
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Rodrigo Franco de Carvalho

***“CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA DE ISOLADOS BRASILEIROS DO
HERPESVÍRUS EQUINO DO TIPO 1”***

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) <u>Rodrigo Franco de Carvalho</u> e aprovada pela Comissão Julgadora.
--

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas para a
obtenção do título de Doutor em Genética e
Biologia Molecular na Área de Microbiologia.



Orientadora: Profa. Dra. Clarice Weis Arns

2005

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

C253c

Carvalho, Rodrigo Franco de
Caracterização genômica de isolados brasileiros de
herpesvírus eqüino do tipo 1 / Rodrigo Franco de
Carvalho. -- Campinas, SP: [s.n.], 2005.

Orientadora: Clarice Weis Arns.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Aborto nos animais. 2. Herpesvírus 1 eqüideo -
Brasil. 3. Vírus - Isolamento. I. Arns, Clarice Weis. II.
Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Chracterization of brazilian isolates of equine herpesvirus type A.

Palavras-chave em inglês: Abortion in animals; Equid herpesvirus 1; Viruses isolation.

Área de concentração: Microbiologia.

Titulação: Doutor em Genética e Biologia Molecular.

Banca examinadora: Clarice Weis Arns, Sandra Cecilia Botelho Costa, Wilson Roberto
Fernandes, Edviges Maristela Pituco, Jacqueline Maisonnave.

Data da defesa: 12/12/2005.

Campinas, 12 de Dezembro de 2005.

Banca Examinadora

Profa. Dra. Clarice Weis Arns


Assinatura

Prof. Dr. Wilson Roberto Fernandes


Assinatura

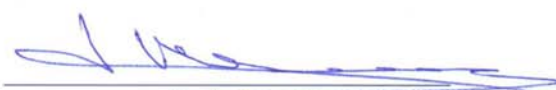
Profa. Dra. Sandra Cecilia Botelho Costa


Assinatura

Profa. Dra. Edviges Maristela Pituco


Assinatura

Profa. Dra. Jacqueline Maisonave


Assinatura

Suplentes

Profa. Dra. Maria Sílvia Viccari Gatti

Assinatura

Profa. Dra Liana M. Cardoso Verinaud

Assinatura

Prof. Dr. Ricardo Janini Sawaya

Assinatura

Trabalho executado no Laboratório de Virologia
Animal do Instituto de Biologia da Universidade
Estadual de Campinas.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus queridos familiares, especialmente ao meu avô José Maria Franco de Carvalho e a minha avó Balbina Leite Sangion.

Dedico também este trabalho à minha companheira de todos esses anos, Tutty.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Clarice, por abrir-me as portas da virologia, pelo aprendizado desses anos, pelo entusiasmo e pela amizade.

À Profa. Silvia Gatti, pelas contribuições que deu a este trabalho, sob a forma de sugestões, discussões e excelentes aulas. Pela amizade.

Às minhas companheiras de bancada Lia, Lica, Regina, Renata, Gislaine e Lage, pela inesquecível convivência e pelas valiosas dicas, que me ajudaram em muito nesta travessia.

Aos meus companheiros de bancada Luizinho Caron, Fernando Spilki e Caio Mordente pela amizade, camaradagem e discussões filosóficas. Agradeço ainda ao Fernando pelas contribuições que deu a este trabalho.

À Doutora Maria Elenice Sequentin Cunha e à Doutora Edwiges Maristela Pituco, pelo intercâmbio de informações sobre o EHV-1.

Ao Doutor Alysson Muotri, pelas contribuições dadas ao experimento de transformação das células ED.

Ao Doutor Luis Alberto Lopes e à Dra. Juliana, pela inestimável ajuda dada durante as coletas de material clínico.

À Doutora Mariana Mansanares, pelo apoio dado na confecção dos cariótipos para células ED.

Ao Geneci Davi, pela amizade e paciência com a qual me ensinou os primeiros passos da prática do cultivo de células.

Ao suporte proporcionado pelas agências de fomento à pesquisa CAPES e FAPESP.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos meus bioamigos, por todos esses anos de idas e vindas. Pela amizade eterna.

À amiga Flávia pela revisão do texto.

Á Edi Marforio, pela ajuda dada durante a confecção final deste trabalho.

À minha Mãe, Maria José Leite Sangion, que tornou tudo possível.

Índice

Lista de Abreviações.....	xi
Lista de Figuras.....	xii
Lista de Tabelas.....	xiii
Resumo.....	xiv
Abstract.....	xv
INTRODUÇÃO.....	1
Agente etiológico - Histórico.....	2
Partícula viral.....	4
Genoma viral.....	5
Rinopneumonite.....	6
Abortamentos.....	6
Distúrbios nervosos.....	7
Diagnóstico.....	8
A) Anátomo-patológico.....	8
B) Isolamento viral.....	8
C) Pesquisa de anticorpos.....	9
D) PCR.....	9
E) Análise genômica.....	10
Controle e profilaxia.....	10
Epidemiologia.....	10
OBJETIVOS.....	12
MATERIAL e MÉTODOS.....	14
Vírus.....	15
Células.....	15
Protocolo de imortalização para células ED.....	15
Análise citogenética.....	16
Titulação viral.....	16

PCR.....	17
Isolamento viral a partir de secreções, tecidos e órgãos de eqüinos.....	18
A) Coleta de material de campo.....	18
B) Processamento.....	18
Extração do DNA genômico viral.....	19
Análise de restrição por endonucleases	19
Seqüenciamento.....	20
Análise Filogenética.....	20
A) Validação das seqüências.....	20
B) Comparação de seqüências.....	20
C) Análise das seqüências obtidas para montagem da árvore filogenética.....	20
Análise funcional de seqüências.....	20
RESULTADOS.....	21
Imortalização das células ED.....	22
Replicação viral em sistemas celulares.....	24
Titulação viral.....	25
PCR.....	25
Isolamento viral.....	26
Análise de restrição para o genoma viral.....	29
Seqüenciamento.....	30
Filogenética.....	32
Análise funcional de seqüências.....	34
DISCUSSÃO.....	36
Epidemiologia.....	37
Padronização de técnicas.....	38
Análise genômica.....	39
CONCLUSÕES.....	40
BIBLIOGRAFIA.....	42
ANEXO I.....	48

ANEXO II.....	57
----------------------	-----------

ANEXO III.....	62
-----------------------	-----------

LISTA DE ABREVIACÕES

AHVs – Asinine Herpesviruses
CER – Chicken Embryo Related Cell
CHO – Chinese Hamster Ovary Cell
CO₂ - dióxido de carbono
DNA – Deoxyribonucleic Acid
ECP – efeito citopático
ED – Equine Dermis Cell
EDTA – sal dissódico do ácido etilenodinitrotretacético
EHV-1 - Equine Herpesvirus Type 1
EHV-4 - Equine Herpesvirus Type 4
EHVs – Equine Herpesviruses
FC – fixação do complemento
FEK – Fetal Equine Kidney Cell
g – força g
G+C – Guanina+Citosina
gC – glicoproteína C
HSV – Herpes Simplex Virus
IRS – Internal Repeat Sequence
LAT – Latency Transcript
MEME – Meio Essencial Mínimo de Eagle
µl -microlitro
nm – nanômetro
ORF –Open Reading Frame
p.i. – pós inoculação
PCR – Polymerase Chain Reaction
RE – Restriction Enzyme Analysis
RK-13 – Rabbit Kidney-13 Cell
SDS – Dodecil sulfato de sódio
TAE – Tris-Acetato-EDTA
TRS – Terminal Repeated Region
UL – Unique Long Region
US – Unique Short Region
UV - ultravioleta
V – Volt

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Microscopia eletrônica de virions envelopados do EHV-1.....	4
Figura 2 - Partículas virais do EHV-1 tratadas para a remoção do envelope e tegumento.....	4
Figura 3 - Organização genômica dos vírus da subfamília <i>Alphaherpesvirinae</i>.....	5
Figura 4 - Mapa de BamHI para o genoma do EHV-1.....	5
Figura 5 - Diagrama do vetor retroviral pLPC- hTERT.....	16
Figura 6 - Células ED, passagem 42, após a transfecção com o vetor pLPC- hTERT.....	22
Figura 7 - Células ED, passagem 55, após a transfecção com o vetor pLPC- hTERT.....	22
Figura 8 - Cromossomos metafásicos provenientes de uma célula ED transformada.....	23
Figura 9A - Controle negativo para monocamada CER.....	24
Figura 9B- Amostra do efeito citopático por EHV-1 em CER.....	24
Figura 10A - Padronização da PCR do fragmento tk para Kentucky-D	26
Figura 10B - PCR do fragmento tk para Hannover e BR.....	26
Figura 11 - Efeito citopático de BR01/UNICAMP/2004 em células ED.....	28
Figura 12 - Eletroforese para as digestões dos genomas de EHV-1.....	29
Figura 13 - Alinhamento de seqüências para o gene tk.....	30
Figura 14 - Alinhamento de seqüências entre BR01/UNICAMP/2004 e HVS-25A.....	31
Figura 15 - Contexto gênico para a PCR do gene tk de EHV-1.....	32
Figura 16 - Árvore filogenética.....	33
Figura 17 - Análise da região 5´do gene tk com o aplicativo GENERUNNER.....	35
Figura 18 - Contexto genômico para o gene tk.....	39
Figura 17 - Análise da região 5´do gene tk com o aplicativo GENERUNNER.....	35
Figura 18 - Contexto genômico para o gene tk.....	39

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 - Herpesvírus eqüinos e seus hospedeiros naturais.....	3
Quadro 2 - Iniciadores para os EHV-1 e -4 e tamanhos dos fragmentos esperados.....	17
Quadro 3 - Resultado para a o isolamento viral em amostras de abortos eqüinos.....	27
Tabela 1 - Contagem cromossômica preliminar para células ED.....	23
Tabela 2 - Resultados da titulação das amostras de EHV-1.....	25
Tabela 3 - Elementos regulatórios para o gene tk.....	34

RESUMO

O herpesvírus eqüino do tipo 1 (EHV-1) é um membro da subfamília *Alfaherpesvirinae*, implicado no surgimento de distúrbios respiratórios, reprodutivos e nervosos em cavalos. A principal forma de contaminação dos animais é através do contato direto com secreções contaminadas pelo vírus. No eqüino, a disseminação do vírus ocorre pela transposição da infecção respiratória a outros órgãos e sistemas através da corrente sanguínea. Pouco se sabe sobre a ocorrência do EHV-1 no Brasil. Dessa forma, este estudo teve por objetivo o isolamento do EHV-1 a partir de material biológico e produção e análise de dados moleculares de isolados brasileiros de EHV-1. Durante este estudo, foi realizado o isolamento de uma amostra de EHV-1 a partir da inoculação de material clínico em células de derme eqüina (ED). Este isolado foi diagnosticado como EHV-1 através da reação em cadeia da polimerase (PCR) para o gene da timidina quinase (tk). Neste trabalho, foram também realizados os seqüenciamentos de fragmentos de PCR derivados do isolado aqui descrito, de uma outra amostra brasileira de EHV-1 e de duas amostras estrangeiras do vírus para análise filogenética. A análise comparativa entre seqüências permitiu inferências sobre o nível de divergência entre os vírus estudados, além da listagem de seqüências regulatórias para atividade gênica em um sítio do genoma localizado próximo ao gene tk. Na região genômica reportada foram contextualizadas ao menos três genes (ORF 38, ORF 37 e ORF 36). Os dados levantados com o seqüenciamento de amostras de EHV-1 de origens geográficas distintas (Brasil, Europa e América do Norte) não mostraram divergências, o que pode estar associado a um processo seletivo construtivo, que impediria a fixação de novas mutações naquela região. A ausência de divergências também pode estar associada à importância dessa região na regulação gênica do EHV-1. Também é um indicativo para a fidelidade dos mecanismos de replicação envolvidos na síntese do DNA viral, o que sugere a importância da região estudada na regulação da expressão gênica do EHV-1.

ABSTRACT

Equine Herpesvirus Type 1 (EHV-1) is a member of *Alphaherpesvirinae* subfamily implicated with abortions, respiratory and neurological disturbs in horses. The principal mode of viral transmission is through close contact virus-containing secretions of infected horses. Systemic pathogenesis in which this virus is implicated combines primary respiratory infection and spread of viral particles through the circulatory/lymphatic system. Until today, there are only few studies involving the isolation of this virus in Brazil. Thus, the main goal of this study was the isolation of EHV-1 from biological material and the production and analysis of molecular data derived from Brazilian EHV-1 isolates. Clinical samples were screened by inoculation into Equine Dermis (ED) cells monolayers, searching for the characteristic citopathic effect produced by EHV-1. Inoculation of one tissue sample has presented a suggestive citopathic effect. Re-inoculation of the original tissue homogenate in a second, independent experiment reproduced the same positive result. Following these observations, infection agent diagnostic was done by PCR for thymidine kinase (tk) gene. The results demonstrated that sample was EHV-1 positive. In this work, it was done either the sequencing of PCR fragments derived from two Brazilian and two foreign samples of EHV-1 for filogenetic and genomic analyses purposes. It was assigned at least three Open Reading Frames contexts (ORF 38, ORF 37, ORF 36). The data do not show genetic variation between sequences. The high level of genetic conservation for this region, despite the distinct geographic origins (Brazil, Europe and North America) of EHV-1 samples studied, indicates a strong selection process against the fixation of new mutations. It also highlights a high level of fidelity for DNA replication and strongly suggests the importance of the studied region for EHV-1 gene regulation.

“Messieurs, c’est les microbes qui auront le dernier mot.”

Pasteur

INTRODUÇÃO

Agente etiológico - Histórico

O cavalo doméstico é o hospedeiro natural para cinco diferentes espécies de herpesvírus. Os herpesvírus eqüinos dos tipos -2 e -5 são classificados na subfamília *Gamaherpesvirinae*, enquanto que os tipos -1, -4 e -3 pertencem à subfamília *Alfaherpesvirinae*. Esta é composta por espécies de ciclo replicativo relativamente curto, apresentando rápida disseminação em cultivos celulares. Carreados através do axônio, os vírus pertencentes a essa subfamília estabelecem-se nos gânglios sensoriais do sistema nervoso periférico. No neurônio, tendem a permanecer inertes ou em estado de latência. Mantêm, porém, a capacidade de gerar novos ciclos replicativos ao longo do tempo de vida do hospedeiro (Roizmann *et al.*, 1992).

Os herpesvírus eqüinos dos tipos -1 e -4 têm genomas e fenótipos muito semelhantes entre si. Não obstante, diferenças importantes subsistem e permitem a individualização desses vírus em *taxa* distintos. Quando se analisa a história natural de ambos, observa-se um elevado grau de sobreposição nos sítios de replicação, cadeias epidemiológicas e produção de distúrbios. Esses vírus são patógenos capazes de causar infecções no trato respiratório, conjuntivite, abortamentos e alterações neurológicas severas. Normalmente, o quadro desenvolvido está associado à presença de uma espécie, mas a presença simultânea de ambas em um mesmo animal também ocorre. Atualmente, sabe-se que o EHV-1 está especificamente associado a surtos de abortos múltiplos no plantel, sendo comumente denominado vírus do aborto eqüino.

Até 1981 os EHV-1 e -4 eram considerados como variantes antigênicas de uma única espécie viral, denominada como EHV-1, sendo respectivamente designados como subtipos 1 e 2. Porém, nesse mesmo ano, a análise dos genomas virais por “Restriction Fragment Polymorphism” (RFLP) revelou diferenças genéticas significativas entre os dois subtipos, levando posteriormente à sua reclassificação em espécies distintas (Sabine *et al.*, 1981; Studdert *et al.*, 1981). Saliente-se que essa reclassificação proporcionou uma melhor compreensão sobre o papel exercido por esses vírus na produção de doenças. Até então, era aceito que os subtipos de EHV-1 tivessem na infecção respiratória um divisor comum e que somente algumas das cepas, mais virulentas, tinham a propensão para causar disfunções reprodutivas e nervosas.

Dentre as nove espécies de herpesvírus eqüinos conhecidas (quadro 1), uma em especial chama a atenção pelo potencial patogênico e disseminação. Denominado aqui pela abreviação inglesa para “equine herpesviruses”, o EHV-1 é um patógeno viral capaz de produzir graves distúrbios no cavalo doméstico (*Equus caballus*). Como os outros membros da família *Herpesviridae*, tem uma relação complexa com o organismo hospedeiro, alternando ciclos de infecção, latência e reativação viral.

Quadro 1 – Herpesvírus eqüinos e seus hospedeiros naturais

Designação ¹	Nome comum	Subfamília	Genoma (kbp)
<i>Equus caballus</i>			
EHV-4	Equine rinopneumonitis virus	α	145
EHV-1	Equine abortion virus	α	150
EHV-3	Equine coital exanthema virus	α	148
EHV-2	Slow-growing equine herpesvirus	γ	192
EHV-5	Slow-growing equine herpesvirus	γ	179
<i>Equus asinus</i>			
AHV-3	Asinine abortion virus	α	147
AHV-1	Asinine coital exanthema virus	α	147
AHV-2	Slow-growing asinine herpesvirus	γ	Não disponível
<i>Gazella thomsoni</i>			
EHV-9 ²	-	α	Não disponível

¹ Segue a nomenclatura em inglês, relacionada à tabela original (Crabb & Studdert, 1995).

