

Utilização de parte da região codificadora da glicoproteína b na diferenciação do herpesvírus bovino 1.1, herpesvírus bovino 1.2 e herpesvírus bovino 5

[Utilization of part of the region which codes for glycoprotein b in bovine herpesvirus 1.1, bovine herpesvirus 1.2 and bovine herpesvirus 5]

E.A. Costa¹, E.F. Barbosa-Stancioli², R.C. Leite¹, G.D.R. Oliveira¹, M.A. Rocha^{1*}

¹Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais
Caixa Postal 567
30123-970 - Belo Horizonte, MG

²Instituto de Ciências Biológicas – UFMG - Belo Horizonte, MG

RESUMO

Utilizou-se uma reação em cadeia de polimerase (PCR) previamente desenvolvida para a amplificação de parte da região única longa 27 (UL27) do genoma de herpesvírus bovino 1.1 (BoHV-1), que codifica a glicoproteína B, buscando a diferenciação entre isolados de BoHV-1.1 e BoHV-5. Os produtos de PCR gerados a partir de isolados de BoHV-1.1 e BoHV-5 mostraram padrão de amplificação diferenciado em seus tamanhos moleculares. Analisando as seqüências de nucleotídeos dos produtos de PCR obtidos de dois isolados de BoHV-5, juntamente com as seqüências dos produtos de PCR obtidos de um isolado de BoHV-1.1 e de três isolados de BoHV-1.2, previamente depositados no GenBank, verificou-se que a diferença observada na amplificação se deve ao número de repetições de G-C presentes no final da região codificadora da gB, particularmente nas seqüências 5'-G(A/T)CC-3'. A análise dessas seqüências-motivo desponta como uma ferramenta auxiliar na diferenciação entre isolados de BoHV-1.1, BoHV-1.2 e BoHV-5.

Palavras-chave: BoHV-1.1, BoHV-1.2, BoHV-5, gB, PCR, seqüências-motivo

ABSTRACT

A previously-developed PCR was used for the amplification of part of the UL27 region of the BoHV-1.1 genome, which codes for glycoprotein B, seeking the differentiation between BoHV-1.1 and BoHV-5 isolates. The PCR products generated from the BoHV-1 and BoHV-5 isolates showed a pattern of differentiated amplification of their molecular size. The PCR of the BoHV-5 products were sequenced and the results compared with the sequence of the BoHV-1.1 and BoHV-1.2 isolates previously deposited in the GenBank. It was verified that the difference between the PCR products is due to greater number of repetitions of G-C present at the end of the gB codifier region. The most common repeat sequences were 5'-G(A/T)CC-3'. The analysis of these repetitions was shown to be an auxiliary tool in the differentiation between BoHV1.1, BoHV-1.2 and BoHV-5 isolates.

Keywords: BoHV-1.1, BoHV-1.2, BoHV-5, gB, motifs

Recebido para publicação em 5 de julho de 2003

Recebido para publicação, após modificações, em 24 de novembro de 2004

*Autor para correspondência

E-mail: rochama@vet.ufmg.br

INTRODUÇÃO

O herpesvírus bovino-1 (BoHV-1), causador da rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), tem sido alvo de estudos em várias partes do mundo, devido ao impacto extremamente negativo da infecção por esse vírus na pecuária bovina. A infecção pelo BoHV-1 caracteriza-se por diversas formas clínicas, incluindo doença respiratória, vulvovaginite, balanopostite, encefalite, diminuição nos índices de fecundação e queda brusca na produção de leite. O BoHV-1 é classificado em três subtipos: subtipo 1 (BoHV-1.1), relacionado a infecções no trato respiratório e reprodutivo, subtipo 1.2a (BoHV-1.2a) e subtipo 1.2b (BoHV-1.2b), ambos relacionados a infecções no trato reprodutivo (Engels et al., 1981). O herpesvírus bovino-5 (BoHV-5), inicialmente classificado como BoHV-1.3, está relacionado a infecções neurológicas e vem sendo também alvo de diversos estudos (Roizman et al., 1992).

