico	9,15 g
Água purificada	1000 mL
pH 5,0	
Estocar em temperatura de 2 a 8 °C	

19. Solução Reveladora Cromógeno-substrato (OPD)

OPD	400 mg
Tampão Citrato	1000 mL
Obs. Esta solução deve ficar incolor	
Preparar na hora do uso	
Ou	

OPD (tablete de 2mg)	1 tab.
Tampão Citrato	5 mL

Obs. Esta solução deve ficar incolor

Preparar na hora do uso

20. Solução Reveladora com Peróxido de Hidrogênio

Peróxido de Hidrogênio	4 µL
------------------------	------

Solução reveladora (OPD)	10 mL
--------------------------	-------

Usar imediatamente após a preparação

21. Solução Lavagem (PBS – Solução Tampão Fosfatada)

Cloreto de Sódio	8,5 g
------------------	-------

Fosfato de Sódio monobásico	0,32 g
-----------------------------	--------

Fosfato de Sódio dibásico	110 g
---------------------------	-------

Água purificada	1000 mL
-----------------	---------

pH 7,2

22. Solução de Parada (STOP)

Ácido sulfúrico 1M	9,8 g
--------------------	-------

Água purificada	100 mL
-----------------	--------

Estocar em temperatura Ambiente

23. Solução Tampão para Gel para Imunodifusão

Cloreto de sódio	42,5 g
------------------	--------

Cloreto de potássio	0,1 g
---------------------	-------

Fosfato de sódio dibásico	0,6 g
---------------------------	-------

Fosfato de potássio monobásico	0,1 g
--------------------------------	-------

EDTA (titriplex) dissódico	0,186 g
----------------------------	---------

Azida Sódica	0,05 g
--------------	--------

Água purificada	500 mL
-----------------	--------

Àgar Noble	1,8 g
------------	-------

pH 7,2

Fundir em banho-maria e solidificar em temperatura ambiente, depois manter em temperatura de 2°C a 8 °C.

24. Meio RPMI – Base para Hibridomas

Meio de RPMI	8,5 g
Bicarbonato de sódio	1,6 g
Água purificada	1000 mL
pH 7,2	

25. Solução estoque de 8-Azaguanina 5mg/mL (250X)

8-Azaguanina	10 mg
Meio Enriquecido de RPMI (Anexo I-26)	10 mL

26. Meio Enriquecido de RPMI

SFB (soro fetal bovino) 10%	100 mL
Sulfato de Gentamicina 40µg/mL	0,28 mL
Anfotericina B (2,5µg/mL)	0,25 mL

Obs.: Adicionar ao meio RPMI 8-Azaguanina apenas para crescimento de Mielomas

8- Azaguanina 1mg/mL	1 0 mL
----------------------	--------

Este meio tem uma alta taxa de glicose 4.5g/L

Filtrar em Membrana 0,22µm, realizar teste de esterilidade, alicotar e armazenar de 2 a 8°C.