² O EHV-9 foi descrito inicialmente em gazelas (*Bovidae*) e é sorologicamente relacionado ao EHV-1.

Partícula viral

Os herpesvírus eqüinos têm como genoma uma molécula de DNA dupla-fita. Esses vírus replicam-se no núcleo e maturam por brotamento através do retículo endoplasmático. Posteriormente extravasam a membrana celular, adquirindo nesse processo o envelope viral (figura 1), que tem um tamanho aproximado de 150 nm e conta com um nucleocapsídeo integrado de formato icosaédrico de aproximadamente 100 nm de diâmetro (figura 2).

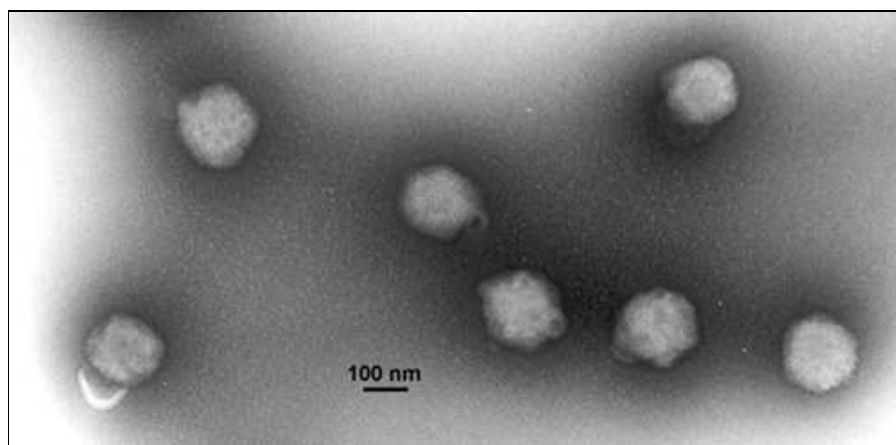


Figura 1 – Microscopia eletrônica de virions envelopados do EHV-1

(All the Virology on the WWW)

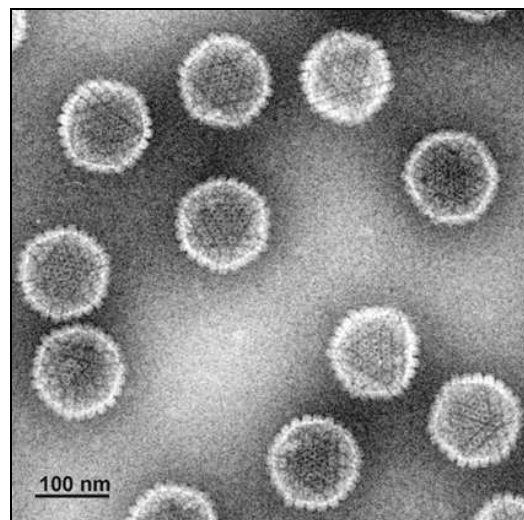


Figura 2 – Partículas virais do EHV-1 tratadas para a remoção do envelope e tegumento.

(All the Virology on the WWW)

Genoma viral

A organização do material genético do EHV-1 e do EHV-4 é bem semelhante. O genoma apresenta a arquitetura típica da subfamília *Alfaherpesvirinae* (figura 3), sendo dividido entre as porções UL (“Unique Long Region”) e US (“Unique Short Region”). A região US é flanqueada por dois conjuntos de seqüências repetitivas denominadas IRS (“Internal Repeat Sequence”) e TRS (“Terminal Repeat Sequence”) (Roizmann *et al.*, 1992; Crabb & Studdert, 1995).

Na década de 1990, o genoma completo de um isolado britânico do EHV-1 foi seqüenciado. A seqüência de DNA produzida tinha 150.223 pares de bases, com uma composição G+C de 56,7% (Telford *et al.*, 1992). Há também o registro de uma seqüência genômica completa de EHV-4, com 145.597 pares de base (Telford *et al.*, 1998). Os genomas do EHV-1 e do EHV-4 têm 76 genes (ou 80 se forem consideradas as repetições), dispostos de maneira colinear em sua quase sua totalidade. O grau de identidade entre seqüências de nucleotídeos, tomando pares individuais de genes homólogos, varia entre 55% e 84%. Em relação às seqüências de aminoácidos, a identidade varia entre 55% e 96% (Learmonth *et al.*, 2001).

A comparação eletrofenotípica obtida pela análise de restrição de isolados de EHV-4 de origens geográficas distintas indica uma grande estabilidade genética, com pouca variação intraespecífica. Entre os isolados de EHV-1, encontra-se uma maior variabilidade, com aparente relevância epidemiológica (Crabb & Studdert, 1995). Há descrição de pelo menos 16 variantes eletrofenotípicas (EHV-1A,..., EHV-1O) e uma cepa protótipo (EHV-1P), produzidas pela clivagem do DNA genômico com a enzima *Bam*HI, como indicado figura 4 (Robertson & Whalley, 1988).

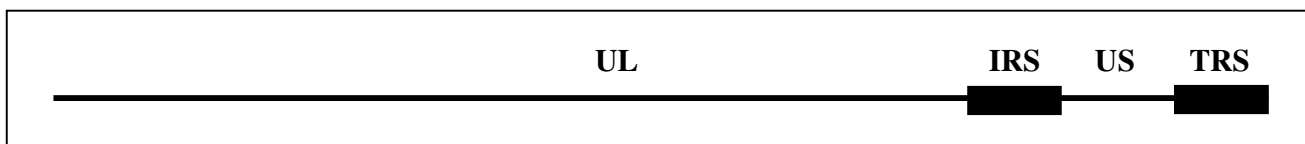


Figura 3 – Organização genômica dos vírus da subfamília *Alfaherpesvirinae*

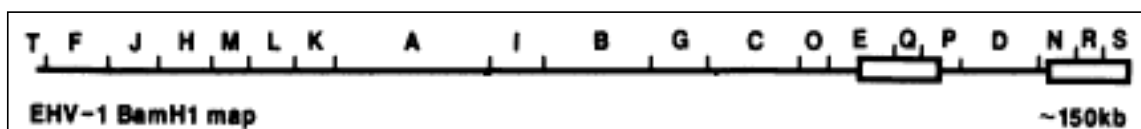


Figura 4 – Mapa de *Bam*HI para o genoma do EHV-1 (Robertson & Whalley, 1988)

Rinopneumonite

A rinopneumonite causada por herpesvírus eqüinos caracteriza-se como um processo patogênico do trato respiratório anterior, o qual é anatomicamente extenso em eqüídeos. Surge, na maioria das vezes nos dois primeiros anos de vida do animal. É particularmente perigosa para potros jovens, podendo evoluir rapidamente para um quadro clínico agudo. Os vírus são normalmente transmitidos pelo contato dos animais com secreções e fluídos contaminados, derivados de portadores sintomáticos e assintomáticos (Weiblen, 1998).

Tanto o EHV-1 como o EHV-4 são agentes etiológicos para o surgimento da rinopneumonite em cavalos. Sabe-se que em países de clima temperado há uma maior incidência de casos associados ao EHV-4, sendo este comumente conhecido como vírus da rinopneumonite eqüina (Crabb & Studdert, 1995). O processo de infecção é muito semelhante para os dois vírus (Gleeson & Coggins, 1980; Allen & Bryans, 1986). As células da mucosa do trato respiratório superior são susceptíveis às partículas virais, havendo, após a fase de contato, a replicação do vírus na nasofaringe do eqüino. Além das células endoteliais do trato respiratório, ambos os vírus têm potencial para infectar leucócitos. No sistema circulatório, os leucócitos contaminados acabam por carrear os vírus para diferentes órgãos do animal.

O período de incubação viral que antecede o surgimento dos sintomas clínicos é variável (dois a dez dias). Lesões herpéticas podem surgir por todo o trato respiratório. Hipertermia (38,9 até 41,1 °C), anorexia e corrimento nasal seroso são sinais típicos da infecção. A rinite caracteriza-se pela presença de focos necróticos. De forma progressiva, a secreção inicialmente serosa, torna-se mucóide e mucopurulenta, característica de infecções bacterianas secundárias. Particularmente danosa é a associação entre as infecções respiratórias causadas por herpesvírus e estreptococos do grupo C de Lancefield (Crabb & Studdert, 1995).

Abortamentos

No haras, o aparecimento de infecções respiratórias, mesmo brandas, pode preceder abortamentos. Essa combinação é uma das indicações da presença do EHV-1 no plantel. Podem vir a ocorrer tanto casos isolados como simultâneos (epizoóticos) de aborto. Na maioria das vezes, a égua não apresenta sinais premonitórios. O feto com a placenta é expulso íntegro, sem retenção ou lesão do trato reprodutivo. Sabe-se que a viremia é necessária para a indução de abortos, mas nem todas as

éguas com viremia abortam (Weiblen, 1998). As alterações causadas pela atividade viral nos vasos sanguíneos do endométrio produzem um quadro de vasculite severa e trombose multifocal, levando à interrupção da gestação. Se o comprometimento dos vasos for agudo, o feto é expulso sem ser infectado pelo vírus, pois a infecção no endométrio determina previamente o aborto (Patel & Heldens, 2005). Porém, com níveis de infecção mais brandos, o vírus ultrapassa a barreira uteroplacentária, contaminando o feto. A ocorrência de infecções transplacentárias quase ao termo da gestação produz o nascimento de um potro infectado não viável, que normalmente morre no espaço de poucos dias. Essa condição recebe, entre outras, a designação de síndrome do potro fraco.

O EHV-1 está associado especificamente com as ocorrências de abortos epizooticos. Por sua vez, o EHV-4 tem sido isolado esporadicamente em abortos. Não parece, porém, estar associado aos surtos epizooticos (Timoney, 1992; Smith, 1997).

Distúrbios nervosos

Cavalos de todas as idades são suscetíveis a desenvolver distúrbios nervosos causados pelo EHV-1 (Weiblen, 1998). Caracteristicamente, os alfa-herpesvírus têm na latência um mecanismo de escape da pressão exercida pelo sistema imune (Toshima *et al.* 2001, Taouji *et al.*, 2002). No interior das células do nervo trigêmeo (sítio de latência), os genomas virais assumem uma forma epissomal, funcionalmente inerte, a não ser pela produção de um transcrito, o fator de indução da latência (LAT). Assume-se que diversos fatores induzem a reativação e replicação viral, com a conseqüente re-infecção das mucosas e eliminação de progênie viral. A reativação pode se dar a qualquer momento da vida do animal, sendo desencadeada por diversos fatores, entre eles o estresse. Episódios de reativação em animais imunologicamente experientes tendem a causar um quadro mais brando ou mesmo imperceptível, assintomático (Weiblen, 1998).

Transportado pelo interior dos axônios, o EHV-1 pode atingir o sistema nervoso central e causar alterações clínicas graves (Toshima *et al.* 2001). A viremia levaria ao surgimento do quadro clínico, mas os mecanismos envolvidos não estão completamente esclarecidos. As glicoproteínas virais I (Ig) e E (Eg) parecem desempenhar um papel importante nesse tipo de infecção (Frampton *et al.*, 2004). Geralmente, as alterações nervosas evoluem em um período de 48 horas após a infecção. Os cavalos mostram andar cambaleante, debilidade e falta de coordenação ou ataxia (Weiblen, 1998). Aparentemente, certas cepas de EHV-1 têm um potencial de disseminação neurotrópico elevado (van Maanen *et al.*, 2001; Hasebe *et al.*, 2002). Por sua vez, o EHV-4 já foi detectado no sistema nervoso central de cavalos necropsiados, mas seu papel no estabelecimento de quadros clínicos graves não está claro (Taouji *et al.*, 2002).

Diagnóstico

Existem diversos fatores que complicam o diagnóstico da ocorrência do EHV-1 ou -4, incluindo-se a sobreposição de certos sinais clínicos àqueles induzidos por outros patógenos eqüinos (Weiblen, 1998). São exemplos o vírus da influenza eqüina para as infecções respiratórias, o vírus da arterite eqüina (doença respiratória e abortos) e o protozoário da mieloencefalopatia *Sarcocystis neurona*, causador de alterações neurológicas (Fernandes, 1999).

A) Anátomo-patológico

Na necropsia de fetos abortados, normalmente são observadas a presença de edema e congestão dos pulmões, com acúmulo de fluído pleural e ascite. No fígado podem ser encontradas lesões de cor cinza, com tamanho variando entre dois e quatro milímetros. O exame anátomo-patológico pode colocar em evidência focos de necrose no fígado, nos pulmões, baço e nos centros germinativos dos linfonodos. Observam-se também corpúsculos de inclusão intranucleares, localizados na maioria das vezes na periferia dos focos. Em potros recém-nascidos, acometidos pela doença perinatal, a necropsia freqüentemente revela um quadro severo de pneumonia intersticial, lesões no fígado, no tecido linforreticular e glândulas adrenais (Timoney, 1992).

Na forma nervosa, observa-se um quadro de meningoencefalite difusa, severa, com marcada infiltração perivascular de células mononucleares. Os corpúsculos de inclusão são raros nas infecções pós-natais (Weiblen, 1998).

B) Isolamento viral

O tradicional isolamento viral permite o diagnóstico definitivo para suspeitas de infecção por EHV-1 ou -4. As células eqüinas mais utilizadas são as células de derme eqüina (ED) e células fetais de rim (FEK), mais sensíveis para o isolamento de ambos os vírus (Office International des Epizooties).

O EHV-1 parece divergir do EHV-4 em relação ao tropismo por diferentes tipos celulares. Aparentemente, o isolamento do EHV-4 está limitado às células eqüinas, o que permitiria o uso de células não-eqüinas para o diagnóstico diferencial por restrição viral à célula hospedeira (Crabb & Studdert, 1995). Vários tipos celulares heterólogos são permissivos ao EHV-1 (Crabb & Studdert, 1995), sendo amplamente utilizadas as células da linhagem símia VERO, de rim de coelho (RK-13) e de ovário de hamster chinês (CHO).

C) Pesquisa de anticorpos

A pesquisa para a presença de anticorpos anti-herpesvírus eqüinos pode ser usada para diversos fins como: definição da prevalência, caracterização de isolados, estabelecimento de pistas sobre ciclo da atividade viral e previsões sobre a evolução clínica da doença nos animais (Office International des Epizooties). Durante episódios de rinopneumonite, amostras colhidas em diferentes dias (soros pareados) são úteis para a identificação das fases mais exacerbadas da resposta imunológica (fase aguda) e convalescença. Com o uso de soros pareados também se pode traçar retrospectos entre o surgimento de casos de rinopneumonite e abortos ou casos da doença nervosa em animais de um mesmo grupo (Office International des Epizooties). Deve-se salientar, porém, a impossibilidade de distinção entre os EHV-1 e -4 pelos testes sorológicos convencionais, causada pelo alto grau de similaridade antigênica (Crabb *et al.*, 1995). Sobre esse aspecto, existem desde 1993 testes de ELISA específicos capazes de distinguir os dois vírus (Crabb & Studdert, 1993).

Em fetos abortados, não contaminados diretamente pelo vírus, a detecção sorológica de anticorpos no sangue de cordão ou em outros fluidos é um indicativo indireto da atividade viral e, portanto, de grande valor diagnóstico. Nos casos de mieloencefalopatia, o fluido cérebro-espinhal apresenta altos títulos de anticorpos, tornando-o importante para o diagnóstico (Office International des Epizooties).

Os níveis de anticorpos podem ser determinados por testes de ELISA, soroneutralização e fixação do complemento (FC). Os testes de ELISA são mais sensíveis que a FC, mas a FC é útil na detecção de infecções recentes, com os níveis de anticorpos ainda elevados (Office International des Epizooties).

D) PCR

A reação em cadeia da polimerase (“Polymerase Chain Reaction”, ou PCR) é utilizada como ferramenta diagnóstica na determinação de abortamentos pelo EHV-1 desde o início dos anos noventa (Ballagi-Pordany *et al.*, 1990). Permite tanto a detecção como a diferenciação entre o EHV-1 e o -4 (Sharma *et al.*, 1992; Borchers & Slater, 1993; Kirasawa *et al.*, 1993), servindo também como ferramenta de apoio em estudos epidemiológicos (McCann *et al.*, 1995). Vários *loci* têm sido descritos para a amplificação pela PCR a partir de fontes distintas de material biológico, como amostras clínicas (Lawrence *et al.*, 1994; Mackie *et al.*, 1996), cultivos celulares e cortes histológicos parafinados (Rimstad & Evensen, 1993).

E) Análise Genômica

A análise por enzimas de restrição já permitiu a caracterização de espécies de alfa-herpesvírus muito relacionadas entre si (Sabine *et al.*, 1981; Studdert *et al.*, 1981; Rimstad *et al.*, 1992), bem como a diferenciação entre cepas de uma mesma espécie (Rimstad *et al.*, 1992). Foi utilizada na Argentina na caracterização de isolados do EHV-1 (Galosi *et al.*, 1998). Em outro nível de análise, o sequenciamento do DNA de amostras de EHV-1 pode ser usado na observação de divergências filogenéticas e epidemiológicas, na atribuição funcional para sequências regulatórias e na caracterização de proteínas (Robertson & Whalley, 1988; McCann *et al.*, 1995).