O BoHV-1 e o BoHV-5 pertencem à família Herpesviridae, subfamília *Alphaherpesvirinae* e apresentam como principal característica um cerne contendo DNA linear de fita dupla e um capsídeo icosadeltahédrico de aproximadamente 100nm de diâmetro, contendo 162 capsômeros. O BoHV-1 e o BoHV-5 apresentam um conteúdo de G+C de 72% e seus genomas são formados por um segmento longo único (UL: *unique long*) e um segmento curto único (US: *unique short*), flanqueado por dois segmentos repetidos invertidos (Engels et al., 1981). Os genomas desses vírus apresentam 85% de homologia, o que dificulta sua diferenciação pelas técnicas tradicionais de diagnóstico (Rós e Belák, 1999). Estudos de mapeamento do genoma de alguns isolados de BoHV-1 e BoHV-5, utilizando a restrição enzimática, mostraram ser este um dos melhores métodos para diferenciar isolados. Entretanto, Nadin-Davis e colaboradores (1996) apontam que somente ensaios de restrição enzimática não conseguem correlacionar os tipos genéticos virais e os sinais clínicos apresentados pelos animais infectados.

O gene que codifica a glicoproteína B (gB) tem se mostrado adequado para o estudo de relações genéticas entre vários tipos de alphaherpesvirus de ruminantes, como os BoHV-1, BoHV-5,

herpesvírus cervídeo 1, herpesvírus caprino 1 e também do herpesvirus simplex humano 1 e 2. A existência de várias seqüências disponíveis para essa região do vírus favorece o estudo comparativo de novos isolados, inclusive no que concerne ao desenvolvimento de testes sorodiagnóstico específicos (Rós e Belák, 2002)

Este trabalho objetivou diferenciar isolados de herpesvírus bovinos 1.1, 1.2 e 5, utilizando a região gênica UL27, codificadora da gB.

MATERIAL E MÉTODOS

A amostra padrão mundial de BoHV-1.1: Colorado/ Cooper (ATTC-VR 864), quinta passagem, e dois isolados de BoHV-5, A663 e EVI-88, ambos na nona passagem, foram utilizados neste estudo. As células MDBK foram cultivadas no meio Mínimo Essencial de Eagle (MEM), suplementado com soro fetal bovino (SFB) inativado e livre do vírus da diarreia bovina. Para a inoculação viral, utilizou-se a monocamada celular com uma confluência de 80%.

A amostra EVI-88, isolada de um surto de meningoencefalite no sul do Brasil, foi caracterizada em 1997 (ROEHE et al., 1997). A amostra A663, isolada na Argentina durante um surto de meningoencefalite em bezerras (Carrillo et al., 1983), foi caracterizada posteriormente (Metzler et al., 1986).

A PCR foi realizada diretamente a partir do sobrenadante do cultivo celular. Foram utilizados os iniciadores desenhados por Nadin-Davis et al. (1996), baseados em parte da seqüência da região única longa (UL27), codificadora da gB, do genoma do BoHV-1 descrita por Whitbeck (1988). O iniciador senso 5'-AAGTGCACACCGTGTTATTTGCG-3' (posição 241-264) e o iniciador anti-senso 5'-TTGCATTACTTTTGGGGTCAAATGTG-3' (posição 563-588) geram um produto de 308 pb, quando utilizados para amplificar isolados de BoHV-1.1.

As reações foram realizadas segundo Nadin-Davis et al. (1996) com modificações, em um volume total de 20µl, contendo tampão da Taq 10X, 10 pmol de cada iniciador, glicerol 1%

(v/v), dNTPs 200µM, 1U de Taq DNA polimerase, 2µl de sobrenadante de cultivo celular infectado e água qsp para 20µl. A concentração de MgCl₂ foi testada variando entre 1,5 e 2,5mM, sendo escolhida a concentração de 1,5mM. Cada reação de 20µl foi dividida em duas partes: a primeira (MIX 1) contendo o tampão 10X, MgCl₂, glicerol, cada iniciador, 2µl da amostra e água qsp para 16µl, e a segunda (MIX 2) contendo a taq DNA polimerase, dNTPs e água qsp para 4µl, que foi adicionada ao tubo, atravessando o óleo mineral após uma etapa inicial a 98°C por seis minutos. O programa utilizado consistiu de cinco ciclos de 95°C por um minuto, cinco ciclos de 55°C durante um minuto, 72°C por um minuto, seguido de 35 ciclos de 95°C por um minuto, 60°C por um minuto, 72°C por dois minutos, e uma etapa final de extensão de seis minutos a 72°C. Dez microlitros de cada reação de PCR foram submetidos à eletroforese (120V por 1 hora) em géis de poliacrilamida 6% , corridos em tampão TBE (89mM Tris-Borato, 2mM EDTA, pH8,2) e corados pela prata segundo Dias Neto (1996). Para determinação do tamanho dos produtos de PCR foram incluídos em cada corrida um marcador de tamanho molecular, sendo utilizados o pGEM¹, com fragmentos variando entre 36 a 2645 pares de base (Rocha et al., 1999). O gel foi fotografado com o auxílio do equipamento Image MasterTM VDS².