27. Solução de Polietilenoglicol DMSO - PEG 50% W/V

PEG 6000	50 mL
PBS	50 mL

28. Solução de estoque Aminopterín (50X)

Aminopterín	0.088 mg
Meio Enriquecido de RPMI (Anexo I-26)	10 mL

29. Solução estoque-HAT

Hipoxantina	6,8 mg
Timidina	1,94 mg
Aminopterín	0,88 mg

Meio Enriquecido de RPMI (Anexo I-26) 10 mL

30. Solução estoque de Hipoxantina/Timidina (100X)-HT

Hipoxantina 6,8 mg

Timidina 1,94 mg

Meio Enriquecido de RPMI (Anexo I-26) 10 mL

31a. Meio SOC

Triptona 20 g

Extrato de levedura 5 g

Cloreto de Sódio 0,5 g

Cloreto de potássio 2,5 mM

Cloreto de Magnésio 7 mM

Glicose 20 mM

Água destilada 1000 mL

Ajustar pH para 7,0

31b. Solução de PBS 50X

Fosfato de sódio dibásico 60 g

Fosfato de Potássio monobásico 10 g

Cloreto de Potássio 10 g

Água purificada 1000 mL

32. Tampão de Bloqueio

Leite em pó desnatado 0,5 g

Solução TBS 10 mL

33. PBS (Phosphate Buffer Solution) diluído

Cloreto de Sódio 40 g

PBS 50x 100 mL

Água deionizada 5000 mL

Estocar em temperatura Ambiente

34. Acetona 20%

Acetona	20 mL
PBS	80 mL
35. Solução TBS (solução de lavagem) 0,05%	
Solução de PBS - para uso	100 mL
Tween 20	50 µL
36. Solução TBS (solução de lavagem) 0,3%	
Solução de PBS - para uso	100 mL
Tween 20	300 µL
37. Ágar LB (Luria-Bertani, sigma 12780-052)	
Meio LB	20 g
Ágar bacteriológico	15 g
Canamicina	1 g
Água purificada	1000 mL
38. Caldo LB (Luria-Bertani, Sigma 12780-052)	
Meio LB	20 g
Canamicina	1 g
Água purificada	1000 mL
39. Cloreto de Cálcio 0,1 M	
Cloreto de Cálcio	11,1 g
Água purificada	1000 mL
Para conservação de clone recombinante acrescentar 15% de glicerol	
40. Cloreto de Cálcio 0,1 M com glicerol	
Cloreto de Cálcio	11,1 g
Glicerol	150 mL
Água purificada	1000 mL
41. Solução de IPTG (isopropyl -β-D-1-thiogalactopiranosideo) 80mM	
IPTG	1,906 g

Água purificada	1000 mL
42. Solução corante de comassie 250G	
Azul de Comassie	0.1 g
Ácido Acético	7,5 mL
Água purificada	45 mL
43. Solução descorante de comassie 250G	
Metanol	4,0 g
Ácido Acético	7,5 mL
Água purificada	45 mL
44. Tampão de Amostra	
Tris 1M pH 8,0	4 mL
Glicerol 100%	4 mL
EDTA 0,5 M	0,2 mL
Azul de Bromofenol 1%	0,4 mL
Água purificada	114 mL
Acondicionar em frasco escuro em pequenos volumes, manter a -20°C.	
45. Gel de Acrilamida 10 %	
Água purificada	3,05 mL
Acrilamida/bisacrilamida (29/1)	2,5 mL
Tris 1,5 M pH8,8	1,8 7 mL
SDS 20%	37,5 µL
APS 20%	37,5 µL
Temed	3 µL
46. Gel Concentrador 4%	
Água purificada	425 mL
Acrilamida/bisacrilamida (29/1)	1,75 mL
Tris 1,0 M pH6,8	312,5 mL
SDS 20%	12,5 µL
APS 20%	12,5 µL

Temed	2,5 µL
47. Marcador de massa Molecular See Blue Plus 2 prestained Standard Cat. LC 5925 – Invitrogen	5 µL
48. Tampão de Corrida 5X	
Tris base	15,1 g
Glicina	94 g
SDS	5 g
Água purificada	1000 mL
49. Tampão de Transferência para Western Blotting	
Solução TBS	80 mL
Metanol (no momento de uso)	20 mL
50. Solução Tampão de Equilíbrio e lavagem da coluna durante o processo	
Fosfato de sódio monobásico (50mM)	0,720 g
Cloreto de sódio (300mM)	5,260 g
Imidazol (5mM)	0,102 g
Uréia (8M)	144,144 g
Água purificada estéril	300 mL
pH 7,4 corrigido com HCl ou NaOH	
51. Solução Tampão de Eluição	
Fosfato de sódio monobásico (50mM)	0,480 g
Cloreto de sódio (300mM)	3,506 g
Imidazol (150mM)	2,042 g
Uréia (8M)	96,096 g
Água purificada	200 mL
pH 7,4 corrigido com HCl ou NaOH	
52. Solução de etanol 20%	
Etanol P.A	20 mL
Água purificada estéril	80 mL

53. Solução Tampão de Lavagem final da Coluna

Fosfato de sódio monobásico (50mM)	0,720 g
Cloreto de sódio (300mM)	5,260 g
Imidazol (5M)	0,102 g
Água purificada estéril	300 mL
pH 7,4 corrigido com HCl ou NaOH	

54. Solução de Uréia 8M

Uréia (8M)	96,096 g
Água purificada estéril	200 mL

55. Solução Reveladora (substrato)

Solução estoque Carbazole	0,3 mL
Tampão acetato	5 mL
Peróxido de Hidrogênio 10V (H ₂ O ₂)	15 µL