Controle e profilaxia

A eficácia da vacinação contra infecções causadas pelos EHV do tipo -1 e -4 ainda é limitada em intensidade e duração. Mesmo entre animais vacinados pode haver a disseminação sistêmica dos vírus, atribuída aos mecanismos de escape viral do sistema imune, mas os sinais clínicos tendem a ser mais brandos. Tratamentos, incluindo o uso de antibióticos de amplo espectro, são recomendados para minimizar o quadro clínico e prevenir infecções secundárias.

Programas de manejo adequados ainda se constituem na melhor forma de prevenção e controle para os EHV-1 e -4 (Gilkerson *et al.*, 1999). Entre outros, o material derivado de abortos deve receber atenção especial, sendo recomendável o correto descarte (incineração ou enterro) do feto, placenta e camas (Moreira *et al.*, 1998).

Epidemiologia

Estudos indicam que o EHV-1 encontra-se presente em diferentes populações de cavalos por todo o mundo (Crabb & Studdert, 1995). No Brasil, porém, os dados epidemiológicos referentes à sua ocorrência são relativamente escassos. O EHV-1 já foi isolado nos Estados de São Paulo (Nilsson & Corrêa, 1966), Rio Grande do Sul, onde foram relatados casos de abortos múltiplos (Weiblen *et al.*, 1994), e Paraná (Moreira *et al.*, 1998). Em contraste ao EHV-1, o EHV-4 não foi ainda isolado no Brasil.

Em três levantamentos sorológicos feitos no Estado de São Paulo, nos quais foram usadas as provas de fixação do complemento e soroneutralização, os índices para animais sorologicamente positivos variaram entre 17,6%, 27,2 % e 57,3% (Fernandes, 1988; Modolo *et al.*, 1989; Cunha *et al.*,

2002). No Estado do Rio Grande do Sul, de um total de 348 amostras de soro provenientes de vários municípios, 84,7% foram positivas utilizando-se a prova de soroneutralização (Vargas & Weiblen, 1991). Um quarto levantamento, realizado no Estado do Paraná, indicou 17,7% de amostras positivas para soroneutralização em um grupo de 299 eqüinos (Moreira *et al.*, 2000).

Os dados moleculares disponíveis, obtidos através da PCR no Estado de Minas Gerais, indicam 88% de amostras positivas para o EHV-1 (Carvalho *et al.*, 2000). Por outro lado, não foi detectado o EHV-4 no mesmo trabalho.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

O presente trabalho teve por objetivo a detecção e a caracterização genômica de amostras de alfa-herpesvírus eqüinos dos tipos -1 e -4 no Brasil, tendo em vista a ausência de dados relativos à diversidade genética desses vírus em território nacional.

Objetivos Específicos

1. A padronização de sistemas sensíveis para o cultivo e o diagnóstico do EHV-1 no Laboratório de Virologia Animal - IB/UNICAMP, pela utilização de tipos celulares eqüinos e não-eqüinos.
2. O isolamento de amostras brasileiras de alfa-herpesvírus eqüinos dos tipos -1 e -4.
3. A padronização e diagnóstico pela PCR para alfa-herpesvírus eqüinos dos tipos -1 e -4.
4. A análise do genoma de amostras brasileiras alfa-herpesvírus eqüinos dos tipos -1 e -4. pelo seqüenciamento de DNA e uso de enzimas de restrição.

MATERIAL e MÉTODOS

Vírus

Foram obtidas e testadas para verificação da viabilidade viral, duas amostras de cepas de herpesvírus eqüinos do tipo -1 e do tipo -4, provenientes da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

- Cepa de EHV-1 Kentucky-D (cultivo em ED, 2003, vírus de origem norte-americana).
- Cepa de EHV-4 1942 (cultivo em ED, 2003, vírus de origem inglesa).

Também foram testadas duas amostras de EHV-1, obtidas junto ao acervo do Instituto Biológico de São Paulo:

- Isolado de EHV-1 denominado Hannover (vírus de origem alemã, cultivado em célula VERO).
- Isolado de EHV-1 denominado BR, (amostra viral brasileira, cultivada em célula VERO).

Células

Foram utilizados diversos tipos celulares para a replicação das amostras de EHV-1: células eqüinas ED (Equine Dermal) e FEK (Fetal Equine Kidney), células das linhagens VERO (Green Monkey) e RK-13 (Rabbit Kidney). Foram também utilizados cultivos da linhagem CER (Chicken Embryo Related).

Os tipos celulares foram cultivados em uma solução de meio essencial mínimo Eagle (MEME) suplementado com soro fetal bovino descomplementado a uma concentração final de 10%.

Protocolo de “imortalização” para células ED

Por terem constituição cromossômica semelhante ao organismo original e uma limitada capacidade de multiplicação *in vitro*, as células eqüinas de cultivo são caracterizadas como primárias (ex: FEK) ou secundárias (ex: ED). A célula ED, especificamente, apresenta um número de repiques ou passagens limitado a aproximadamente 40, entrando subseqüentemente em senescência.

O uso de células eqüinas de cultivo finito representa uma limitação a ser levada em conta para a manutenção de um estoque constante de células. Para contornar essa limitação, foi incluído um protocolo de “imortalização” de cultivos celulares, empregando-se o vetor retroviral pLPC- hTERT (Geron Corp - USA).

O vetor retroviral de expressão pLPC- hTERT (figura 5) tem em sua constituição genes do vírus da leucemia murina (Moloney murine leukaemia virus) e expressa a subunidade catalítica da telomerase humana. Contém também o gene de resistência para antibiótico puromicina, utilizado como marcador para a identificação das células transformadas (resistentes).

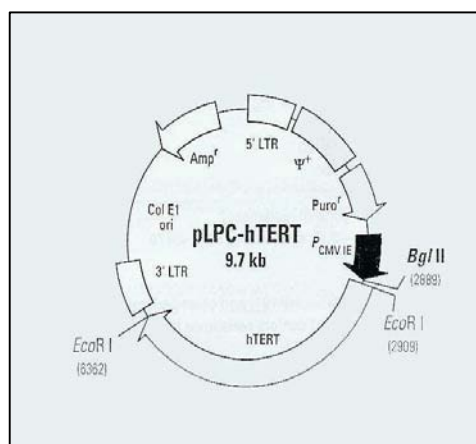


Figura 5 – Diagrama do vetor retroviral pLPC- hTERT

Para o experimento de transformação celular foram empregadas células fibroblásticas ED, já em elevado número de passagens (40). O cloreto de cálcio foi usado como indutor para a absorção do vetor pela membrana celular (Sambrook *et al.*, 1989).

Análise citogenética

As células ED transformadas foram submetidas à análise citogenética (contagem cromossômica). Cromossomos de células fixadas em etanol foram coradas pelo método da banda-G. O protocolo envolveu o uso de pancreatina (0,05%) por 3 minutos, seguida pela adição do corante Giemsa (Biomedical Specialty Laboratories, USA) por 1 minuto e trinta segundos (Pearson, 1972).

Titulação viral

As titulações de vírus foram realizadas de acordo com métodos usuais. Diluições de base 10 das amostras virais foram colocadas em volumes de 50µl/orifício em microplacas de 96 orifícios. Foram adicionados 50µl de uma suspensão de células (VERO, ED ou CER com concentrações variando entre 1,0 a 1,5 X 10⁵ células/orifício) e as placas incubadas a 37°C em estufa com 5% de CO₂. As leituras foram feitas 24, 48, 72 e 96 horas após a inoculação em busca do efeito citopático característico (ECP). Os títulos foram calculados com base no método de Spearman e Karber (Aubert, 1996).

PCR

A detecção e a confirmação da identidade dos isolados virais de EHV-1 foram feitas pela técnica de PCR, utilizando-se iniciadores previamente descritos para regiões do gene da glicoproteína C, do gene 76 e do gene da timidina quinase (Lawrence *et al.*, 1994; Carvalho *et al.*, 2000). A relação dos iniciadores utilizados é apresentada no quadro 2. Para a PCR, a extração do DNA-molde foi realizada com DNazol (Invitrogen[®]), a partir de raspados de monocamadas de células infectadas, após 48 horas da inoculação dos vírus em teste.

Quadro 2 – Iniciadores para os EHV-1 e -4 (5' - 3') e tamanhos dos fragmentos esperados

Gene da glicoproteína C: (EHV-1 = 649 pb) (EHV-4 = 507 pb)

EHV-1 gC *direto* – **GCG AGA TGT GGT TGC CTA ATC TCG**

EHV-1/4 gC *reverso (em comum)* – **GAG ACG GTA ACG CTG GTA CTG TTA A**

EHV-4 gC *direto* – **AGC CAC GAA CAA CTC AAC CGA TGT**

Gene 76: (EHV-1 = 492 pb) (EHV-4 = 328 pb)

EHV-1 76 *direto* – **GAG GCT GCC GCA GTT GTT ATA C**

EHV-1/4 76 *reverso (em comum)* – **GTT TCG TTG TCG CTT TCG CTG TA**

EHV-4 76 *direto* – **CTG AAG AAA TCT ACG AGA TGC ATA**

Gene da timidina quinase (tk): (330 pb)

EHV-1 *direto* - **CGG GAC CGC AGC TGG AAA T**

EHV-1 *reverso* - **CTG GCG AGA ACG CTA CCC**

Isolamento viral a partir de secreções, tecidos e órgãos de eqüinos

A) Coleta de material de campo

Neste estudo foram amostrados 49 eqüinos. Também foram obtidas amostras de tecidos de abortos eqüinos, provenientes de 20 indivíduos (total de 69 amostras). Foram procedidas duas coletas na região de Campinas-SP para a obtenção de amostras do trato respiratório de eqüinos (Coleta I / 09 animais, Coleta II / 19 animais). Foram utilizados “swabs” de 290 mm, previamente esterilizados e confeccionados em haste de polipropileno, para a coleta de secreções do trato respiratório dos cavalos. As secreções coletadas foram diluídas em 3,0 ml de meio de transporte MEME suplementado com antibióticos em concentrações variando entre 3,0 e 5,0% do volume total, de uma solução de penicilina e estreptomicina (10.000 UI) e 1,0% de anfotericina B. Todo material coletado foi mantido sob refrigeração (4,0 °C) e enviado ao Laboratório de Virologia Animal, Depto. de Microbiologia e Imunologia-IB/UNICAMP para processamento.

Uma terceira coleta foi realizada no município de Bagé-RS para a obtenção de amostras sanguíneas (Coleta III / 21 animais). As amostras de sangue periférico foram colocadas em tubos de 5,0 ml com o anticoagulante EDTA e remetidas para o laboratório sob refrigeração (4,0 °C).

B) Processamento

O processamento dos “swabs” foi realizado em fluxo laminar, sob as condições de assepsia apropriadas. Foram empregadas para o isolamento viral células ED imortalizadas. Foram usadas placas de cultivo celular de 6 orifícios ($2,0 \times 10^6$ células/orifício) e de 24 orifícios ($5,0 \times 10^5$ células/orifício) com monocamadas de ED recém-preparadas (<24 horas). A monocamada era preparada a partir de suspensões de células ($1,5$ a $3,0 \times 10^5$ células/orifício), adicionadas às placas de cultivo e incubadas a 37°C em estufa com 5% de CO₂. Cada amostra a ser testada era filtrada através de uma membrana descartável de 45 µm de diâmetro para inoculação dos cultivos. Todas as inoculações foram realizadas em duplicata.

As amostras de sangue periférico com anticoagulante EDTA foram submetidas à centrifugação a 640 g por 15 minutos e o plasma descartado. A parte superior do pellet formado, composta pelos

leucócitos, era coletada, lavada em MEME e semeada sobre monocamadas de células ED recém preparadas e com incubação semelhante à descrita anteriormente ($1,5$ a $3,0 \times 10^5$ células/orifício).

Para as amostras derivadas de casos clínicos de abortos foram analisados diversos tipos de órgãos e tecidos, principalmente pulmões, fígado e baço. O material foi macerado, centrifugado ($1200 \times g$), diluído a 10% em MEME com antibióticos e inoculado em duplicata nas placas de cultivo celular (células ED). As suspensões foram descartadas após 2 horas de inoculação, o período necessário para a adsorção viral, e substituídas por meio MEME enriquecido de SFB a 2%.

As leituras das placas, em busca do efeito citopático característico para o EHV-1 (ECP), eram iniciadas 24 horas após a inoculação e encerradas em sete dias. Todas as placas foram incubadas a 37°C em estufa com 5% de CO_2 . Nos casos negativos, o material era congelado e todo processo reiniciado por até três vezes (passagens cegas).

A cepa Kentucky-D foi usada em paralelo como controle positivo. Também foram utilizados para o isolamento tipos celulares não eqüinos, como as células VERO e RK-13 (Crabb & Studdert, 1995).

Extração do DNA genômico viral

O DNA genômico viral foi obtido a partir de cultivos de células ED em garrafa “roller” de cultivo de 850 cm^2 , mantidos em rotação de 20 giros/hora, durante 24 horas, para formação da monocamada. Utilizou-se um volume final de 200 ml de MEME acrescido de 10% de soro fetal bovino com antibióticos e antifúngicos nas concentrações de 1,0–2,0% (10.000 UI) e células ED na concentração inicial de $4,5 \times 10^4$ células. Depois 24 horas, era feita a inoculação viral, dando início ao ciclo de replicação no cultivo (48-72 horas) e à conseqüente produção de massa viral. Todo o volume produzido foi coletado em fluxo laminar, procedendo-se seqüencialmente a dois passos de centrifugação para a obtenção do pellet composto por partículas virais (6000 g, 10 minutos para clarificação / 120.000 g, 90 minutos para sedimentação viral) (Rimstad *et al.*, 1992). A extração do DNA genômico foi feita com fenol-clorofórmio, após digestão com proteinase K (10 mg/ml) e SDS a 0,1% (65°C por 15 minutos) (Sambrook *et al.*, 1989). Todos os DNAs foram analisados em espectrofotômetro para checagem das respectivas concentrações e purezas.

Análise de restrição por endonucleases

O DNA viral de cada amostra foi submetido à clivagem pela endonuclease *Bam*HI (Galosi *et al.*, 1998), sob as condições recomendadas pelo fabricante (Life Technologies®). Os produtos da digestão foram separados por eletroforese em gel de agarose 0,7% a 20 V por 16 horas, com o tampão de eletroforese TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0). Os géis foram corados com brometo de etídio (1 µg/ml) e fotografados sob luz UV (Sambrook *et al.*, 1989).

Seqüenciamento

O seqüenciamento dos fragmentos de PCR para geração de cromatogramas foi feito em seqüenciador ABI 377® (Perkin-Elmer, CA, USA).

Análise Filogenética:

A) Validação das seqüências

As seqüências derivadas de cada fragmento de PCR de cada um dos vírus foram submetidas à checagem pela repetição da mesma reação de seqüenciamento, por pelo menos três vezes, para obtenção da seqüência-consenso. As seqüências-consenso foram produzidas com o emprego da versão 7.01 do aplicativo BIOEDIT (Hall, 1999).

B) Comparação de seqüências

As seqüências-consenso obtidas a partir dos fragmentos de PCR produzidos foram comparadas com seqüências disponíveis no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), através de algoritmos de busca e comparação de seqüências disponíveis no próprio GenBank (“blast”).

C) Análise das seqüências obtidas para montagem da árvore filogenética

Para a obtenção da árvore filogenética foi usada a versão 7.01 do aplicativo BIOEDIT (Hall, 1999). O alinhamento das seqüências foi realizado com o aplicativo ClustalW, versão 1.83 (Thompson *et al.*, 1994), tendo como parâmetro 2000 replicações de “bootstrap”, com o objetivo de assegurar um alto índice de confiabilidade à análise (Efron *et al.*, 1996). A montagem da árvore foi feita pelo método de “neighbor-joining”, com o algoritmo disponível na versão do pacote de aplicativo MEGA 3 (Kumar

et al., 1994), baseado sobre a proporção das diferenças (distância p) existentes entre as seqüências estudadas.

Análise funcional de seqüências

Para o estudo e determinação funcional das seqüências obtidas foi usado o aplicativo GENERUNNER (<http://www.generunner.com>).

RESULTADOS

Imortalização das células ED

O protocolo de imortalização celular foi feito com células ED de passagem 40, já apresentando sinais de senescência. Após experimento de transformação (figuras 6 e 7), as células remanescentes chegaram a 117 passagens no período em que foi realizado este estudo, enquanto que o controle negativo, de mesma origem celular, não ultrapassou 42 passagens.

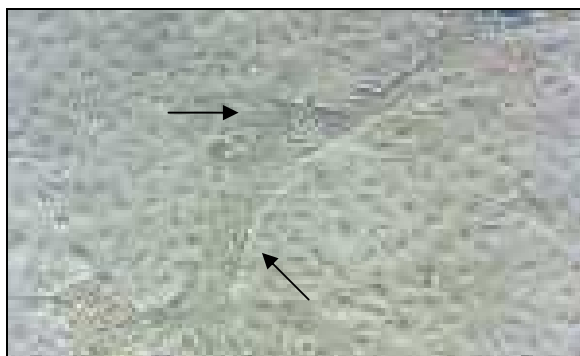


Figura 6 - Células ED, passagem 42, na segunda passagem após a transfecção com o vetor pLPC- hTERT. Observar feixes de células fibroblásticas (indicadas pela seta).