Os produtos dos isolados A663 e EVI-88 foram novamente amplificados em um volume de 50µl. A banda desejada foi visualizada mediante a incidência de luz ultravioleta (320nm) em gel de agarose 1% corado por brometo de etídio, retirada do gel com o auxílio de bisturi e colocada em tubo de 1,5ml para purificação. A banda retirada foi cortada sucessivamente, seguida do congelamento a 70°C durante 10

minutos e centrifugação a 15.000rpm durante cinco minutos. O sobrenadante foi colocado em um tubo de 1,5ml novo e estéril, e estocado até o uso a 4°C. Os produtos de PCR purificados foram seqüenciados pela Bioagro – Universidade Federal de Viçosa, obtendo-se pelo menos três seqüências para cada isolado, as quais foram analisadas utilizando os programas BLASTN, BLASTN gapped e BLASTX, disponíveis no endereço eletrônico do National Center for Biotechnology Information (NCBI)³, e depositadas no GenBank (NCBI)³.

As seqüências de BoHV-5 editadas foram alinhadas com três seqüências de BoHV-1.2 (Nos. de acesso U14106, U14105 e U14107) e uma de BoHV-1.1 (Z78205), previamente depositadas no GenBank (NCBI)³. O alinhamento foi feito com o auxílio do programa ClustalW⁴.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao analisar os amplicons em géis de poliacrilamida 6% corados pela prata, observou-se que o isolado de BoHV-1.1 (Colorado) gerou um produto de PCR de 308 pb e os isolados de BoHV-5 (A663 e EVI-88) geraram um produto de PCR de 352 pb (Fig. 1). Nessa primeira análise, verifica-se que os herpesvírus bovinos tipos 1 e 5 apresentaram diferenças nessa região gênica, resultado já observado para amostras de BoHV-1.1 e BoHV-1.2 por Nadin-Davis et al. (1996).

Após a edição, as seqüências dos isolados de BoHV-5 (A663 e EVI-88) foram depositadas no *GenBank*. A seqüência da A663 recebeu o número de acesso AY185365 e amostra EVI-88 ainda não se encontra disponível. As seqüências de BoHV-5 apresentaram 100% de similaridade entre si, o que pode ser observado na Fig. 2.

¹ Promega, EUA.

² Amersham Pharmacia Biotech, Suécia.

³ NCBI – Bethesda, MD, EUA. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>

⁴ ClustalW. Disponível em: <<http://clustalw.genome.ad.jp/>>

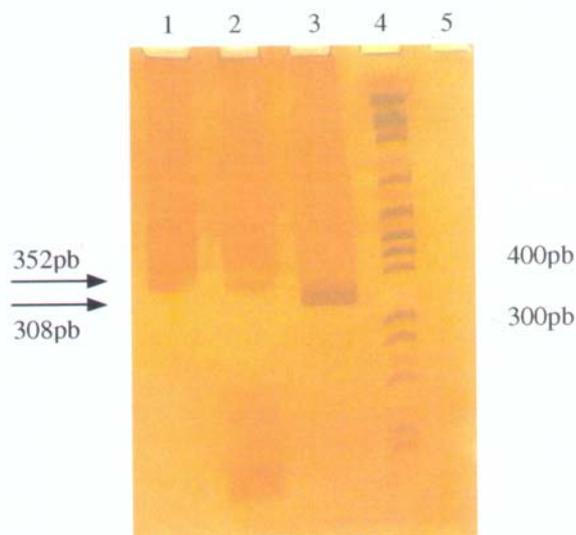


Figura 1. Análise dos produtos de PCR (seqüência parcial da região UL27, que codifica para a gB) em gel de poliacrilamida 6%, corado pela prata. Canaleta 1 – EVI-88 (BoHV-5), canaleta 2 – A663 (BoHV-5), canaleta 3 – Colorado (BoHV-1.1), canaleta 4 – padrão de tamanho molecular (pGEM), canaleta 5 – controle negativo (master mix)

