

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

THAÍS MOREIRA TOTTI

**DESENVOLVIMENTO DE LONG-RANGE PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DE
GENOMAS COMPLETOS DE HERPESVÍRUS BOVINOS TIPOS 1 E 5**

PORTO ALEGRE

2021/1

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

**DESENVOLVIMENTO DE LONG-RANGE PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DE
GENOMAS COMPLETOS DE HERPESVÍRUS BOVINOS TIPOS 1 E 5**

**Autora: Thaís Moreira Totti
Trabalho apresentado à Faculdade de Veterinária
como requisito parcial para a obtenção da graduação
em Medicina Veterinária
Orientador: Prof. Paulo Michel Roehle
Coorientador: Dr. Fernando Finoketti**

PORTO ALEGRE

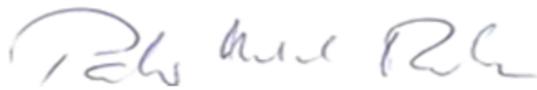
2021/1

Thaís Moreira Totti

DESENVOLVIMENTO DE LONG-RANGE PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DE GENOMAS
COMPLETOS DE HERPESVÍRUS BOVINOS TIPO 1 E 5

Aprovado em 25 NOV 2021

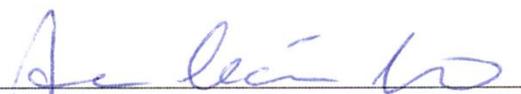
APROVADO POR:



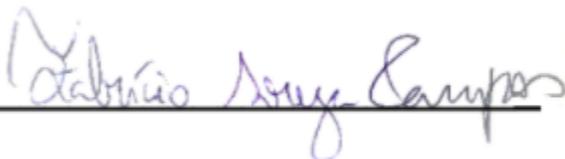
Prof. Dr. Paulo Michel Roehe
Orientador e Presidente da Comissão



Dr. Fernando Finoketti
Coorientador e Membro da Comissão



Profª Dra. Ana Cláudia Franco
Membro da Comissão



Prof. Dr. Fabrício Souza Campos
Membro da Comissão

DEDICATÓRIA

Ao meu pai Luciano (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família que me forneceu todo o suporte para que eu pudesse chegar até aqui, e que, além disso, nunca deixaram de me apoiar, mesmo nos momentos mais difíceis. Em especial aos meus avós, José e Solange e ao meu irmão Tiago.

Ao Fernando, que além de ser meu parceiro de trabalho, divide comigo a tarefa mais difícil das nossas vidas que é criar e orientar nossa filha juntos. Obrigada pela dedicação, parceria, ajuda diária, compreensão e paciência.

Aos meus sogros, que desde que me conheceram, me apoiaram em todos os momentos que precisei. Em especial muito obrigada à minha sogra, Ilineta, e a minha mãe, Rose, que em tantos momentos ficaram com minha filha para que eu pudesse concluir meus trabalhos da faculdade. À equipe do Laboratório de Virologia do ICBS UFRGS, onde tive a oportunidade de aprender diariamente desde 2017. Em especial aos Professores Paulo Michel Roehle e Ana Cláudia Franco que me acompanharam durante a maior parte da minha graduação e me apresentaram ao mundo da pesquisa.

Às amigas que fiz durante a faculdade e àquelas que preservo desde a infância. Obrigada pelo apoio de sempre, seja em momentos felizes ou naqueles mais difíceis.

À minha filha Cecília, por me ensinar sobre amor, paciência, compreensão e resiliência.