Figura 7 – Células ED, passagem 55, quinze passagens após a transfecção com o vetor pLPC- hTERT. O cultivo celular tem aspecto homogêneo, constituído por células poligonais.

O número de cromossomos para *Equus caballus* é de $2n=64$ (Buckland *et al*, 1976). Uma contagem cromossômica preliminar (tabela 1) indicou que, em média, não houve alterações nesse número para as células transformadas. A figura 8 exemplifica o conjunto cromossômico eqüino em metáfase.

Tabela 1 – Contagem cromossômica preliminar para células ED

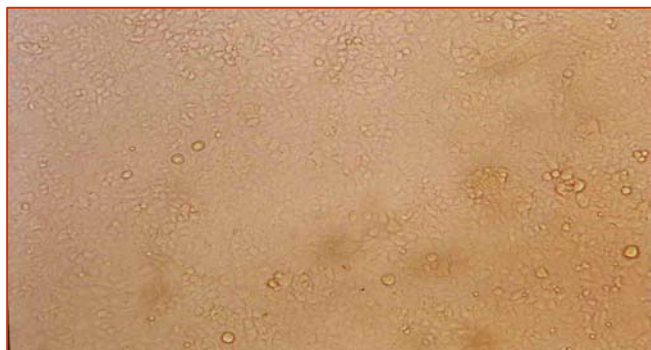
Número de Metáfases	Número de cromossomos
1	62
10	64
1	70



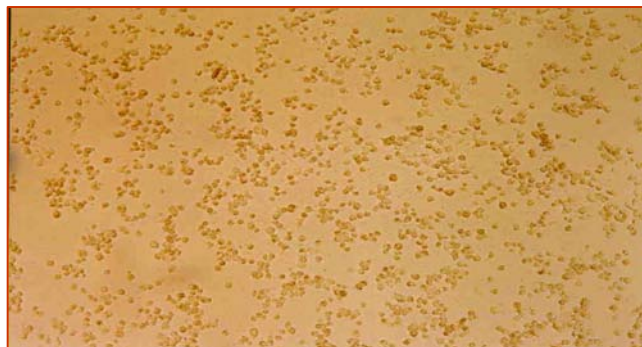
Figura 8 – Cromossomos metafásicos (XY + 62 cromossomos autossômicos) provenientes de uma célula ED transformada (passagem 55).

Replicação viral em sistemas celulares

As amostras controles de EHV-1 foram replicadas com sucesso nos diversos tipos celulares utilizados, como células de cultivo eqüinas ED e FEK, células das linhagens VERO, RK-13 e CER. Em relação ao EHV-4, o efeito citopático não ficou evidenciado em células ED (dados não demonstrados). A replicação do EHV-1 em CER é demonstrada na figura 9B



9A - Controle negativo para monocamada CER.



9B - Amostra do efeito citopático por EHV-1 (*Hannover*) em CER após 48 horas de infecção *in vitro*, com exacerbado processo de citólise.

Titulação viral

Foi realizada uma titulação comparativa para as amostras de EHV-1 Kentucky-D, Hannover e BR. Cada amostra foi previamente adaptada aos tipos celulares VERO, ED e CER por três passagens consecutivas antes da titulação. Os resultados estão descritos na tabela 2.

Tabela 2 – Resultados da titulação das amostras de EHV-1 Hannover e BR em três diferentes tipos celulares

	ED	VERO	CER
Kentucky-D	10 ^{4,55} CCID 50%/ml	10 ^{4,95} CCID 50%/ml	10 ^{3,75} CCID 50%/ml
BR	10 ^{3,2} CCID 50%/ml	10 ^{4,2} CCID 50%/ml	10 ^{3,95} CCID 50%/ml
Hannover	10 ^{6,2} CCID 50%/ml	10 ^{6,2} CCID 50%/ml	10 ^{5,45} CCID 50%/ml

(CCID: Celular Culture Infectant Dose)

PCR

Não foi possível padronizar a técnica da PCR para o diagnóstico do EHV-1, utilizando-se os iniciadores descritos para o gene da glicoproteína C e o gene 76 (Lawrence *et al.*,1994) e moldes de DNA derivados de cultivos celulares infectados por Hannover, BR e Kentucky-D (EHV-1) e 1942 (EHV-4). Não foram observadas bandas com tamanho esperado no gel de eletroforese

A padronização da PCR descrita para o gene tk de EHV-1 foi realizada a partir de DNAs extraídos de cultivos infectados com as amostras Hannover, BR e Kentucky-D em termociclador com gradiente para o anelamento dos iniciadores ao DNA molde (50°C até 60 °C). As figuras 10A e 10B apresentam os resultados obtidos.

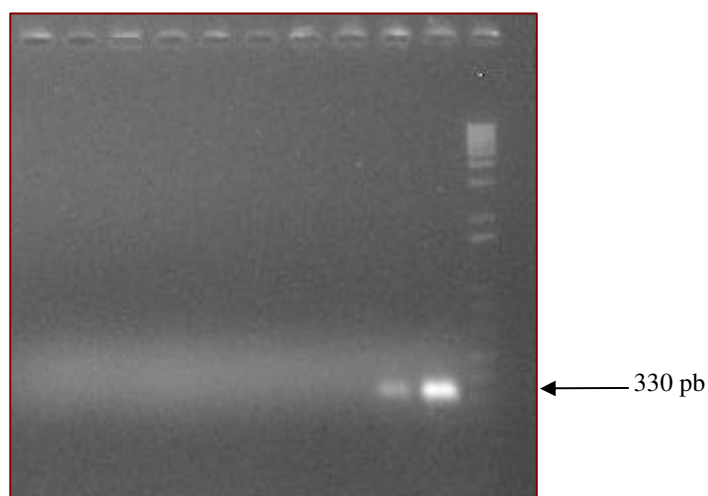


Figura 10A – Padronização da PCR do fragmento tk para Kentucky-D em gradiente de anelamento (50°C até 60 °C): bandas da esquerda para direita Kentucky-D com anelamento de 59 °C, Kentucky-D com anelamento de 60 °C e marcador de peso molecular (1 kb plus DNA ladder[®]).

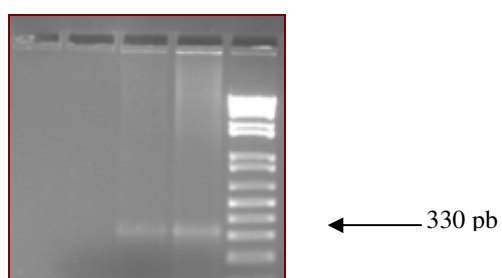


Figura 10B – PCR do fragmento tk (330 pb): terceira coluna da esquerda para direita: Hannover, Br e marcador de peso molecular (1 kb plus DNA ladder[®]).

Isolamento viral

As passagens em cultivo de células ED do material das coletas I, II e III (swabs e amostras sanguíneas) tiveram resultados negativos, sem a presença de efeito citopático evidente. Para o material derivado de abortos foram observados os resultados descritos na quadro 3.

Quadro 3 – Resultado para a o isolamento viral em amostras de tecidos de 20 abortos equinos:

A – Aborto/Ano. Baço (B), Fígado (F), Pulmão (P), Timo (T), não especificado (). Efeito suspeito não confirmado (?); isolamento (+).

amostra	célula	Passagem	efeito	célula	passagem	efeito	célula	passagem	efeito
A4/97	“ “	“ “	-	“ “	“ “	-	“ “	“ “	-
A4/99	“ “	“ “	-	“ “	“ “	-	“ “	“ “	-
A3/00 F	“ “	“ “	-	“ “	“ “	-	“ “	“ “	-
A1/01 B	ED 64	1 ^a	-	ED 66	2 ^a	-	ED 67	3 ^a	-
A3/01 T	“ “	“ “	-	“ “	“ “	-	“ “	“ “	-
A7/01 F	“ “	“ “	-	“ “	“ “	-	“ “	“ “	-
A7/01	“ “	“ “	-	“ “	“ “	-	“ “	“ “	-
A7/01 P	“ “	“ “	-	“ “	“ “	-	“ “	“ “	-
DATA		26/08/03	-		08/10/03			16/10/03	
A5/97	“ “	“ “	-	“ “	“ “	-			
A1/98	“ “	“ “	-	“ “	“ “	-			
A2/99	“ “	“ “	-	“ “	“ “	-			
A4/00 F	“ “	“ “	-	“ “	“ “	-			
A3/01 F	ED 67	1 ^a	-	ED 68	2 ^a	-			
A9/01 F	“ “	“ “	-	“ “	“ “	-			
DATA		17/10/03			30/10/03				
A6/97	“ “	“ “	?	“ “	“ “	?	“ “	“ “	-
A3/99	“ “	“ “	-	“ “	“ “	-	“ “	“ “	-
A2/00 F	“ “	“ “	-	“ “	“ “	-	“ “	“ “	-
A9/00	“ “	“ “	-	“ “	“ “	-	“ “	“ “	-
A2/01 F	ED 67	1 ^a	-	ED 68	2 ^a	-	ED 72	3 ^a	-
A3/01 B	“ “	“ “	-	“ “	“ “	-	“ “	“ “	-
A7/01 B	“ “	“ “	?	“ “	“ “	?	“ “	“ “	-
A8/01 P	“ “	“ “	?	“ “	“ “	?	“ “	“ “	-
A8/01 F	“ “	“ “	-	“ “	“ “	-	“ “	“ “	-
DATA		21/10/03			30/10/03			18/11/03	
A2/97	“ “	“ “	-	“ “	“ “	-			
A3/97	“ “	“ “	-	“ “	“ “	+			
A1/99	ED 69	1 ^a	?	ED 71	2 ^a				
A2/00 B	“ “	“ “	-	“ “	“ “	-			
A4/00 P	“ “	“ “	-	“ “	“ “	-			
A1/01 P	“ “	“ “	-	“ “	“ “	-			
A2/01 P	“ “	“ “	-	“ “	“ “	-			
DATA		03/11/03			12/11/03				

Na segunda passagem em células ED imortalizadas, a amostra A3/97 mostrou-se positiva para a infecção viral, com ECP característico de herpesvírus. Uma terceira passagem, já em garrafa de 25 cm², confirmou a atividade viral (figura 11). Foram observados no cultivo agrupamentos heterogêneos de células, com o desprendimento da monocamada associado com alterações morfológicas, como arredondamento celular e aumento da opacidade. Foram notados ainda pontos de fusão celular, com a formação de sincícios.

A presença de ECP em células VERO também foi verificada. Procedeu-se então ao diagnóstico pela PCR do gene tk, que confirmou o isolado como EHV-1. Este isolado viral foi batizado como BR01/UNICAMP/2004.



Figura 11 - Efeito citopático por EHV-1 em ED após 48 horas de infecção *in vitro*. Vírus EHV-1 BR01/UNICAMP/2004 – Isolado de aborto, amostra de tecido A3/97, terceira passagem em célula ED.

Análise de restrição para o genoma viral de amostras de EHV-1

A produção em larga escala de partículas virais em “rollers” resultou em um rendimento médio de 150 ml de sobrenadante viral/roller. Após a formação do pellet viral por ultracentrifugação (120.000 g/ 90 minutos), o DNA foi extraído e digerido “overnight” com a enzima *Bam*HI. A figura 12 evidencia os resultados obtidos para uma das digestões realizadas.

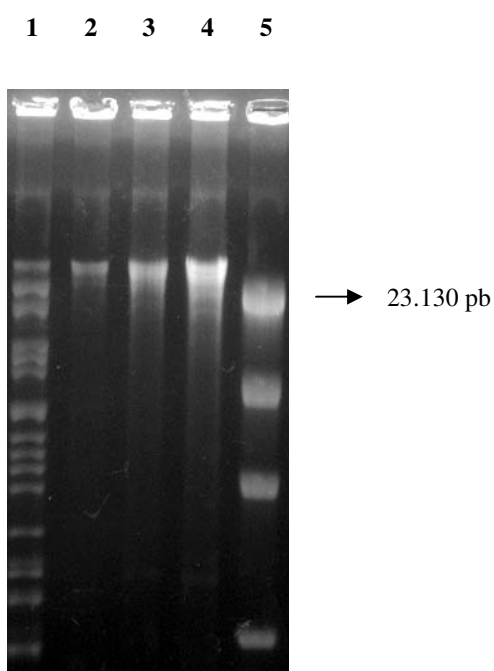


Figura 12 – Eletroforese para as digestões dos genomas de EHV-1: Cepa de Referência Kentucky-D (1); vírus BR (2); vírus isolado BR01/UNICAMP/2004 (3); vírus Hannover (4); marcador de peso molecular λ DNA/Hind III[®] (5).

Sequenciamento

As seqüências obtidas a partir de fragmentos de PCR de uma região do gene tk para a cepa Kenutcky-D e isolados Hannover, BR e BR01/UNICAMP/2004 foram submetidas ao alinhamento de seqüências via “blast” (Altschul *et al.*, 1997). A figura 13 exemplifica graficamente o alinhamento obtido para o isolado BR01/UNICAMP/2004. O comparativo de maior similaridade obtido para essa seqüência está descrito de forma esquemática na figura 14, e as cinco seqüências mais representativas, com os respectivos números de depósito no GenBank, encontram-se disponíveis no anexo II (página 57).

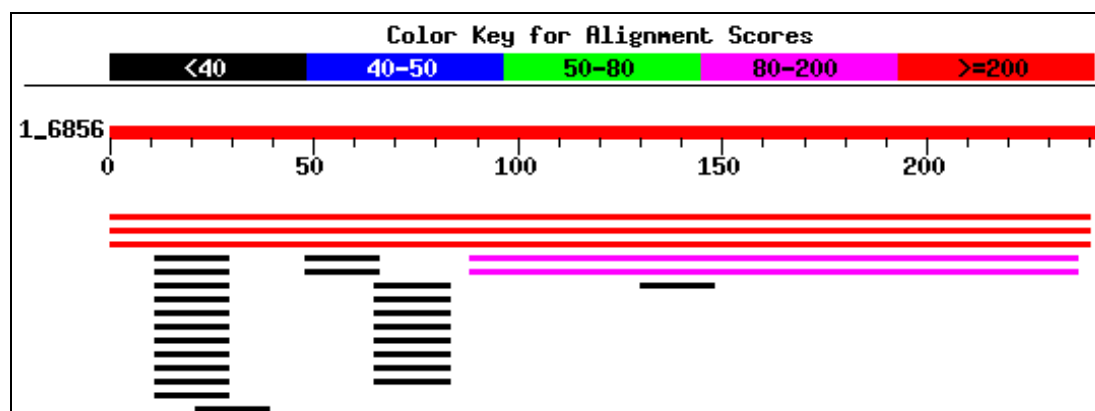


Figura 13 – Resultado para alinhamento de seqüências de fragmentos de PCR da região 5’ do gene tk do isolado BR01/UNICAMP/2004. Linhas vermelhas: seqüências de EHV-1 disponíveis para a região estudada. Linhas magenta: seqüências de EHV-4 disponíveis para a região estudada.

```

Equine herpesvirus 1 (EHV1) thymidine kinase gene (EC 2.7.1.21)
UL24 gene homologue and gH gene 5'-part
Length = 3146
Score = 479 bits (241), Expect = e-132
Identities = 241/241 (100%)
Strand = Plus / Plus

Query: 1   ccgctgccgcctttgtactaaaggctttggccttggttcctttggcgacgcaccgcctcc 60
          |||
Sbjct: 439 ccgctgccgcctttgtactaaaggctttggccttggttcctttggcgacgcaccgcctcc 498

Query: 61   ttgtcgatttagctgaaactggtggagcgtattccgcaaacgtgatatggtgcaggata 120
          |||
Sbjct: 499 ttgtcgatttagctgaaactggtggagcgtattccgcaaacgtgatatggtgcaggata 558

Query: 121  gcacggcagcgttgctatatacaacctgtggcgataaacgcggttaccgcgaacacccgca 180
          |||
Sbjct: 559 gcacggcagcgttgctatatacaacctgtggcgataaacgcggttaccgcgaacacccgca 618

Query: 181  ttctcgttgagctacaaactagtagcggagctagtagcatctcaccgcttcccgggg 240
          |||
Sbjct: 619 ttctcgttgagctacaaactagtagcggagctagtagcatctcaccgcttcccgggg 678

Query: isolado de EHV-1 BR01/UNICAMP/2004
Sbjct: isolado de EHV-1 HVS25A

```

Figura 14 - Resultado para alinhamento de seqüências via blast para fragmento de PCR da região 5' do gene tk do isolado BR01/UNICAMP/2004.

Filogenética

A variabilidade genética de uma região localizada a montante do gene tk (figura 15) foi explorada pela comparação de seqüências dos fragmentos de PCR das amostras estudadas. Após a comparação em banco de dados (GenBank), observou-se um alto grau de similaridade entre todas as seqüências de EHV-1 disponíveis e os fragmentos seqüenciados (figura 14; anexo II).