Ao analisar a seqüência dos fragmentos amplificados das amostras de BoHV-5 (A663 e EVI-88), foram encontradas duas seqüências-motivo, presentes em maior quantidade: 5'-G(A/T)CC- 3' e 5'-TTCCC(C/-)GCC(C/-) (Fig. 2). Seqüências-motivo (*motifs*) são seqüências curtas, de aproximadamente 4 a 20pb, que se encontram repetidas ao longo do genoma, de forma difusa, ou seja, espalhadas aleatoriamente ou enfileiradas uma após a outra, ou em série (*in tandem*) (Umene et al., 1991). Nadin-Davis et al. (1996) também verificaram a presença dessas duas seqüências-motivo ao analisarem a mesma região em seqüências de BoHV-1.1 e BoHV-1.2. Todos os isolados de BoHV-1.1 estudados por esses pesquisadores apresentaram seqüências idênticas entre si. De maneira interessante, esse comportamento não foi verificado nos isolados de BoHV-1.2, os quais apresentaram diferenças entre suas seqüências, principalmente no tocante ao tamanho molecular. Os isolados de BoHV-1.2: (K22, F1 e M) geraram produtos de 348 pb, 338 pb e 337 pb, respectivamente. As seqüências de BoHV-5 geradas no presente trabalho em comparação com as seqüências de BoHV-1.1 e BoHV-1.2 utilizadas no alinhamento (Fig. 2) mostraram maior número de seqüências-motivo. Provavelmente, em razão do maior número de

repetições, os produtos de PCR obtidos dos isolados EVI-88 e A663 apresentaram maior tamanho molecular, podendo ser visualmente diferenciados no gel de poliacrilamida (Fig. 1).

Verificou-se a ocorrência de uma seqüência-motivo maior, denominada de grande-motivo, composta pelas seqüências curtas encontradas anteriormente, orientados da seguinte maneira: GACC-GTCC- TTCCCCGCC -GACC. Essa orientação ou grande-motivo está localizada entre os nucleotídeos de número 465 ao 518 (número de acesso no GenBank: U14106) e varia no seu tamanho de acordo com a variação no número de cópias de GTCC localizados em série. As repetições de GTCC no grande-motivo para as seqüências de BoHV-5 (A663 e EVI-88) foram em número de cinco. A seqüência do BoHV-1.1 (Colorado) apresentou uma única repetição de GTCC e as seqüências de BoHV-1.2 (K22 e M1) apresentaram quatro repetições, em contraste com a seqüência do isolado F1, que apresentou somente uma repetição de GTCC. As seqüências dos isolados de BoHV-5 apresentaram o maior número de repetições de GTCC em série no *grande-motivo* quando comparadas com os isolados de BoHV-1.2 e BoHV-1.1 (Fig. 2).

Utilização de parte da região codificadora da glicoproteína b...

```

EVI-88      AAGTGCACACCGTGTTATTTGCGGCTGTTTGTTTTTCCTGGAGGCGGGACGTGCGCGCG
A663      .....
K22      .....-.....
M      .....-.....
Fi      .....-.....
Colorado   .....-.....
*****

EVI-88      AGCTCGGCCGGATTAGGGTTCGGCGCCACCCGGGCACGGCAGGGCACCCTTTACTTATGT
A663      .....
K22      .....---.G.....
M      .....G.....
Fi      .....G.....
Colorado   .....G.....
*****

EVI-88      TTGGCGCGGGTGGCTCCGGCACCCGGTCTCCGTGGCCCTCCCCCGCCTTTGCGTTTATT
A663      .....
K22      .....
M      .....
Fi      .....
Colorado   .....T.....
*****

EVI-88      GTCCAGCTGTGTTCCCGCCTTTGCGTGGCCCCCTCCTCGCCGACCGTCCG--TCCGT
A663      GTCC.....TTCCCGCC.....GACCGTCCG--TCCGT
K22      GTCC.....TTCCCGCC.....C.....GACCGTCCG--TCCGT
M      GTCC.....TTCCCGCC.....C.....GACCGTCCG--TCCGT
Fi      GTCC.....T.....C.....GACCGTCCG--TCCGT
Colorado   GTCC.....TTCCCGCC.....-.....GACCG-----
*****

EVI-88      CCGTCCGTCCCTTCCCCGCCCGACCGTCCCTTCCCGCCCGCCTTTTCCCGCCCGCCTTTTC
A663      CCGTCCGTCCCTTCCCCGCCCGACCGTCCCTTCCCGCC.....TTCCCGCC.....
K22      CCGTCCCTTCCCCGCCCGACCAT..TTCCCGCCCGACCGTCC..C.....C.....
M      CCGTCCCTTCCCCGCCCGACCG-----GTCCGTCC..C.....
Fi      .....GACCGTCCCTTCCCCGCCCGACCGTCC..C.....
Colorado   -----GACCGTCCCTTCCCCGCCCGACCGTCC..C-----
          **** ** * ** * ** *

EVI-88      CCGGCGCGCCCCCTCCCGCGCCACAAAGCACATTTGACC CAAAAGTAATGCAA
A663      .....GACC.....
K22      ...A.A.....GACC.....
M      ...T.....GACC.....
Fi      .....-.....GACC.....
Colorado   -.....T.....GACC.....
          ** * ** * ** *
    
```