DESENVOLVIMENTO DE LONG-RANGE PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DE GENOMAS COMPLETOS DE HERPESVÍRUS BOVINOS TIPOS 1 E 5

RESUMO

Os herpesvírus bovinos tipos 1 (BoHV-1) e 5 (BoHV-5) são importantes agentes infecciosos que afetam os bovinos, causando infecções respiratórias, reprodutivas e neurológicas. A disponibilidade de sequências genômicas desses vírus é de particular importância para um melhor entendimento de suas relações com a espécie hospedeira, do perfil das variantes que circulam nos rebanhos brasileiros e sua relevância na epidemiologia dessas infecções. Até o momento, entretanto, nenhum genoma completo do BoHV-1 brasileiro está disponível, enquanto apenas três genomas completos do BoHV-5 (todos brasileiros) foram sequenciados. Isso se deve essencialmente ao fato de que esses herpesvírus têm genomas relativamente longos, com cerca de 130-140 pares de quilobases. O sequenciamento desses genomas longos geralmente envolve a extração de DNA de grandes volumes de suspensões virais, o que é demorado, trabalhoso e caro. O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma estratégia de sequenciamento de genomas de herpesvírus baseada na amplificação de segmentos de 5 a 10 kb ao longo do genoma viral. Tal conjunto de reações de PCR de longo alcance (“*long-range*” PCR; LR-PCR), pode fornecer DNA viral suficiente para permitir o sequenciamento integral de BoHV-1 e BoHV-5 sem a necessidade de grandes volumes de suspensões virais. O DNA foi extraído de 200 µl de um estoque de trabalho de BoHV-1 (amostra SV609/03) e BoHV-5 (amostra EVI88/95) multiplicados em linhagem celular de rim bovino (CRIB). As amplificações foram realizadas em reações separadas com cada par de *primers*, utilizando uma enzima de alta especificidade e processividade. Os produtos obtidos foram submetidos a sequenciamento de alto desempenho na plataforma Illumina Miseq. Foram obtidas 4.011.984 (BoHV-1) e 3.877.550 (BoHV-5) *reads*, respectivamente. As montagens do genoma foram feitas usando o software Geneious, a partir das sequências de referência MG407776 (BoHV-1) e KY549446 (BoHV-5). O genoma do SV609/03 (BoHV-1) contém 135.099 pb com 72% de GC, apresentando 69 ORFs. O genoma EVI88/95 (BoHV-5) contém 137.654 pb com 74,7% de GC, com 73 ORFs. Na análise de restrição *in silico* para subtipagem, a amostra de SV609/03 apresentou o mesmo padrão do subtipo 1 (BoHV-1.1) e na amostra de EVI88/95 foi identificado um novo padrão de clivagem, não correspondendo a nenhum subtipo de BoHV-5 proposto até o momento. A subtipagem foi confirmada por análise filogenética.

LONG-RANGE PCR DEVELOPMENT FOR COMPLETE GENOME AMPLIFICATION OF BOVINE HERPESVIRUS TYPES 1 AND 5

ABSTRACT

Bovine Herpesvirus types 1 (BoHV-1) and 5 (BoHV-5) are important infectious agents that affect cattle, causing respiratory, reproductive and neurological infections. The availability of genomic sequences of these viruses is of particular importance for a better understanding of their relationships with the host species, the profile of variants circulating in Brazilian herds and its relevance in the epidemiology of such infections. To date, however, no complete genome of Brazilian BoHV-1 is available, whereas only three complete BoHV-5 genomes (all autochthonous to Brazil) have been sequenced. This is essentially due to the fact that these herpesviruses have relatively long genomes, with 130-140 kilobase pairs. Sequencing of such long genomes usually involves extraction of DNA from very large volumes of viral suspensions, which is time consuming, labor intensive and costly. The objective of this work was to develop a strategy for sequencing of herpesvirus genomes based on the amplification of 5 to 10 kb segments along the viral genome. Such set of long-range PCR reactions (LR-PCR), would provide enough viral DNA to allow integral sequencing of BoHV-1 and BoHV-5 without the need for large volumes of viral suspensions. DNA was extracted from 200 µl of a working stock of BoHV-1 (strain SV609/03) and BoHV-5 (strain EVI88/95) multiplied in a bovine kidney cell lineage (CRIB). Amplifications were performed in separate reactions with each pair of primers, using an enzyme of high specificity and processivity. The products obtained were submitted to high performance sequencing using the Illumina Miseq platform. 4,011,984 (BoHV-1) and 3,877,550 (BoHV-5) reads were obtained. Genome assemblies were made using Geneious Software, from the reference sequences MG407776 (BoHV-1) and KY549446 (BoHV-5). The SV609/03 (BoHV-1) genome contains 135,099 bp with 72% of GC, presenting 69 ORFs. The EVI88/95 (BoHV-5) genome contains 137,654 bp with 74.7% of GC, with 73 ORFs. In the *in silico* restriction analysis for subtyping, the SV609/03 sample showed the same pattern as subtype 1 (BoHV-1.1) and in the EVI88/95 sample, a new cleavage pattern was identified, not corresponding to any BoHV-5 subtype proposed so far. Subtyping was confirmed by phylogenetic analysis.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