	5'	11	21	31	41	51	61	71	81	91
1	CGGATCGCGC	CTCGGTGTTG	GAGCTGACGG	TGAATGTAGG	TCCGCTCCAA	AAGTTAAGCG	GAAATGGCGG	GGCTATAAAG	TTTCGGACGT	GTGCGGTAT
	GCCTAGGCGG	GAGCCACACG	CTCGACTGCC	ACTTACATCC	AGGCGAGGTT	TTCAATTCCG	CTTTACCGCG	CCGATATTTG	AAAGCGTGCA	GACAGCCATA
101	AGTGGACGCTG	GGCGTATCGG	TTACGTAAAG	CGATCCTAAC	ACATAATTCA	CATACCTCCG	CATCTCCACC	GGCACTATAA	GGTCTTTAGC	TTGCACTTTA
	TCACCTGCAAC	GGCGATAGCG	AATGCAATTC	GCTAGGATTC	TGTATTAACT	GTATGAGGCG	GTAGAGGTGG	CGCTGATATT	CCAGAAATCG	AAAGCTAGAT
201	GTGTTTATAC	TTGCGGTAGG	GGCGGCCGAC	AAAAAAGGG	GCACCTCGCT	TTAATTGCAC	GGGCTTTTAT	TTTGGGCAAA	AAAGGGACGG	CGCCGAGGCG
	CACAAATATG	AACGCCACATC	CGCGCGGGTG	TTTTTTTCCC	GGTGAGCAGA	AATTAACGTG	GGCGAAATAA	AAACCCCTTT	TTTCCCTGCG	CGGGTCCGCG
301	AGGGGGTTTA	GGTGGGATAC	AGCCACCGGC	TGATGGACGG	GGGTGCGTTT	AGTGGTGTTC	GGGGGACCG	CAGCTGAAAA	TAAACTCAGG	ACGGCGGGTG
	TCCCGCAAA	GCACGCTATG	TGGTGGCGCG	ACTACCTGGC	GGCGAGCGAA	TCACCAAAAA	GGGCGCTGGC	GTGACCTTTT	ATTGAGTGCG	TGGCGCGGAC
401	CCGCTGACGG	CTGGGCTGGC	CTTATAGATG	CGACTGGCTC	CGCTGCGCGC	TTTGTACTAA	AGGCTTTGGC	CTTGCTTGGT	TTGGCGACCG	ACCGCTCCCT
	GGCGACTGCG	GACCCGACCG	CAATATCTAC	CGTGACCGAG	GGGAGGGCGG	AAACATGATT	TCCGAAACGG	GAACCAAGGA	AAACGGTGCG	TGGCGGAGGA
501	TGTGCAATTA	GCTGAACTG	GTGGAGCGTA	TTCCGCCAAA	CGTCATATGG	TGCAGGATAG	CAGGGCAGCG	TTGCTATATA	CAACCTGTGG	CGATAACCGC
	ACAGCTAAAT	CGACTTTGAC	CACCTCGCAT	AAGGCGGTTT	GCACATATCC	ACGTCCTATC	GTGCGTCCCG	AACGATATAT	ATTGGACACG	GCTATTTGCG
601	GTATCCCGCA	ACACCCGCAT	TCCTCGTTGA	GCTACAAACA	CTAGTACCGG	AGCTAGTACG	ATCTCACCGC	TTCCCGGGGG	TAGCGTTCTC	GGGAGCAACC
	CAATGGGCGT	TGTGGGCGTA	AGGAGCAACT	CGATGTTTGT	GATCATGGCG	TCGATCATGC	TAGAGTGGCG	AAGGGCCCCG	ATCGCAAGAG	CGGTCGTTGG
701	TGCACGAGTC	ATGTACTGGT	CGCATGCGCC	CGTTCCGCTG	TAGATTTTGA	CTGCGGCTGT	TCATATTTTT	GGAAAAAGCA	CACGTTTTTA	GCTCTATTAG
	ACGTGCTGAG	TACATGACCA	CGCTACGGGG	GGAAAGCGAC	ATCTAAAAAT	GAGCGCCACA	AGTATAAAAA	CGTTTTCCCT	GTGCAAAAA	CGAGATAATC
801	GATGCACACT	CCCTTGCGGT	CAGAACCCCT	TCCAAATTGC	ACGGTACAGA	CACAACTCCG	GGCGCGCTGT	CCGAGTTTAA	CCTCAAAAGG	CAGAGACACG
	CTACGTGTGA	GGGAACCGCA	GTCTTGGGAA	AGGTTTAACG	TGCCATGTCT	GTGTTAGGCG	GGCGGCGACA	GGCTCCAAAT	GGAGTTTCCG	GTCTCTGTGG
901	CCCACTGCGC	TTTTAGAGT	TTCCGCTGGC	ACCACTTCAC	TAAAAAGGGG	AGCAAGCGTC	TCTCCGTACA	GGCGGTTTCC	CTTGGCGGTT	GGCAGGTCTT
	GGGTACCGCG	AAAAATTCTA	AAGGCGACCG	TGGTCAAGTG	ATTTTTCCCG	TCGTTCCGAG	AGAGGCAATG	GGGGCAAGCG	GAGCCCGGAA	CGGTCCAGAA
1001	GAACCATCGC	CTTATAGAGG	CGGTTGTGGC	ACCGTATACC	AGCTCTGAGT	GTGCTTGTAG	CTGTCAAGCG	CTGTCTACGT	TTCAATTTTCA	GAATCAATG
	CTTGATAGCG	CAATATCTTC	GGCAACACCG	TGGCATATGG	TCGAGACTCA	GACCAAGATC	GACAGTCTCG	CACAGATGCA	AAATAAAGT	CTTAGGTTAC

Figura 15 – Contexto gênico para a PCR do gene tk de EHV-1. Fragmento de 330 pares de base em negrito.

Foi possível estabelecer uma filogenia para os fragmentos amplificados do gene tk. A filogenia comparou os isolados BR, Hannover, BR01/UNICAMP/2004, a cepa Kentucky-D e seqüências disponíveis para outros vírus da subfamília *Alfaherpesvirinae*. As siglas de acesso ao GenBank seguidas pelo nome de cada espécie viral estão disponíveis na filogenia descrita (figura 15).

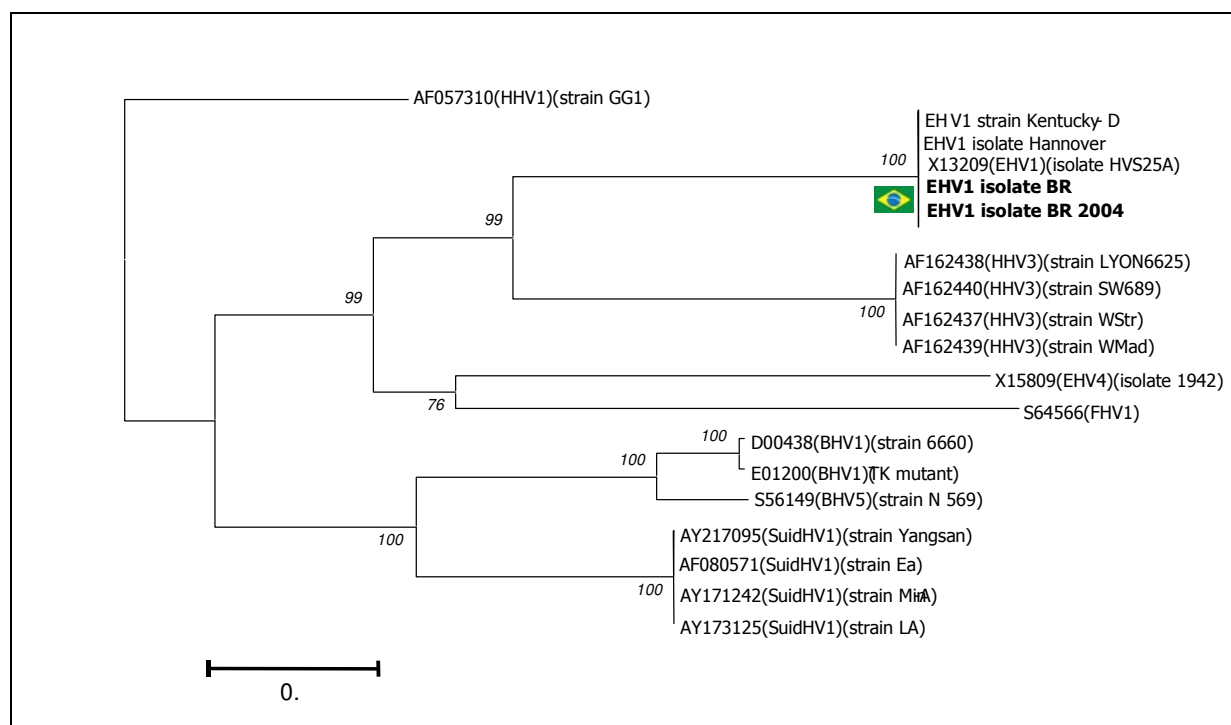


Figura 16 - Árvore filogenética para uma região 5' do gene tk para os isolados de EHV-1 BR, Hannover, BR01/UNICAMP/2004, a cepa de EHV-1 Kentucky-D e seqüências disponíveis para a mesma região de outros vírus da sub-família *Alfaherpesvirinae*.

Análise funcional de seqüências

A análise funcional das seqüências geradas detectou ao menos 11 elementos regulatórios em potencial para a atividade gênica (tabela 3, figura 17).

Tabela 3 – Elementos regulatórios para o gene tk

*Posições relativas à seqüência do gene tk disponível no anexo IV, páginas 61-62.

ELEMENTO REGULATORIO	POSICÃO*	SEQÜÊNCIA
GC BOX (SP1)	5-10	GGGCCGG
TATA BOX	72-76	TATA
TATA BOX	97-100	TATA
TATA BOX	175-178	TATA
TATA BOX	205-208	TATA
GC BOX (SP1)	289-294	GGGCCGG
ENHANCER (AP4)	367-376	CCAGCTGCGG
TATA BOX	422-425	TATA
TATA BOX	574-579	TATATA
TATA BOX	1012-1015	TATA
TATA BOX	1034-1037	TATA
CODON DE INICIAÇÃO (<i>orf</i> 38)	1097-1099	ATG

5'	11	21	31	41	51	61	71	81	91	
1	CGGATCGCGC GCCTAGCGCG	CTCGGTGTTG CAGCCACAAC	GAGCTGACGG CTCGACTGCC	TGAATGTAGG ACTTACATCC	TCCGCTCCAA AGGCGAGGTT	AAGTTAAGCG TTCAATTCCG	GAAATGGCGG CTTTACGCGC	GGGTATAAAG CCGATATTTG	TTTCGCACGT AAAGCGTGCA	CTGTCCGTAT GACAGCCATA
101	AGTGGACGTG TCACCTGCAC	GGCGTATCGC CGGCATAGCG	TTACGTAAAG AATGCATTTC	CGATCCTAAC GCTAGGATTG	ACATAATTCA TGTATTAGT	CATACTCCGC GTATGAGGCG	CATCTCCACC GTAGAGGTGG	GGGACTATAA CGGTGATATT	GGTCTTTAGC CCAGAAATCG	TTCGATCTTA AAGCTAGCAAT
201	GTGTTTATAC CACAAATATG	TTGCGTGTAG AAGCCACATC	GCGCGCCGAC CGCGCGGCTG	AAAAAAGGCG TTTTTTTCCC	GCACTCGTCT CGTGAGCAGA	TTAATTGCAC AATTAACGTG	CGGCTTTTAT GCGGAAAATA	TTTGGGAAA AAACCCCTTT	AAAGGGACCG TTTCCGTGCC	CGCCAGGCG GCGGCTCCGC
301	AGGGGGTTTA TCCCCCAAT	CGTGGGATAC GCACGCTATG	AGCCACCGGC TCGGTGCCCG	TGATGGACCG ACTACCTGGC	CGGCTGCGTT GCGCAGCGAA	AGTGGTGTTC TCACCAACAA	GCGGGACCG CGGCCCTGCG	CAGCTGGAAG GTGACCTTTT	TAAACTCAGC ATTTGAGTGC	ACGGCGGCTG TGCGCGGAC
401	CGGCTGACGG GGCGACTGCC	CTGGGCTGGC GACCCGACCG	GTATAGATG CAATATCTAC	GCACTGGCTC CGTGACCGAG	CGGTGCGCGC GCGCAGCGCG	TTTGTACTAA AAACATGATT	AGGCTTTGGC TCCGAACCGC	CTTGGTTCCT GAACCAAGGA	TTGGCGACCG AACCGCTGCG	ACGCGCTCCT TGCGGAGGA
501	TGTCGATTTA ACAGCTAAT	GGTGAACGTG CGACTTTGAC	GTGGAGCGTA CACCCTCGCAT	TTCCGCCAAA AAGGCGGTTT	CGTGATATGG GCACTATACC	TGCAGGATAG ACGTCCTATC	CACGGCAGCG GTGCGCTCGC	TTGCTATATA AACCATATAT	CAACCTGTGG GTTGGACACC	CGATAAACGG GCTATTTGCG
601	GTTACCGGCA CAATGGGCGT	ACACCCGCGT TGTGGGCTA	TCCTCGTTGA AGGAGCAACT	GCTACAAACA CGATGTTTGT	CTAGTACCGG GATCATGGCC	AGCTAGTACG TCGATCATGC	ATCTCACCGC TAGAGTGCGC	TTCCCGGGGG AAGGGCCCCC	TAGCGTTCTC ATCGCAAGAG	GCGAGCAACC CGGTGCTTGG
701	TGCACGAGTC ACGTGCTCAG	ATGTAETGGT TACATGACCA	CGCATGCGCC CGGTACGGGG	CCTTCCGCTG GGAGGCGGAC	TAGATTTTTA ATCTAAAAAT	CTCGCGGTGT GAGCGGCACA	TCATATTTTT AGTATAAAAA	GGAAAAAGGA CCTTTTCGCT	CACGTTTTTA GTGCAAAAA	GCTCTATTAG CGAGATAATC
801	GATGCACACT CTACGCTGTA	CCCTTGGCGT GGGAACCGCA	CAGAACCCCT GTCTTGGGAA	TCCAAATTGC AGGTTTAACG	ACGGTACAGA TGCCATGTCT	CACAATCCGG GTGTTAGGCG	GCGCCGCTGT CGCGGGGACA	CCGAGGTTAA GGCTCCAATT	CCTCAAGGCG GGAGTTTCCG	CAGAGACACG GTCTGTGTGC
901	CCCACTGCGG GGGTACGCGC	TTTTAAGAGT AAAATTCTCA	TTCCGCTGGC AAGGCGACCG	ACCACTTAC TGGTCAAGTG	TAAAAAGGGG ATTTTTCCCC	AGCAAGCCTC TCGTTCCGAG	TCTCCGTACA AGAGGCATGT	CGCCGTTTCC GCGGCAAGCG	CTTGGCGCTT GAACCGCGCA	GCCAGGTCTT CGGTCCAGAA
1001	GAAACCATCG CTTGCTAGCG	GTATAGAAAG CAATATCTTC	CGGTTGTGGC GCGGACACCG	ACCCATATCC TGCCATATGG	AGCTCTGAGT TGGAGACTCA	CTGCTTCTAG GACGAAGATC	CTGTCTAGAG GACAGCTTGC	CTGTCTACGT GACAGATGCA	TTCAATTTCA AAGTAAAGCT	GAAATCAATC CTTTAGTTAC

Figura 17 - Análise da região 5' do gene tk com o uso do aplicativo GENERUNNER: verde (TATA), vermelho (SP1), azul (AP4), preto (códon de iniciação para o gene tk, sequência de BR01/UNICAMP/2004).

DISCUSSÃO

Epidemiologia

O EHV-1 é um vírus cosmopolita, distribuindo-se nas populações de cavalos de diversos países (Crabb & Studdert, 1995). No Brasil, o EHV-1 foi detectado pela primeira vez em 1964 (Corrêa & Nilsson, 1964) sendo posteriormente isolado em estados do sul e sudeste (Nilsson & Corrêa, 1966; Weiblen *et al.*, 1994; Moreira *et al.*, 1998). Os levantamentos feitos retratam uma grande variação nos índices de prevalência viral, estimados entre 17,6% (São Paulo) e 84,7% (Rio Grande do Sul) (Fernandes, 1998; Modolo *et al.*, 1989; Vargas & Weiblen, 1991; Moreira *et al.*, 1998; Cunha *et al.*, 2002). Dados moleculares levantados em Minas Gerais mostraram 88% de positividade para EHV-1 (Carvalho *et al.*, 2000), valor similar ao encontrado na análise sorológica feita por Vargas e Weiblen no Rio Grande do Sul (Vargas & Weiblen, 1991). No seu conjunto, as informações disponíveis indicam que o EHV-1 está circulando de forma significativa nas populações eqüinas do Sul e do Sudeste brasileiros. O alto índice de animais sorologicamente positivos, em contraste com um número baixo de sinais clínicos reportados, parece indicar a importância das infecções assintomáticas no ciclo do EHV-1 (Cunha *et al.*, 2002).

A situação epidemiológica do EHV-1 nas populações eqüinas brasileiras ainda não é compreendida em sua plenitude. Estatisticamente, o isolamento viral de uma amostra (BR01/UNICAMP/2004) entre 20 abortos é condizente com as estimativas americanas (Giles *et al.*, 1993; Hong *et al.*, 1993), sugerindo semelhanças para a presença do vírus nos dois países. Por outro lado, é relatada uma frequência de 19% para isolamento de amostras de EHV-1 no Paraná (Moreira *et al.*, 1998), significativamente superior à encontrada no presente trabalho.