56. Solução estoque Carbazole

Aminoetil Carbazole	0,16 g
n'n'dimetilformamida	24 mL

57. Tampão Acetato (pH 5,0)

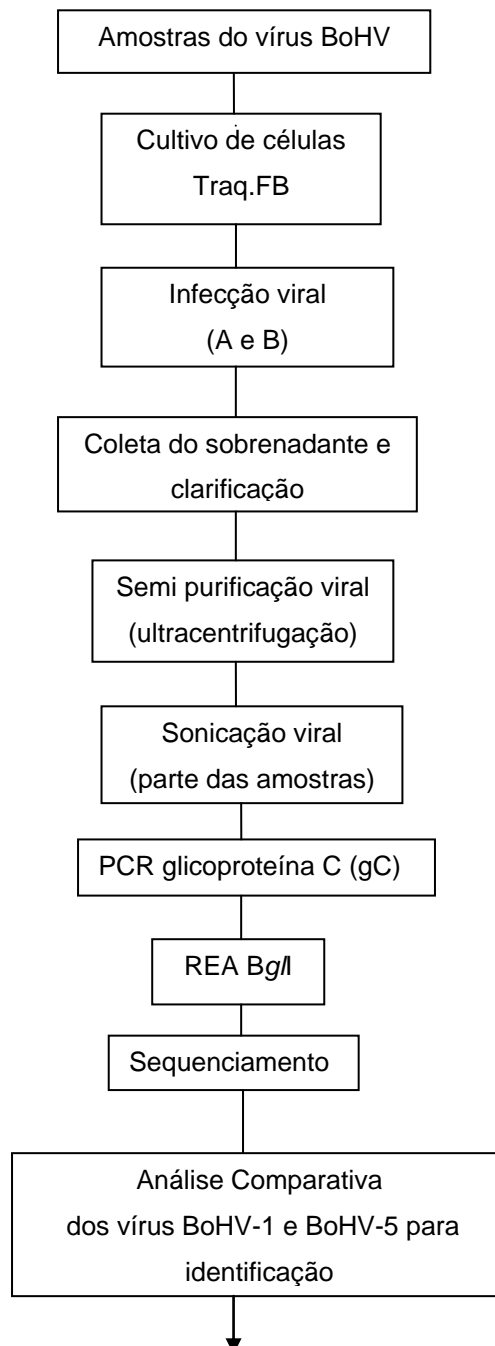
Ácido Acético glacial	0,89 mL
Acetato de Sódio	2,89 g
Água purificada qsp	1000 mL