FIGURA 1	Estrutura do vírion, família <i>Herpesviridae</i>	17
FIGURA 2	Organização genômica do Grupo D, família <i>Herpesviridae</i>	18
FIGURA 3	Bovino apresentando descarga nasal mucopurulenta após infecção experimental por Herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5).....	20
FIGURA 4	Edema e hiperemia de vulva, com presença de pústulas recobertas por exsudato fibrinoso.....	21
FIGURA 5	Exantema coital em bovino com BoHV-1.....	21
FIGURA 6	Bezerro com Herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5).....	23
FIGURA 7	Efeito citopático e testes de imunocoloração em cultivo celular infectado com Herpesvírus Bovino.....	26

RESULTADOS E DISCUSSÃO

FIGURA 8	Posição dos <i>primers</i> e <i>amplicons</i> para BoHV-1.....	35
FIGURA 9	Posição dos <i>primers</i> e <i>amplicons</i> para BoHV-5.....	35
FIGURA 10	Testes 4, 5 e 6 de parâmetros de reação com enzima PrimeSTAR GXL (Takara Bio), alterando a quantidade de enzima polimerase e adicionando 7 e 10% de DMSO.....	38
FIGURA 11	Teste 10 de parâmetros de reação, utilizando protocolo rápido com adição de 10 % de DMSO e diminuição da temperatura de anelamento.....	41
FIGURA 12	Teste 11 de parâmetros de reação, utilizando protocolo de reação em duas etapas.....	42

FIGURA 13	Teste 13 de parâmetros de reação, utilizando protocolo de reação em duas etapas para ampliações de fragmentos de 5 mil pares de bases.....	44
FIGURA 14	Teste 14 de parâmetros de reação para ampliações de fragmentos de 5 mil pares de bases com adição da etapa de anelamento.....	45
FIGURA 15	Teste 15 de parâmetros de reação para ampliações de fragmentos de 5 mil pares com diferentes temperaturas de anelamento (T1, T2 e T3).....	46
FIGURA 16	Teste 16 de parâmetros de reação para ampliações de fragmentos de 10 mil pares de bases utilizando <i>primers</i> mesclados.....	47
FIGURA 17	Resultado final dos <i>amplicons</i> dos painéis de BoHV-1 e BoHV-5..	48
FIGURA 18	Classificação inicial das <i>reads</i>	49
FIGURA 19	Classificação das <i>reads</i> pelo <i>software</i> Genome Detective.....	50
FIGURA 20	Análise de restrição enzimática <i>in silico</i> com <i>HindIII</i> para classificação de subtipos de BoHV-1.....	53
FIGURA 21	Árvore filogenética de BoHV-1 e BoHV-5.....	54
FIGURA 22	Análise de restrição enzimática <i>in silico</i> com <i>BstEII</i> para classificação de subtipos de BoHV-5.....	58

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

TABELA 1	Classificação taxonômica dos Herpesvírus bovinos.....	16
----------	---	----