Apesar de a literatura internacional descrever o EHV-4 como um vírus de caráter endêmico, praticamente nada é conhecido sobre ele no Brasil. Ainda não há nenhuma avaliação sorológica específica disponível e os dados moleculares não traçam um retrato da sua prevalência (Carvalho *et al.*, 2000). Não se pode descartar que o EHV-4 esteja simplesmente ausente nos grupos de animais estudados. Em concordância com os levantamentos realizados, o presente trabalho não detectou a presença do EHV-4 nas amostras processadas para o isolamento viral.

Padronização de técnicas

A padronização dos métodos ligados à coleta de material de campo e ao cultivo de diversos tipos celulares estabeleceram a base para o isolamento de alfa-herpesvírus eqüinos e o seu diagnóstico no Laboratório de Virologia Animal do Depto. de Microbiologia-IB/UNICAMP. De modo geral, foi estabelecida uma rotina laboratorial para a prospecção viral em material biológico diversificado. Ao mesmo tempo, a observação da célula de linhagem CER como permissiva ao EHV-1, bem como a produção de um tipo celular eqüino não senescente, constituíram-se em avanços técnicos relevantes para o isolamento, diagnóstico e replicação *in vitro* do EHV-1. Paralelamente, a amostra de EHV-4 usada neste trabalho não produziu efeito citopático evidente (dados não publicados), o que provavelmente está associado com a perda da viabilidade viral. Dessa forma, não foi possível realizar a confirmação diagnóstica da amostra mencionada como sendo de EHV-4.

A padronização das reações de PCR para os genes gC e 76 (Lawrence *et al.*, 1994) falhou tanto para o isolado brasileiro BR como para as cepas Kentucky-D, Hannover e 1942. Esse insucesso pode ter ocorrido devido ao alto conteúdo de GC presente nessas regiões. É pertinente notar que essas mesmas reações também não puderam ser padronizadas por outro grupo de pesquisa do Estado de São Paulo (Dra. E. S. Cunha, comunicação pessoal, 2003). Por outro lado, a padronização da PCR para o gene tk permitiu o diagnóstico molecular do EHV-1 isolado no nosso laboratório, bem como a confirmação das identidades das amostras BR, Hannover e Kentucky-D como herpesvírus eqüinos do tipo 1.

Apesar do sucesso inicial na produção de massa viral, não foi possível realizar a análise de restrição para as amostras BR, BR01/UNICAMP/2004 e Hannover. Foi descartada a degradação da enzima usada, pois a amostra Kentucky-D sofreu digestão total (todos os DNAs foram digeridos com a mesma enzima). A confirmação da identidade viral para os DNAs extraídos foi refeita através da PCR, como forma de eliminar eventuais dúvidas em relação à origem dos DNAs. Todos os DNAs foram analisados em espectrofotômetro para checagem das respectivas concentrações e purezas. Os resultados foram semelhantes. Mesmo com todas as (re) checagens não foi possível estabelecer uma causa para a não separação das bandas de digestão durante a eletroforese. Esse experimento foi repetido pelo menos seis vezes em momentos diferentes do presente trabalho. Pela relativa estabilidade genômica associada à família *Herpeviridae*, é provável que tenha havido a inibição da atividade enzimática para a reação de digestão. Muitos aspectos relacionados à digestão do DNA viral podem causar esse tipo de inibição, entre eles a metilação dos sítios de restrição no genoma e a contaminação por DNA celular (<http://www.fermentas.com/techinfo/re/troubleshoot.htm>).

Análise genômica

Após a comparação em banco de dados (GenBank), observou-se um alto grau de similaridade, sem a presença de divergências, entre todas as seqüências de EHV-1 disponíveis e os fragmentos seqüenciados.

A análise funcional da região seqüenciada revelou a presença de oito potenciais elementos regulatórios TATA (posição 574-579, tabela 4). O número de possíveis elementos de regulação para toda região a montante da ORF tk (tabela 4), além da presença de outras duas ORFs (ORF 36 e ORF 37) encontradas no mesmo sítio (figura 18), leva à suposição de que a região deve ter uma grande importância no funcionamento da maquinaria gênica viral. Um trabalho prévio de seqüenciamento para o mesmo sítio indicou a presença de três elementos TATA (Robertson & Whalley, 1998), sendo que dois dos quais foram também identificados em nosso levantamento (posições 574-579 e 1012-1015, tabela 3).

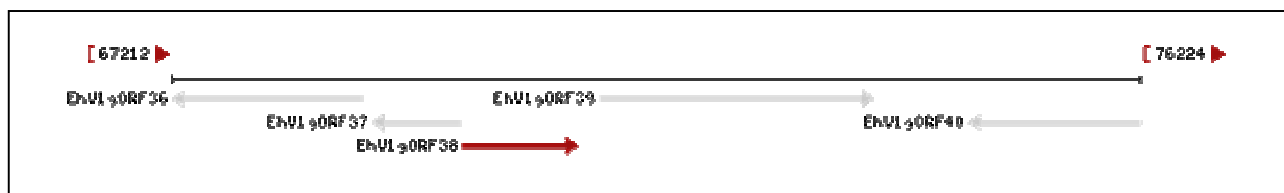


Figura 18 – Contexto genômico para o gene tk (ORF 38), região localizada entre as posições 67212 e 76224 do genoma do EHV-1 (GenBank)

CONCLUSÕES

No presente trabalho, demonstrou-se a permissividade da linhagem celular CER ao EHV-1. Há, portanto, uma indicação de sua viabilidade em pesquisas envolvendo o EHV-1. As células CER têm sido usadas por nosso grupo de forma extensiva, em estudos envolvendo o pneumovírus aviário e o vírus respiratório sincial bovino, entre outros. Provavelmente, este é o primeiro relato para o uso da célula CER como linhagem hospedeira do EHV-1.

Observa-se que o experimento de transformação das células ED foi bem sucedido. A linhagem celular desenvolvida, nomeada aqui como EDtel, atingiu a marca de 117 passagens *in vitro*, sendo facilmente cultivada. O rendimento médio obtido a cada repique é de 3:1, similar aquele observado nas células ED convencionais. Fazem-se, porém, necessários estudos bioquímicos para comprovar a expressão do gene da telomerase humano.

Foi possível estabelecer um levantamento comparativo de seqüências para amostras de EHV-1. Na região genômica reportada neste trabalho estão contextualizados ao menos três genes (ORF 38, ORF 37 e ORF 36). Os dados levantados com o seqüenciamento de amostras de EHV-1 de origens geográficas distintas (Brasil, Europa e América do Norte) não mostraram divergências, o que pode estar associado hipoteticamente a um processo seletivo construtivo, que impediria a fixação de novas mutações. Isto sugere a importância da mesma região na regulação gênica do EHV-1. Também é um indicativo da fidelidade dos mecanismos de replicação envolvidos na síntese do DNA viral, o que ajuda a explicar o aparente paradoxo para a ausência de mutações pontuais divergentes nos fragmentos seqüenciados.

O isolamento de uma nova amostra nacional de EHV-1 (BR01/UNICAMP/2004) enriquece o pequeno grupo de isolados brasileiros dessa espécie. Espera-se que a análise aqui realizada possa trazer subsídios para novas investigações sobre o impacto dos alfa-herpesvírus eqüinos para saúde animal no plantel brasileiro .

BIBLIOGRAFIA

- Allen G.P., Bryans J.T. Molecular epizootiology, pathogenesis and prophylaxis of equine herpesvirus-1 infections. **Progress in Veterinary Microbiology and Immunology**. 2: 78-144, 1986.
- Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**. 25: 3389-3402, 1997.
- Aubert M.F.A. Methods of calculation of titres. *In* **Laboratory Technique in Rabies**. 445-460, 1996. Meslin F.-X., Kaplan M.M. and Koprowsky H. (eds). World Health Organization, Geneva.
- Ballagi-Pordany A., Klingeborn B., Flensburg J. Equine herpesviruses type 1: detection of viral DNA sequences in aborted foetuses with polymerase chain reaction. **Veterinary Microbiology**. 22: 331-336. 1990.
- Borchers K., Slater J. A nested PCR for detection and differentiation of EHV-1 and EHV-4. **Journal of Virological Methods**. 45: 331-336, 1993.
- Buckland R.A., Fletcher J.A., Chandley A.C. Characterization of domestic horse (*Equus caballus*) karyotype using G- and C- banding techniques. **Experimentia**. 32: 1146-1149, 1976.
- Carvalho R., Oliveira A.M., Souza A.M., Passos L.M.F., Martins A.S. Prevalence of equine herpesvirus type 1 latency detect by polymerase chain reaction. **Archives of Virology**. 145: 1773-1787, 2000.
- Crabb B.S., MacPherson C.M., Reubel G.H., Browning G.F., Studdert M.J., Drummer, H.E. A type-specific serological test to distinguish antibodies to equine herpesviruses 4 and 1. **Archives of Virology**. 140: 245 - 258, 1995.
- Crabb B.S., Studdert M.J. . Epitopes of glycoprotein G of equine herpesviruses 4 and 1 located near the C termini elicit type-specific antibody responses in the natural host. **Journal of Virology**. 67: 6332-8, 1993.
- Crabb B.S., Studdert M.J. Equine herpesviruses 4 (equine rhinopneumonitis virus) and 1 (equine abortion virus). **Advances in Virus Research**. 45: 153-190, 1995.
- Corrêa W.M., Nilsson M.R. Observações preliminares sobre o aborto equino a vírus no Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**. 31: 13-15, 1964.
- Cunha E.M.S., Ferrari, C.I.L., Lara M.C.C.S.H., Silva L.H.Q. Presença de anticorpos contra o herpesvírus equino 1 (HVE-1) em equinos no noroeste do Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**. 69: 1-5, 2002.
- Efron Efron B., Halloran E., Holmes S. Bootstrap confidence levels for phylogenetic trees. **PNAS**. 93: 13429-13434, 1996.

- Fernandes, W. R. Determinação da infecção por herpesvírus eqüino tipo 1 em animais criados no Estado de São Paulo, através da reação de fixação de complemento. **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**. 1988.
- Fernandes, W. R. Mieloencefalopatia protozoótica dos eqüinos. **Arquivos do Instituto Biológico**. 61: 7-10, 1999.
- Frampton A.R Jr., Smith P.M, Zhang Y., Grafton W.D., Matsumura T., Osterrieder N., O'Callaghan D.J. Meningoencephalitis in mice infected with an equine herpesvirus 1 strain KyA recombinant expressing glycoprotein I and glycoprotein E. **Virus Genes**. 29: 9-17, 2004.
- Galosi C.M., Norimine J., Echeverria M.G., Oliva G.A., Nosetto E.O., Etcheverrigaray M.E., Tohya Y., Mikami T. Diversity of genomic electropherotypes of naturally occurring equine herpesvirus 1 isolates in Argentina. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 31: 771-774, 1998.
- Giles R.C., Donahue J.M., Hong C.B., Tuttle P.A., Petrites-Murphy M.B., Poonacha K.B., Roberts A.W., Tramontin R.R., Smith B.J., Swerczek T.W. Causes of abortion, stillbirth and perinatal death in horses (1986-1991). **Journal of American Veterinary Medical Association**. 203: 1170-1175, 1993.
- Gilkerson J.R., Whalley J.M., Drummer H.E., Studdert M.J., Love D.N. Epidemiological studies of equine herpesvirus 1 (EHV-1) in Thoroughbred foals: a review of studies conducted in the Hunter Valley of New South Wales between 1995 and 1997. **Veterinary Microbiology**. 68: 15-25, 1999.
- Gleesson L.J., Coggins, L. Response of pregnant mares to equine herpesvirus 1 (EHV-1). **Cornell Veterinary**. 70: 391-400, 1980.
- Hall T.A. BIOEDIT: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**. 41: 95-98, 1999.
- Hasebe R., Kimura T., Sato E., Okazaki K., Ochiai K., Wada R., Umemura T. Equine herpesvirus-1-induced encephalomyelitis in mice: a comparative study of neuroadapted virus and its parental strain. **Journal of Comparative Pathology**. 127: 118-25, 2002.
- Hong C.B., Donahue J.M., Giles R.C., Petrites-Murphy M.B., Poonacha K.B., Roberts A.W., Smith B.J., Tramontin R.R., Tuttle P.A., Swerczek T.W. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. 5: 560-566, 1993.
- Kirisawa R., Endo A., Iwai H., Kawakami Y. Detection and identification of equine herpesvirus-1 and -4 by polymerase chain reaction. **Veterinary Microbiology**. 36: 57-67, 1993.
- Kumar S., Tamura K., Nei M. MEGA: molecular evolutionary genetics analysis aplicativo for microcomputers. **Computer Application in Biosciences**. 10: 189-191, 1994.

- Lawrence G.L., Gilkerson J., Love D.N., Sabine M., Whalley J.M. Rapid, single-step differentiation of equid herpesviruses 1 and 4 from clinical material using the polymerase chain reaction and virus-specific primers. **Journal of Virological Methods**. 47: 59-72, 1994.
- Learmonth G.S., Love D.N., Wellington J.E., Gilkerson J.R., Whalley J.M. The C-terminal regions of the envelope glycoprotein gp2 of equine herpesvirus 1 and 4 are antigenically distinct. **Archives of Virology**. 607-615, 2001.
- Mackie J.T., MacLeod G.A., Teubel G.H., Studdert M.J. Diagnosis of equine herpesvirus 1 using polymerase chain reaction. **Australian Veterinary Journal**. 74: 390-391, 1996.
- McCann S.H.E., Mumford J.A., Bins M.M. Development of PCR assays to detect genetic variation among equine herpesvirus-1 isolates as an aid to epidemiological investigation. **Journal of Virological Methods**. 52: 183-194, 1995.
- Modolo J.R., Petzoldt K., Gotts-Chalk A.F., Margatho L.F.F., Forlin, W., Carreira E.L.C. Investigação sorológica do herpesvírus eqüino-1 em eqüinos pelo teste de fixação do complemento, considerações sobre seu uso na saúde do haras. **A Hora Veterinária**. 8: 25-27, 1989.
- Moreira N., Krugner E.R., Wharth J.F.G, Biesdorf S.M., Goularte M.M.M, Weiss R.R. Aspectos etiológicos e epidemiológicos do aborto eqüino. **Archives of Veterinary Science**. 3:25-30, 1998.
- Moreira N., Weiss R.R., Krugner E.R. Frequência de anticorpos neutralizantes contra o herpesvírus eqüino tipo 1. **Scientia Agraria**. 1:25-30, 2000.
- Nilsson M.R., Corrêa W.M. Isolamento do vírus do aborto eqüino no estado de São Paulo. **Arquivo do Instituto Biológico de São Paulo**. 33: 23-25, 1966.
- Ostlund E.N. The equine herpesvirus. In Sellon, D.C. **The Veterinary Clinics of North America**. Equine Practice. 1st ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1993.
- Patel J.R. & Heldens J. Equine herpesviruses 1 (EHV-1) and 4 (EHV-4) – epidemiology, disease and imunoprophylaxis: a brief review. **The Veterinary Journal**. 170: 14-23, 2005.
- Pearson P. The use of new staining techniques for human chromosome identification. **Journal of Medical Genetics**. 9: 264-75, 1972.
- Rimstad E. & Evensen O. The identification of equid herpesvirus 1 in paraffin-embedded tissues from aborted fetuses by polymerase chain reaction. **Research in Veterinary Science**. 50: 349-351, 1993.
- Rimstad E., Krona, R., Hyllseth B. Comparison of herpesviruses isolated from reindeer, goats and cattle by restriction nuclease analysis. **Archives of Virology**. 123: 389-397, 1992.

- Robertson G.R. & Whalley M. Evolution of herpes thymidine kinase: identification and comparison of equine herpesvirus 1 thymidine kinase gene reveals similarity to a cell-encoded thymidylate kinase. **Nucleic Acids Research**. 16: 11303-11317, 1988.
- Roizmann B., Desrosiers R.C., Fleckenstein B., Lopez C., Minson A.C., Studdert M.J. The family Herpesviridae: an update. **Archives of Virology**. 123: 425-449, 1992.
- Sabine M., Robertson G.R., Whalley J.M. Differentiation of subtypes of equine herpesvirus 1 by restriction endonuclease analysis. **Australian Veterinary Journal**. 57: 148-149, 1981.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**. 2ed. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989.
- Sharma P.C., Cullinane A.A., Onions D.E., Nicolson L. Diagnosis of equid herpesviruses-1 and -4 by polymerase chain reaction. **Equine Veterinary Journal**. 24: 20-25, 1992.
- Smith, K.C. Herpesviral Abortion in domestic animals. **Veterinary Journal** 153: 253-268, 1997.
- Studdert M.J., Simpson T., Roizman B. Differentiation of respiratory and abortigenic isolates of equine herpesvirus 1 by restriction endonucleases. **Science**. 214: 562-564, 1981.
- Taouji S, Collobert C, Gicquel B, Sailleau C, Brisseau N, Moussu C, Breuil MF, Pronost S, Borchers K, Zientara S. Detection and isolation of equine herpesviruses 1 and 4 from horses in Normandy: an autopsy study of tissue distribution in relation to vaccination status. **Journal of Veterinary Medicine, Series B**. 49: 394-399, 2002.
- Telford E.A.R., Watson M.S., McBride K., Davison A.J. The DNA sequence of equine herpesvirus-1. **Virology**. 189: 304-316, 1992.
- Telford E.A.R., Watson M.S., McBride K., Davison A.J. The DNA sequence of equine herpesvirus-4. **Journal of General Virology**. 79: 1197-1203. 1998
- 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**. 22: 4673-4680, 1994.
- Timoney P.I. Rhinopneumonitis and viral abortion. In Castro A.F., Heuschele W.P. **Veterinary Diagnostic Virology**. Mosby, St. Louis, 1992.
- Toshima M.J., Smith G.A, Enquist L.W. Sorting and transport of alpha herpesviruses in axon. **Traffic**. 2: 429-436, 2001.
- van Maanen C., Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan M.M., Damen E.A., Derksen A.G. Neurological disease associated with EHV-1-infection in a riding school: clinical and virological characteristics. **Equine Veterinary Journal**. 33: 191-196, 2001.