Figura 2. Alinhamento da sequência parcial do gene (UL27) que codifica para a gB. As seqüências das amostras de BoHV-5 (A663 e EVI-88) foram efetuadas durante este trabalho, tendo sido a seqüência da amostra A663 depositada no GenBank sob o número de acesso AY185365. As demais amostras encontravam previamente depositadas por outros autores e são: BoHV-1.2 - U14106 (K22), U14107 (M) e U14105 (F1) e do BoHV-1.1: Z78205 (Colorado). Visualização das seqüências-motivo presentes dentro do grande motivo (em vermelho) e das seqüências-motivo C(G/T)CC e TTCCC(C)GCC(C) que estão localizadas de forma aleatória, fora do grande-motivo (em azul e em verde, respectivamente).

Foi possível diferenciar os isolados de BoHV-1.2 em subtipos a, b, pois a seqüência de K22 teve comportamento diferente da seqüência de F1. Com a metodologia utilizada, este resultado é semelhante aos de Miller et al. (1984) e Miller et al. (1991) que classificaram o isolado K22 como BoHV-1.2b e o isolado F1 como BoHV-1.2a, ao utilizarem ensaios de restrição enzimática. As seqüências dos isolados K22 e M apresentaram cinco repetições em série da seqüência-motivo CGCC dentro do *grande-motivo*. A seqüência do isolado F1 apresentou apenas uma repetição, estando mais próxima, neste ponto, das seqüências dos isolados de BoHV-1.1 (Fig. 2). A seqüência do isolado F1 apresentou maior número de seqüências-motivo contidas aleatoriamente fora do *grande-motivo* do que as seqüências dos isolados de BoHV-1.1., assemelhando-se neste ponto com as seqüências dos isolados de BoHV-1.2. Essa semelhança que a seqüência do isolado F1 apresenta com as seqüências dos isolados de BoHV-1.1 também pode ser verificada em relação aos sintomas clínicos descritos por vários autores. Somente os isolados de BoHV-1.1 e BoHV-1.2a são considerados causadores de abortos, sendo diferentes dos isolados de BoHV-1.2b que não causam aborto (Miller et al.,1988; Miller et al.,1991; Engels et al.,1981). Além da seqüência curta GTCC dentro das repetições em grande motivos já discutidas, foi possível, ainda, a diferenciação entre os isolados de BoHV-1.1, BoHV-1.2 e BoHV-5, juntamente com a comparação das variações do número de cópias das seqüências-motivo contidas aleatoriamente no genoma que codifica a gB. O isolado M foi classificado como BoHV-1.2 (Nadin-Davis et al., 1996), mas os autores não subclassificaram a amostra em 1.2a ou 1.2b. O fato de o isolado M ter se comportado de maneira similar ao isolado K22 (BoHV-1.2b) no que se refere ao estudo das seqüências-motivo, sugere que esse isolado possa ter o mesmo subtipo desse. Neste trabalho, as amostras de BoHV-5: A663 e EVI-88 comportaram-se de maneira idêntica na análise das seqüências-motivo. Como relatado por Carrillo et al. (1983) e Roehe et al. (1997) para as amostras A663 e EVI-88, respectivamente, elas foram isoladas durante surtos de meningoencefalite. A análise das seqüências de DNA demonstrou que as seqüências-motivo contidas em parte do gene que codifica a gB são uma ferramenta promissora para a diferenciação