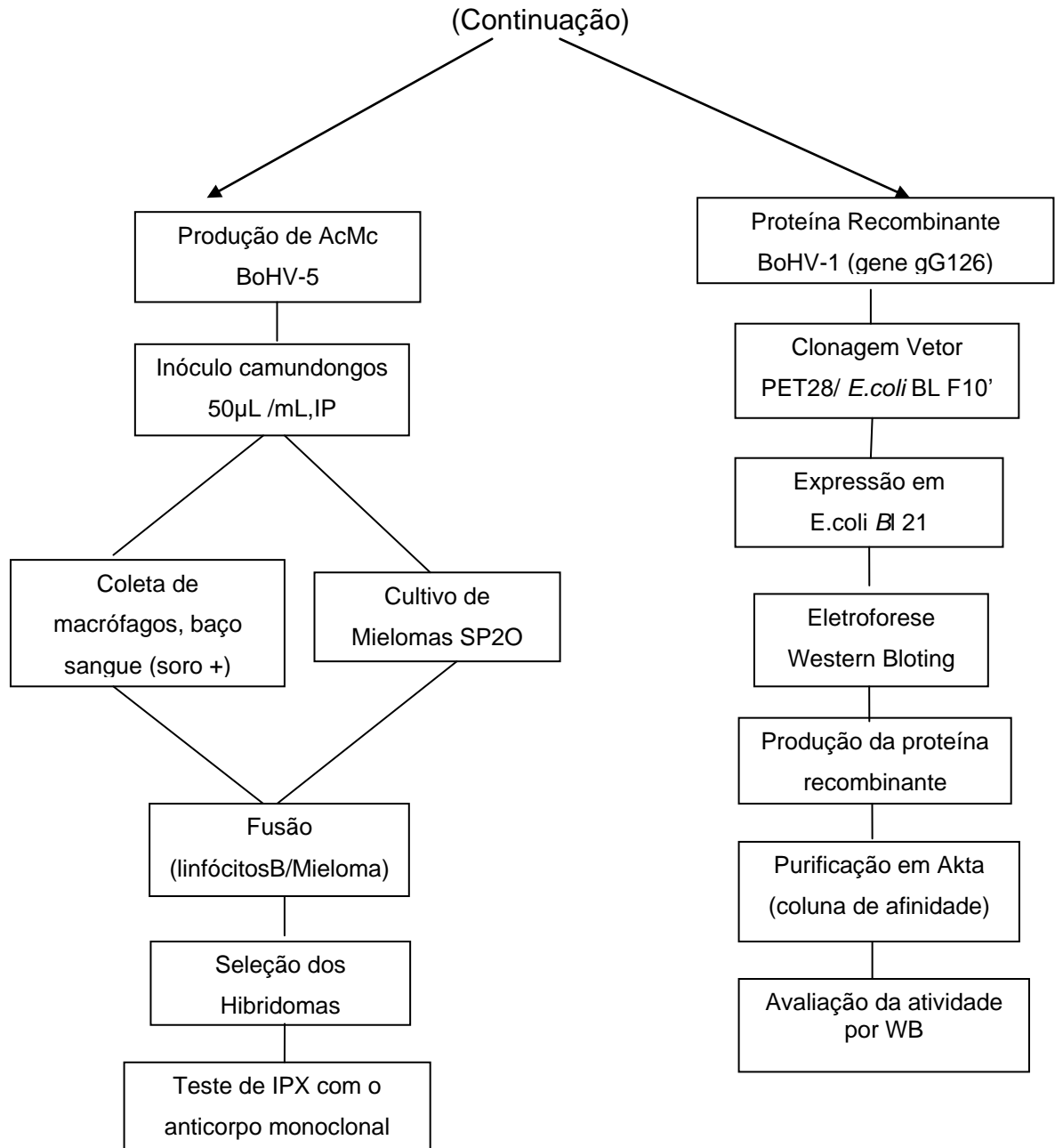
58. Solução de SDS 0,1%

SDS (dodecyl sulfato de sódio)	1,0 g
Água purificada estéril	100 mL

ANEXO II**FLUXOGRAMA DA CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS E PRODUÇÃO DE INSUMOS PARA IMUNODIAGNÓSTICO DE HERPESVIRUS BOVINO 1 E 5**

Etapas realizadas para a caracterização de amostras virais (capítulo II), produção de anticorpo monoclonal anti-BoHV-5 (capítulo III), e produção de uma proteína recombinante para BoHV-1.





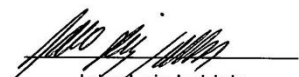
ANEXO III

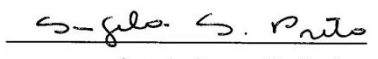
Autorização do Comitê de ética do Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR) para utilização dos Animais

Declaração

Declaramos para os devidos fins que a funcionária, Tânia Regina Penha, lotada na Divisão de antígenos e e matriculada no curso de doutorado do Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade federal do Paraná está autorizada pelo Comissão de ética no Uso de Animais do Tecpar (em implantação) a utilizar o protocolo de trabalho pré estabelecido para obtenção da anticorpos monoclonais para o desenvolvimento do trabalho de tese intitulado "Produção de insumos para diagnóstico de herpesvirus bovino.

Curitiba, 04 de Março de 2010.


Jairo Luiz Labiak
Coordenador CEUA/TECPAR


Angela Aparecida Preto
Vice Coordenador CEUA/TECPAR

about:blank

ExpressoLivre - ExpressoMail

Remetente: "Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal" <concea@mct.gov.br>
Para: "Angela Aparecida Preto" <aapreto@tecpa.br>
Data: 06/04/2010 11:16
Assunto: Re: Credenciamento do CEUA - Tecpar - Fale com o CONCEA

Prezada Angela,

O sistema para Cadastro das Instituições de Uso Científico de Animais - CIUCA está na fase de ajustes (módulo I - cadastro) para ser disponibilizado *on line* na página do CONCEA (concea.mct.gov.br).

Conforme o art. 60 do Decreto 6899/2009, "o credenciamento e o licenciamento de que tratam o inciso II do art. 5o e o art. 11 da Lei no 11.794, de 2008, respectivamente, só serão exigíveis após a sua implementação pelos órgãos competentes."

Atenciosamente,

Secretaria Executiva do CONCEA

Angela Aparecida Preto escreveu:

Prezados, A CEUA Tecpar foi criada em 31/03/010 e gostaríamos de saber como proceder para efetivar o credenciamento da mesma junto ao CONCEA.
Atenciosamente, Angela A. Preto - GQ/BPF do Instituto de Tecnologia do Paraná - TECPAR.