- Vargas A.C., Weiblen R. Prevalência de anticorpos contra herpesvírus eqüinos tipo 1 (HVE1) em eqüinos de alguns municípios do Estado do Rio Grande do Sul. **A Hora Veterinária**. 10: 5-8, 1991.
- Weiblen R. Infecções por herpesvírus eqüinos. *In* Riet-CorrêaF., Schild A.L., Méndez M.C. **Doenças de Ruminantes e Eqüinos**. Editora Universitária/UFPel, 1998.
- Weiblen R., Rabuske M., Rebelatto M.C., Nobre V.M.T., Canabarro T.F. Abortion due to equine herpesvirus in southern Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 27: 1317-1320, 1994.

Sítios de acesso na internet:

All the Virology on WWW

[http://www.virology.net/Big_Virology/Special/EHV-1/EHVpage.html] Acessado em 09/08/2005.

GenBank

[<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>] Acessado em 15/11/2005

Generunner

[<http://www.generunner.com>] Acessado em 15/04/2004

Fermentas

[<http://www.fermentas.com/techinfo/re/troubleshoot.htm>] Acessado em 18/09/2005

Office International des Epizooties

[http://www.oie.int/fr/normes/mmanual/ancien_manuel/a_00075.htm] Acessado em 09/08/2005.

**A NEW BRAZILIAN ISOLATE OF EQUINE HERPESVIRUS TYPE - 1
(EHV-1)**

Rodrigo Franco de Carvalho¹ & Clarice Weis Arns^{1*}

¹**Laboratório de Virologia Animal, Depto. de Microbiologia, Instituto de Biologia,**

Universidade de Estadual Campinas, Campinas, SP, CEP 13083 970. Telefone: (0X19) 3788-6258.

E-mail: arns@unicamp.br*

RESUMO - O herpesvírus eqüino 1 (HEV-1) está relacionado com o surgimento de abortos, complicações respiratórias e distúrbios neurológicos em cavalos. Esse vírus é transmitido pelo contato direto dos animais sãos com secreções e fluídos contaminados. Normalmente, o processo patogênico inicia-se com a infecção do trato respiratório e a posterior disseminação do vírus através do sistema circulatório. No Brasil, já houve o isolamento do HEV-1, mas ainda são poucos os trabalhos envolvendo-o como causa para abortos no plantel nacional. Assim, este estudo buscou verificar a presença do HEV-1, pelo seu isolamento, a partir de amostras de abortos. Foram utilizadas trinta e cinco (35) amostras de tecidos, derivadas de 20 abortos, provenientes do Instituto Biológico de São Paulo. Em laboratório, essas amostras foram processadas e inoculadas sobre monocamadas de células eqüinas ED (*Equine Dermis*), em busca do efeito citopático característico para o HEV-1. Nos casos negativos, os cultivos celulares previamente inoculados eram congelados, sendo então re-inoculados em novas monocamadas. Em um segundo ciclo de inoculação, uma amostra apresentou efeito citopático sugestivo. Um novo experimento com a amostra original reproduziu o mesmo resultado de forma independente. A confirmação do diagnóstico para o HEV-1 se deu através da PCR.

PALAVRAS-CHAVE: aborto eqüino, HEV-1, isolamento viral, Brasil.

ABSTRACT - Equine Herpesvirus Type 1 (EHV-1) is a member of *Alphaherpesvirinae* subfamily implicated with abortions, respiratory and neurological disturbs in horses. The principal mode of viral transmission is through close contact virus-containing secretions of infected horses. Systemic pathogenesis in which EHV-1 is implicated combines primary respiratory infection and spread of viral particles through the circulatory/lymphatic system. Until today, there are only few studies involving the isolation of this virus in Brazil. Thus, the main goal of this study was the isolation of EHV-1 using clinical samples of abortions. These samples were screened by inoculation in Equine Dermis (ED) cells monolayers, searching for the characteristic citopathic effect produced by the presence of EHV-1. Inoculation of one tissue sample has presented a suggestive citopathic effect. Re-inoculation of the original tissue homogenate in a second, independent experiment reproduced the same positive result. Following these observations, infection agent identity was done by *in vitro* host range analysis and PCR for thymidine kinase (*tk*) gene. The results demonstrated that the isolated was EHV-1.

INDEX TERMS: equine abortion, EHV-1, viral isolation, Brazil.

INTRODUCTION

The Equine Herpesvirus Type 1 (EHV-1) is a member of the *Alphaherpesvirinae* subfamily, *Varicellovirus* genus. As a pathogen, EHV-1 is involved with individual and collective abortions cases (abortion storm), respiratory and neurological disturbs in horses. The principal mode of viral transmission is through the close contact of infected, virus-containing secretions, with healthy animals. Systemic pathogenesis in which this virus is implicated combines primary respiratory infection and spread of viral particles through the circulatory/lymphatic system. EHV-1 is considered as a major cause of abortions at horse breeding farms in several countries (Crabb & Studdert, 1995).

The EHV-1 closest relative is Equine Herpesvirus Type 4 (EHV-4). Both are associated with equine rhinopneumonitis, the clinical manifestation that results from primary viral infections of the respiratory upper tract, especially in foals. EHV-4 has been sporadically detected in abortion cases too, but is not considered as the etiological agent of multiple abortion cases (Patel. & Heldens, 2005).

Until 1981, EHV-1 and EHV-4 were considered as two different subtypes of the same virus specie. However, recognition of significant genetic differences redefined these viruses as two distinctive species (Sabine et al. 1981; Studdert et al. 1981).

In the United States of America, the proportion of abortion cases caused by EHV-1 was estimated between 3,3% and 4,0% (Giles et al., 1991; Hong et al., 1993). Previous works in Brazil accused the presence of EHV-1 by conventional serological surveys (Modolo et al., 1989; Vargas e Weiblen, 1991; Cunha et al., 2002) and indicated a range of prevalence between 17,6% (State of São Paulo) and 84,7% (State of Rio Grande do Sul). EHV-1 has been also isolated at south and southeast of Brazil too (Nilsson e Corrêa, 1966; Weiblen et al., 1994). Molecular data from the State of Minas Gerais indicated an elevated level of prevalence for EHV-1 (88%) (Carvalho et al., 2000).

Clinical cases of abortion caused by EHV-1 occurred in Brazil since many years (Nilsson & Corrêa, 1966). However, there are very few Brazilian isolates of EHV-1 available for technical and analysis purposes. Regarding this perspective, the aim of this work was the screening and isolation of EHV-1 using collected tissue samples of abortions.

MATERIAL and METHODS

For viral isolation, third five (35) samples of different tissues of abortions (liver, lung, thymus and spleen) were used. These samples, derived from twenty (20) individuals, were screened by inoculation onto fresh (<24 hrs) Equine Dermis (ED) cells monolayers. The cells were cultured in multiwell plates with Eagle's Essential Media enriched with 10% of fetal bovine sera. Homogenate

aliquots of abortions tissue macerates were diluted (10% w/v) in maintenance media prepared with Eagle's Essential Media and standard concentrations of streptomycin, gentamicin and amphotericin B (10.000 U.I). Each sample was inoculated in duplicate with a negative, non-inoculated control. The standard EHV-1 Kentucky-D strain was used as positive control.

Visual inspections of all inoculated wells were made daily until seven days post inoculation, searching for the characteristic cytopathic effect (CPE) produced by EHV-1. In that negative cases, the plates were frozen (-70°C), thawed and the material was re-inoculated into new ED monolayers (blind passages). With the observation of CPE positive cases, the infectious agent identity was confirmed by PCR for thymidine kinase gene (Carvalho et al., 2000). PCR reactions were done in an EppendorfTM thermocycler. An aliquot (50 µl) of CPE positive samples was denatured for 96°C for 30 minutes) and used as DNA source for PCR. Each PCR was done with 05 µl of DNA template in a reaction made up to 25 µl with water as indicate by the author (Carvalho et al., 2000). Primers used for amplifications were EHV-1 forward - CGG GAC CGC AGC TGG AAA T and EHV-1 reverse - CTG GCG AGA ACG CTA CCC and EHV-4 forward – TTG GGC CGT CGC CGA AAA C and EHV-4 reverse – AGG CAA GGT TTT GGC TAG.

RESULTS

In a second blind passage, one sample (A3/97) presented suggestive CPE. Re-inoculation of the original tissue homogenate reproduced the same positive results (fig. 1). Inoculation of the positive material in fresh VERO cells culture also produced CPE (data not showed). PCR results confirmed A3/97 sample was EHV-1 positive, with the visualization of an expected 330 bp amplicon in agarose gel electrophoresis (fig.2).

DICUSSION and CONCLUSIONS

EHV-1 seems to be endemic among horse populations in most parts of the word (Crabb e Studdert, 1995). All available data indicates that EHV-1 is circulating in a significant part of south and southeast Brazilian horse population since many years (Nilsson e Corrêa, 1966; Modolo et al., 1989; Vargas e Weiblen, 1991; Carvalho et al., 2000; Cunha et al., 2002). The estimated prevalence values associated with the lower number of clinical cases possible indicates the importance of silent infections in the viral cycle (Cunha et al., 2002). In our study, the isolation of one EHV-1 sample between 20 clinical samples is compatible with American data and the conclusions of Cunha (Giles et al., 1991;

Hong et al., 1993; Cunha et al., 2002). The isolation of a new EHV-1 virus in Brazil enriches the small group of Brazilian EHV-1 isolates. This new isolate, named as EHV-1 BR01/UNICAMP/2004, possibly will contribute for further researches on genetic and antigenic diversity of this viral pathogen in Brazil.

REFERENCES

- CARVALHO, R.; OLIVEIRA, A.M.; SOUSA, A.M.; PASSOS, L.M.F., MARTINS, A.S. Prevalence of equine herpesvirus type 1 latency detect by polymerase chain reaction. *Archives of Virology*, v.145, p.1773-1787, 2000.
- CRABB, B.S.; STUDDERT M. J. Equine herpesviruses 4 (equine rhinopneumonitis virus) and 1 (equine abortion virus). *Advances in Virus Research*, v.45, p.153-190, 1995.
- CUNHA, E.M.S.; FERRARI, C.I.L.; LARA, M.C.C.S.H.; SILVA, L.H.Q. Presença de anticorpos contra o herpesvírus equino 1 (HVE-1) em eqüinos no noroeste do Estado de São Paulo. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.69, p.1-5, 2002.
- GILES, R.C.; DONAHUE, J.M.; HONG, C.B.; TUTTLE, P.A.; PETRITES-MURPHY, M.B.; POONACHA, K.B.; ROBERTS, A.W.; TRAMONTIN, R.R.; SMITH, B.J., SWERCZEK, T.W. Causes of abortion, stillbirth and perinatal death in horses (1986-1991). *Journal of American Veterinary Medical Association*, v.203, p.1170-1175, 1993..
- MODOLO, J.R.; PETZOLDT, K.; GOTTS-CHALK, A.F.; MARGATHO, L.F.F.; FORLIN, W.; CARREIRA, E.L.C. Investigação sorológica do herpesvírus equino-1 em eqüinos pelo teste de fixação do complemento, considerações sobre seu uso na saúde do haras. *Hora Veterinária*, v.8, p.25-27, 1989.
- NILSSON, M.R.; CORRÊA, W.M. Isolamento do vírus do aborto equino no estado de São Paulo. *Arquivo do Instituto Biológico de São Paulo*, v.33, p.23-25, 1966.
- PATEL, J.R. & HELDENS, J. Equine herpesviruses 1 (EHV-1) and 4 (EHV-4) – epidemiology, disease and imunoprophylaxis: a brief review. *The Veterinary Journal*, v.170, p.14-23, 2005.
- SABINE, M.; ROBERTSON, G.R.; WHALLEY, J.M. Differentiation of subtypes of equine herpesvirus 1 by restriction endonuclease analysis. *Australian Veterinary Journal*, v.57, p.148-149, 1981.
- STUDDERT, M.J.; SIMPSON, T.; ROIZMAN, B. Differentiation of respiratory and abortigenic isolates of equine herpesvirus 1 by restriction endonucleases. *Science*, v.214, p.562-564, 1981.
- VARGAS, A.P.C.; WEIBLEN, R. Prevalência de anticorpos contra o herpesvírus equino tipo 1 (EHV-1) de alguns municípios do Estado do Rio Grande do Sul. *Hora Veterinária*, v.10, p.5-8, 1991.

WEIBLEN, R.; RABUSKE, M.; REBELATTO, M.C.; NOBRE, V.M.T.; CANABARRO, T.F.
Abortion due to equine herpesvirus in southern Brazil. Brazilian Journal of Medical and Biological
Research, v.27, p.1317-1320, 1994.

**A NEW BRAZILIAN ISOLATE OF THE ABORTOGENIC EQUINE VIRUS
(EHV-1)**

Rodrigo Franco de Carvalho & Clarice Weis Arns

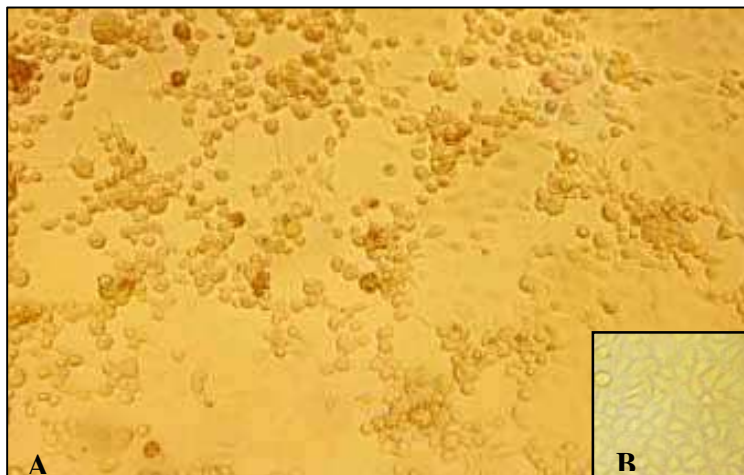


FIG 1A: Characteristic herpesvirus cytopathic effect derived from inoculation of a positive sample in ED cells monolayer (48 hours post inoculation). Cell culture presents focal rounding, increases in refractivity and detachment of cells. FIG 1B: Negative control.

**A NEW BRAZILIAN ISOLATE OF THE ABORTOGENIC EQUINE VIRUS
(EHV-1)**

Rodrigo Franco de Carvalho & Clarice Weis Arns

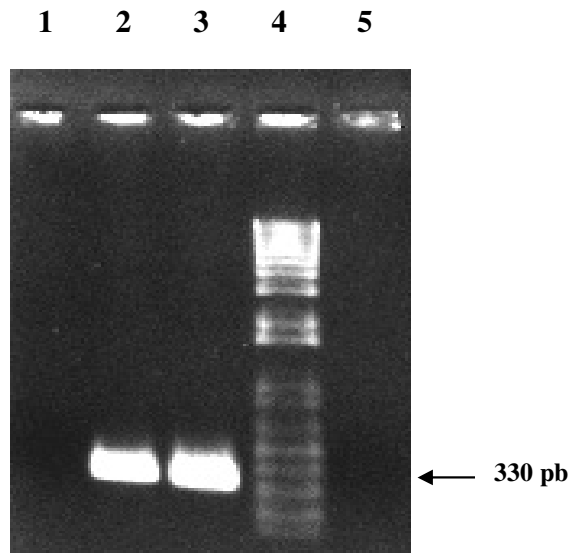


FIG 2: PCR results for thymidine kinase gene. Lane 1, negative control; Lane 2 positive control (Kentucky-D strain); Lane 3, isolate BR01/UNICAMP/2004; Lane 4, molecular marker (1kb plus ladderTM); Lane 5, BR1-2004 with EHV-4 specific primers (no amplification).

Acknowledgements. – The authors are grateful to Dra Elenice Sequetin Cunha (IB-São Paulo) for provided tissue samples and for Fernando R. Spilki (UNICAMP) for provided the Kentucky-D strain. We would like also to thanks Renata Servan de Almeida for digital pictures.