RESULTADOS E DISCUSSÃO

TABELA 2	Painel de <i>primers</i> para BoHV-1.....	33
TABELA 3	Painel de <i>primers</i> para BoHV-5.....	34
TABELA 4	Resultado do sequenciamento das amostras EVI88/95 e SV609/03.	48
TABELA 5	Resultado da montagem das amostras EVI88/05 e SV609/03.....	50
TABELA 6	Anotações dos genes da amostra SV609/03 (BoHV-1).....	51
TABELA 7	Anotações dos genes da amostra EVI88/95 (BoHV-5).....	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

‰: percentagem

°C: graus Celsius

%GC: percentagem de guanina e citosina

%AT: percentagem de adenina e timina

%Q20: acurácia de bases de 99% (*phred quality score*)

%Q30: acurácia de bases de 99,9% (*phred quality score*)

µl: microlitros

BoHV-1: Herpesvírus bovino tipo 1

BoHV-2: Herpesvírus bovino tipo 2

BoHV-3: Herpesvírus bovino tipo 3

BoHV-4: Herpesvírus bovino tipo 4

BoHV-5: Herpesvírus bovino tipo 5

bPI-3V: vírus da parainfluenza 3

BRSV: vírus respiratório sincicial

BVDV: vírus da diarreia viral bovina

C: citosina

CRIB: células resistentes à infecção por BVDV (*Cells Resistant to Infection with BVDV*)

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucleico

ECP: efeito citopático

G: guanina

gC: glicoproteína C

GC: guanina e citosina

gE: glicoproteína E

GenBank: Banco de dados do NCBI (*“National Center for Biotechnology Information”*)

IBR: Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (*infectious bovine rhinotracheitis*)

ICTV: Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (*International Committee on Taxonomy of Viruses*)

IF: imunofluorescência

IPB: Balanopostite Pustular Infecciosa (*infectious pustular balanoposthitis*)

IPV: Vulvovaginite Pustular Infecciosa (*infectious pustular vulvovaginitis*)

IPVDF: Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor

IPX: imunoperoxidase

IR: região repetida interna (*internal repeats*)

kpb: kilo pares de bases

LR-PCR: reação em cadeia da polimerase de longo alcance (*Long-range polymerase chain reaction*)

MAB: reatividade a anticorpos monoclonais

MDBK: células de linhagem de rim bovino (*Madin Darby Bovine Kidney*)

Mg²⁺: íon magnésio

MgCl₂: cloreto de magnésio

min: minuto(s)

mM: Milimolar

N. caninum: *Neospora caninum*

ng: nanogramas

nm: nanômetros

nt: nucleotídeos

ORF: fase de leitura aberta (*open reading frame*)

OsHV-1: Ostreid herpesvirus 1

pb: pares de bases

PCR: reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*)

PF: iniciador 5' (*primer forward*)

PR: iniciador 3' (*primer reverse*)

REA: análises de endonucleases de restrição

UFSC: Universidade Federal de Santa Maria

UL: *unique long*

US: *unique short*

TR: região repetida terminal (*terminal repeats*)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 HERPESVÍRUS BOVINOS	15
2.1.1 Histórico e classificação	15
2.1.2 Genoma e replicação	16
2.1.3 Herpesvírus bovino tipo 1	18
2.1.3.1 Taxonomia	18
2.1.3.2 Patogenia	19
2.1.4 Herpesvírus bovino tipo 5	22
2.1.4.1 Taxonomia	22
2.1.4.2 Patogenia	22
2.1.4.3 Necropsia e histopatologia	24
2.1.5 Epidemiologia	24
2.1.6 Diagnóstico	25
2.1.7 Prevenção e controle	27
2.2 ENRIQUECIMENTO E SEQUENCIAMENTO DE DNA VIRAL	28
3. OBJETIVOS	30
3.1 OBJETIVO GERAL	30
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
4. MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1 AMOSTRAS	30
4.2 EXTRAÇÃO DO DNA VIRAL	30
4.3 ENRIQUECIMENTO ATRAVÉS DE PCR	31
4.4 SEQUENCIAMENTO DE ALTO DESEMPENHO	31
4.5 ANÁLISES DOS GENOMAS	31
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1 PAINÉIS DE <i>PRIMERS</i>	32
5.2 AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS GENÔMICOS	35
5.3 SEQUENCIAMENTO DE ALTO DESEMPENHO	48
5.4 MONTAGEM DO GENOMA	50
5.4.1 SV609/03	51
5.4.2 EVI88/95	54