entre isolados de BoHV-1.1, BoHV-1.2 e BoHV-5.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CARRILLO, B.J.; POSPISCHIL, A.; DAHME, E. Pathology of a bovine viral necrotizing encephalitis in Argentina. *Zbl. Vet. Med. B.*, v.30, p.161-168, 1983.
- CLUSTAL W (online). Available from world wide web. Disponível em: <<http://clustalw.genome.ad.jp>>.
- DIAS NETO, E.; RAHAL, P.; CABALLERO, O.L.S.D. et al. DNA ligation quality control by competitive PCR. *Trends Genet.*, v.12, p.341-342, 1996.
- ENGELS, M.; STECK, F.; WYLER, R. Comparison of the genomes of infectious bovine rhinotracheitis and infectious pustular vulvovaginitis virus strain by restriction endonuclease analysis. *Arch. Virol.*, v.67, p.169-174, 1981.
- METZLER, A.E.; SCHUDEL, A.A.; ENGELS, M. Bovine herpesvirus 1: molecular and antigenic characteristics of variant viruses isolated from calves with neurological disease. *Arch. Virol.*, v.87, p.205-217, 1986.
- MILLER, J.M.; VAN DER MAATEN, M.J. Reproductive tract lesions in heifers after intrauterine inoculation with infectious bovine rhinotracheitis virus. *Am. J. Vet. Res.*, v.45, p.790-794, 1984.
- MILLER, J.M.; VAN DER MAATEN, M.J.; WHETSTONE, C.A. Abortifacient property of bovine herpesvirus type 1 isolates that represent three subtypes determined by restriction endonuclease analysis of viral DNA. *Am. J. Vet. Res.*, v.52, p.458-461, 1991.
- MILLER, J.M.; VAN DER MAATEN, M.J.; WHETSTONE, C.A. Effects of a bovine herpesvirus-1 isolate on reproductive function in heifers: Classification as a type-2 (infectious pustular vulvovaginitis) virus by restriction

- endonuclease analysis of viral DNA. *Am. J. Vet. Res.*, v.49, p.1653-1656, 1988.
- NADIN-DAVIS, S.A.; LUTZE-WALLACE, C.; ZHONG, X. Bovine herpesvirus 1 isolates contain variable copy numbers of GC-rich tandem repeats in the gI non-coding regions of their genomes. *Virus Gene*, v.13, p.263- 268, 1996.
- ROCHA, M.A.; BARBOSA, E.F.; GUEDES, R.M.C. et al. Detection of BHV-1 in a naturally infected bovine fetus by a nested PCR assay. *Vet. Res. Communic.*, n.23, p.133-141, 1999.
- ROEHE, P.M.; SILVA, T.C.; NARDI, N.B. et al. Diferenciação entre os vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (BHV-1) e herpesvirus da encefalite bovina (BHV-5) com anticorpos monoclonais. *Pesq. Vet. Bras.*, v.17, p.41-44, 1997.
- ROIZMAN, B.; DESROSIERS, R.C.; FLECKENSTEIN, B. et al. The family Herpesviridae: an update. Virology Division News. *Arch. Virol.*, v.123, p.425-449, 1992.
- RÓS, C.; BELÁK, S. Characterization of glycoprotein B gene from ruminant alphaherpesviruses. *Virus Gene*, v.24, p.99-105, 2002.
- RÓS, C.; BELÁK, S. Studies of genetic relationships between bovine, caprine, cervine and rangiferine alphaherpesviruses and improved molecular methods for virus detection and identification. *J. Clin. Microbiol.*, v.37, p.1247-1253, 1999.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. *Molecular cloning, a laboratory manual*. 2.ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- UMENE, K. Recombination of the internal direct repeat element DR2 responsible for the fluidity of the *a* sequence of Herpes Simplex virus type 1. *J. Virol.*, v.65, p.5.410-5.416, 1991.
- WHITBECK, J.C.; BELLO, L.J.; LAWRENCE, W.C. Comparison of the bovine herpesvirus 1 gI gene and herpes simplex virus type 1 gB gene. *J. Virol.*, v.62, p.3319-3327, 1988.