ANEXO II

**Resultado para alinhamento de seqüências para um fragmento da região 5' do gene tk do
isolado BR01/UNICAMP/2004.**

>gi|59229|emb|X13209.1|EHV1TK  Equine herpesvirus 1 (EHV1) thymidine kinase gene
(EC 2.7.1.21)

UL24 gene homologue and gH gene 5'-part

Length = 3146

Score = 479 bits (241), Expect = e-132

Identities = 241/241 (100%)

Strand = Plus / Plus

Query: 1 ccgctgccgcctttgtactaaaggctttggccttggttcctttggcgacgcaccgcctcc 60
|||||

Sbjct: 439 ccgctgccgcctttgtactaaaggctttggccttggttcctttggcgacgcaccgcctcc 498

Query: 61 ttgtcgatttagctgaaactggtggagcgtattccgccaacgtgatatggtgcaggata 120
|||||

Sbjct: 499 ttgtcgatttagctgaaactggtggagcgtattccgccaacgtgatatggtgcaggata 558

Query: 121 gcacggcagcgttgctatatacaacctgtggcgataaacgcggttaccgcgaacacccgca 180
|||||

Sbjct: 559 gcacggcagcgttgctatatacaacctgtggcgataaacgcggttaccgcgaacacccgca 618

Query: 181 ttctcgttgagctacaaacactagtagccggagctagtagcatctcaccgcttcccgggg 240
|||||

Sbjct: 619 ttctcgttgagctacaaacactagtagccggagctagtagcatctcaccgcttcccgggg 678

```
>gi | 49616984 | gb | AY665713.1 |
```

Length = 150224

Score = 479 bits (241), Expect = e-132

Identities = 241/241 (100%)

Strand = Plus / Plus

Query: 1 ccgctgccgcctttgtactaaaggctttggccttggttcctttggcgacgcaccgcctcc 60

Query: 61 ttgtcgatttagctgaaactggtggagcgtattccgccaaacgtgatatggtgcaggata 120

Query: 121 qcacggcagcgttgctatatacaacctgtggcgataaacgcgttaccgcgaacacccgc 180

[illegible]

Query: 181 ttccctcgttgagctacaaacactagtaccggagctagtacgatctcaccgcttcccgggg 240

[illegible]

```
>gi | 42795127 | gb | AY464052.1 |
```

Length = 149430

Score = 479 bits (241), Expect = e-132

Identities = 241/241 (100%)

Strand = Plus / Plus

Query: 1 ccgctgccgcctttgtactaaaggctttggccttggttcctttggcgacgcaccgcctcc 60
 |||
 Sbjct: 69185 ccgctgccgcctttgtactaaaggctttggccttggttcctttggcgacgcaccgcctcc 69244

Query: 61 ttgtcgatttagctgaaactggtggagcgtattccgcaaacgtgatatggtgcaggata 120
 |||
 Sbjct: 69245 ttgtcgatttagctgaaactggtggagcgtattccgcaaacgtgatatggtgcaggata 69304

Query: 121 gcacggcagcgttgctatatacaacctgtggcgataaacgcgttaccgcgaacaccgcga 180
 |||
 Sbjct: 69305 gcacggcagcgttgctatatacaacctgtggcgataaacgcgttaccgcgaacaccgcga 69364

Query: 181 ttcctcgttgagctacaaactagtaccggagctagtagatctcaccgcttcccgggg 240
 |||
 Sbjct: 69365 ttcctcgttgagctacaaactagtaccggagctagtagatctcaccgcttcccgggg 69424

☒ [>gi|2605950|gb|AF030027.1|AF030027](#) ☒ Equine herpesvirus 4 strain NS80567,
 complete genome
 Length = 145597

Score = 171 bits (86), Expect = 8e-40
 Identities = 134/150 (89%)
 Strand = Plus / Plus

Query: 89 gtattccgcaaacgtgatatggtgcaggatagcacggcagcgttgctatatacaacctg 148
 |||
 Sbjct: 69010 gtattccgctaggcgtgatatagtgcaagatagcacagctgcgttgctatacactacctg 69069

Query: 149 tggcgataaacgcgttaccgcgaacaccgcattcctcgttgagctacaaactagtag 208
 |||
 Sbjct: 69070 tggcgataaacgcgttaccctcaacaccgcattcctcgttgagctacaaactaacac 69129

Sbjct: 69130 cggtgctagtaaaatttcaccgcttcccgg 69159

Length = 5880

Strand = Plus / Plus

Sbjct: 377 gtattccgctaggcgtgatatagtgcaagatagcacagctgcgttgctatacactacctg 436

Sbjct: 437 tggcgataaacgcgttaccctcaacacccgcattcctcgttgagctacaaacactaacac 496

Sbjct: 497 cggtgctagtaaaaatttcaccgcttcccgg 526

Sequência para o gene da timidina quinase do EHV-1 (Genbank)

GENE EHV1TK 3146 bp DNA linear VRL 18-APR-2005
 DEFINITION Equine herpesvirus 1 (EHV1) thymidine kinase gene (EC 2.7.1.21)
 UL24 gene homologue and gH gene 5'-part.
 ACCESSION X13209 S93400
 VERSION X13209.1 GI:59229
 KEYWORDS gH gene; glycoprotein; thymidine kinase; UL24 gene.
 SOURCE Equid herpesvirus 1 (Equine herpesvirus 1)
 ORGANISM Equid herpesvirus 1
 Viruses; dsDNA viruses, no RNA stage; Herpesviridae;
 Alphaherpesvirinae; Varicellovirus.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 3146)
 AUTHORS Robertson,G.R. and Whalley,J.M.
 TITLE Evolution of the herpes thymidine kinase: identification and
 comparison of the equine herpesvirus 1 thymidine kinase gene
 reveals similarity to a cell-encoded thymidylate kinase
 JOURNAL Nucleic Acids Res. 16 (23), 11303-11317 (1988)
 PUBMED 2849761
 REFERENCE 2
 AUTHORS Robertson,G.R., Scott,N.A., Miller,J.M., Sabine,M., Zheng,M.,
 Bell,C.W. and Whalley,J.M.
 TITLE Sequence characteristics of a gene in equine herpesvirus 1
 homologous to glycoprotein H of herpes simplex virus
 JOURNAL DNA Seq. 1 (4), 241-249 (1991)
 PUBMED 1666854
 REFERENCE 3 (bases 1 to 3146)
 AUTHORS Whalley,J.M.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (11-OCT-1988) Whalley J.M., School of Biological
 Sciences, Macquarie University, Sydney, Australia 2109
 COMMENT On Sep 20, 2004 this sequence version replaced gi:248311.
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..3146
 /organism="Equid herpesvirus 1"
 /mol_type="genomic DNA"
 /isolate="HVS25A"
 /db_xref="taxon:10326"
 /map="0.46-0.48%"

CDS complement (<1..162)
 /note="unnamed protein product; VZV gene homologue (AA 1-54) "
 /codon_start=1
 /protein_id="CAA31597.1"
 /db_xref="GI:59230"
 /db_xref="InterPro:IPR002493"
 /db_xref="UniProt/Swiss-Prot:P15237"
 /translation="MAEYVNYVLGSLYVSDTATSTIPTDVRNFIAPPFPLNFWSGPTFTVSSNTEGGS"

misc_feature complement (264..270)
 /note="polyA signal"

CDS complement (266..1084)
 /note="unnamed protein product; UL24 gene homologue (AA 1 - 272) "
 /codon_start=1
 /protein_id="CAA31598.1"
 /db_xref="GI:59231"
 /db_xref="InterPro:IPR002580"
 /db_xref="UniProt/Swiss-Prot:P09314"
 /translation="MKRRQRLTARSRLRAGIRCHNRFYNAMVQDLASAKRNGVYGERL APLFSELVPAETLKTALGVSLAFEVNLGQRRPDCVCTVQFGKGSDAKGVCILIELKTC RFSKHM NTASKNLQRKGGMRPVHDSRLLARTLPPGSGEIVLAPVLVFVAQRGMRVLR VTRLSPQVVYSNAAVLSTISRLAEYAPPVSAKSTRRRRCVAKGTKAKAFSTKAAAEPV PSITPAQPSAAAAVVSLEFPAAVPANTTNAAAVHQPVAVSHVNPLAWAASLFSKP"

CDS 1097..2155
 /note="unnamed protein product; thymidine kinase (AA 1 - 352) "
 /codon_start=1
 /protein_id="CAA31599.1"
 /db_xref="GI:59232"
 /db_xref="GOA:P69186"
 /db_xref="InterPro:IPR001889"
 /db_xref="UniProt/Swiss-Prot:P69186"
 /translation="MAARVPSGEARRSASGAPVRRQVTIVRIYLDGVYGIGKSTTGRV MASAASGGSPPLYFPEPMAYWRTLFEADVISGIYDTQNRKQQGDLAADDAASITAHYQ SRFTTPYLILHDHTFGLFGGDSLQGRTRPDLTVVFD RHPVASAVCFPAARYLIGDMSM CALIAMVATLPREPQGGNIVVTTLNVDEHVRRLRTRARIGE QIDMKLIATLRNVYSML ANT SNFLRSGRVWRD GWGELPLSCETYKHRATQMDAFQERESPELSDTLFAMFKTPEL LDDRGVILEVHAWALDALMLKLRNLSVFCADLSGTPRQCAATVESLIPLMSSTLSDSE SASSLERAAARTFNAEMGV"

misc_feature 2197..2202
 /note="polyA signal"
CDS 2379..>3146
 /note="unnamed protein product; gH preprotein (AA -23 to 233) "
 /codon_start=1
 /protein_id="CAA31600.1"
 /db_xref="GI:59233"
 /db_xref="GOA:P68330"
 /db_xref="UniProt/Swiss-Prot:P68330"
 /translation="MLQPYRKMLIFAVVTVAFAFAMAVWSTPVPATPSGVGNATWANNSE
 NITRYDKITMGQVYSNTSNSPIFFVVISERNFRIVNTPLGASVFWIPKGAMNPPQHQP
 CVANGPEPGDPRGPCVNSTVSLLFNENVEPFLMSKNLLEFEVLPDITYITGWTTERS
 ATTKSNPVGVLSPPRGSPSANTTIRDDGGPKPLSIIDEYTTLVADLQNFTMTLT
 SPFAAVWPIEAFQTGITVMGCDTTQVVAYLGHGFMGLQ"
CDS 2400..>3146
 /note="unnamed protein product; gH protein (AA 1 - 233) "
 /codon_start=1
 /protein_id="CAA31601.1"
 /db_xref="GI:1429375"
 /db_xref="GOA:P68330"
 /db_xref="UniProt/Swiss-Prot:P68330"
 /translation="MLIFAVVTVAFAFAMAVWSTPVPATPSGVGNATWANNSE
 NITRYDKITMGQVYSNTSNSPIFFVVISERNFRIVNTPLGASVFWIPKGAMNPPQHQP
 CVANGPEPGDPRGPCVNSTVSLLFNENVEPFLMSKNLLEFEVLPDITYITGWTTERS
 ATTKSNPVGVLSPPRGSPSANTTIRDDGGPKPLSIIDEYTTLVADLQNFTMTLT
 YISPF
 AVWPIEAFQTGITVMGCDTTQVVAYLGHGFMGLQ"
sig_peptide 2400..2447
 /note="signal peptide (AA -16 to -1) "

ORIGIN

```

1  ggatccgccc  tcggtgttgg  agctgacggt  gaatgtaggt  ccgctccaaa  agttaagcgg
61  aaatggcggg  gctataaagt  ttcgcacgtc  tgtcgggtata  gtggacgtgg  ccgtatcgct
121  tacgtaaagc  gatcctaaca  cataattcac  atactccgcc  atctccaccg  cgactataag
181  gtcttttagct  tcgatcttag  tgtttatact  tgcgtgtagg  cgcgccgaca  aaaaaagggg
241  cactcgtctt  taattgcacc  ggcttttatt  ttggggaaaa  aaggggacgcc  gcccaggcga
301  ggggggtttac  gtgcgataca  gccaccggct  gatggaccgc  ggctgcgtta  gtgggtgtttg
361  ccgggaccgc  agctggaaat  aaactcacga  cggcggctgc  cgctgacggc  tgggctggcg
421  ttatagatgg  cactggctcc  gctgccgcct  ttgtactaaa  ggctttggcc  ttgggttcctt
481  tggcgacgca  ccgcctcctt  gtcgatttag  ctgaaactgg  tggagcgtat  tccgccaaac
541  gtgatatggg  gcaggatagc  acggcagcgt  tgctatatac  aacctgtggc  gataaacgcg
601  ttaccgcgaa  caccgcatt  cctcgttag  ctacaaacac  tagtaccgga  gctagtacga
661  tctcaccgct  tcccgggggt  agcgttctcg  ccagcaacct  gcacgagtca  tgtactggtc
721  gcatgcccc  cttccgctgt  agatttttac  tcgcgggtgt  catatttttg  gaaaagcgac
781  acgttttttag  ctctattagg  atgcacactc  ccttggcgct  agaacccttt  ccaaattgca
841  cggtagacag  acaatccggg  cgccgctgtc  cgaggttaac  ctcaaaggcc  agagacacgc
901  ccagtgccgt  ttttaagagt  tccgctggca  ccagttcact  aaaaagggga  gcaagcctct
961  ctccgtacac  gccgtttcgc  ttggcgcttg  ccaggctctg  aaccatcgcg  ttatagaagc
1021  ggttgtggca  ccgtatacca  gctctgagtc  tgcttctagc  tgtcagacgc  tgtctacgtt
1081  tcattttcag  aaatcaatgg  cggctcgctg  accttccggg  gaagctcgac  ggagcgccag
1141  cggggcgccg  gtcaggcggc  aagtaacaat  agttagaatt  tacctcgatg  gggcttacgg
1201  catcggcaag  agcacgactg  gacgagttat  ggcacggtct  gcgagtggag  gaagtccaac
1261  tctatacttt  cctgagccta  tggcgtagct  gcggactctc  tttgaagcgg  acgtaattag
1321  tggatatttac  gacaccaga  accggaaaca  gcaggagat  ttggcggtcg  atgacgcggc
1381  gtcaataacg  gcgcactacc  agagccgctt  taccacgccc  taccttatcc  tacacgatca
1441  cacatttggt  ttgtttgggg  gcgacagcct  acagcggtgg  acaagaccag  acctaaccgt
1501  cgtttttgac  cgccaccag  tcgcctctgc  cgtgtgcttt  cccgcgcgtc  gctacctcat
1561  cggagacatg  tccatgtgcg  cgctgattgc  catggttgcc  acctaccca  gggaaccgca
1621  aggcggaac  atcgtgggta  ccaccctcaa  tgtggacgag  cacgtgcgaa  gactgcgcac
1681  ccgcgccaga  atcggggaac  agattgacat  gaagctaata  gccacactgc  gaaacgtgta
1741  ctctatgctc  gctaatacta  gcaacttttt  gcgctccggg  agagtatggc  gcgacggctg
1801  gggggagttg  cccctttcgt  gcgagaccta  taaacatcgc  gcaacgcaga  tggacgcctt
1861  ccaggagcgc  gaatctcctg  agctgagcga  cacgttgttt  gccatgttta  agactccga
1921  gctgctagac  gatcgtggag  tgatattgga  agttcacgcc  tgggcgcttg  acgcgctgat
1981  gctaaagctg  cgcaacctga  gtgttttttg  cgctgatctg  agcgggactc  cgcgccagtg
2041  tgctgcaacc  gtggagtctc  taatacccct  catgagcagc  acctctccg  attcggagtc
2101  ggctcctccc  ctggagcggg  ccgcgcgcac  cttcaacgcc  gagatgggcg  tctgaaacta
2161  tatgtaatgt  ttgttgtgcc  agtgtaataa  ttatgaaata  aagattcctt  tgcctatata
2221  cctcataccg  cctcgtgtgt  ccagtgtgta  aacttccagg  ttctagtttt  ggggatata
2281  aagtggctgt  gacctggatt  catttagtac  agtgcggccg  agccactcaa  gatataccgt
2341  ggctgtacat  taacttggga  atcattactt  ccgcgatcat  gttacaaccg  tatcgaaaaa

```

2401 tgctgatctt tgcagttggt actggtgcct ttgcgatggc tgtctggtca acgcccgtcc
 2461 cagccactcc gtctggcgtg ggtaacgcta cttgggcaaa caatagcttc aacataacca
 2521 ggtatgacaa gataaccatg ggacaggttt atagtaacac ttcaaactct cccatcttct
 2581 tcgttggttat atcggagcgg aattttcgca tcgttaacac tccgctgggc gcgtcggtat
 2641 tttggatacc aaagggcgct atgaatcctc cgcaacacca accctgtgtc gccaacgggc
 2701 cggaacctgg ggaccacgc gggccgtgtg tcaactcgac cgtcagttta ttgtttaatg
 2761 aaaacgtgga gccgttctta atgtcaaaaa atcttttaga gtttgaagtg ttgcccgaca
 2821 cctacataac cggttgacg tttgagcgt ctaaacagc gaccacaaaa agcaaccgg
 2881 ttggtgtggt tttatcgcca ccaggggca gtccgtcagc taacacaaca atcagggacg
 2941 atggcggacc caaaaagccc ctgagcatta tagacgaata caccacgctc gtggcggact
 3001 tgcaaaattt cactatgaca ttgacttaca taagcccctt tgccgcggtg tggcctattg
 3061 aagcctttca aacgggcac acggtcatgg ggtgcgacac tacacaggtt gttgcgtatc
 3121 tcggccatgg gtttatgggc ctgcag