6. CONCLUSÃO.....	58
REFERÊNCIAS.....	59
APÊNDICE A	64

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o país com maior rebanho comercial de bovinos no mundo, com 213.523.056 cabeças (IBGE, 2018). Doenças infecciosas que comprometem o rebanho impactam diretamente na economia. Dentre as principais causas de afecções de gado leiteiro e de corte, estão os herpesvírus de bovinos, amplamente distribuídos nas regiões geográficas brasileiras (ALFIERI; ALFIERI, 2017; RISSI *et al.*, 2007). O herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e o herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) são os representantes da família *Herpesviridae* de maior interesse veterinário para pecuária bovina, uma vez que são associados a perdas reprodutivas e acometimento neurológico, causando na maioria das vezes infecções endêmicas no rebanho (FRANCO; ROEHE; VARELA, 2012).

O herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) é o agente etiológico da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR), Vulvovaginite Pustular Infecciosa (IPV) e Balanopostite Pustular Infecciosa (IPB), resultando em sinais clínicos respiratórios e reprodutivos, embora já tenha sido associado a casos de encefalite (BATISTA *et al.*, 2010; DEL FAVA; PITUCO; D'ANGELINO, 2002). Com base nos quadros clínicos e análises de restrição enzimática, o BoHV-1 foi dividido em três subtipos, 1.1, 1.2a e 1.2b. Enquanto o subtipo 1.1 é mais frequentemente isolado de animais com sintomatologia respiratória e transtornos reprodutivos, os subtipos 1.2a e 1.2b são mais frequentemente isolados de vulvovaginites e balanopostites, sendo que o subtipo 1.2b não foi até o momento relacionado a casos de abortamento (METZLER; SCHUDEL; ENGELS, 1986; DEL FAVA; PITUCO; D'ANGELINO, 2002; BATISTA *et al.*, 2010; FINO *et al.* 2012).

O herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) é o agente etiológico da meningoencefalite herpética bovina. Sua classificação como uma espécie diferente do BoHV-1 ocorreu em 1992; até então, o BoHV-5 era considerado um subtipo de BoHV-1, denominado BoHV-1.3 (DEL MÉDICO ZAJAC *et al.*, 2010). É dividido em três subtipos denominados “a”, “b” e “c”, com base no padrão de clivagem com a enzima *BstEII* (D'ARCE *et al.*, 2002). No entanto, não há, ainda, uma correlação definida entre subtipos e diferentes apresentações clínicas.

Eventualmente, o BoHV-1 pode causar encefalites (SILVA *et al.*, 2007; BATISTA *et al.*, 2010), assim como o BoHV-5 tem sido relacionado a abortos (MARIN *et al.*, 2013; TOTTI *et al.*, 2020). Contudo, pela dificuldade de identificação tipo e subtipo-específicas, faltam dados que permitam um melhor entendimento de diferentes subtipos na patogenia e evolução clínica.

No Brasil, os dados epidemiológicos sobre herpesviroses variam conforme a região. Inquéritos sorológicos investigando a prevalência de IBR apontam que a prevalência da doença

pode chegar a 87%, estando entre as enfermidades reprodutivas infecciosas de maior prevalência, junto com a diarreia viral bovina (BVD), a neosporose e a leptospirose (MENDES *et al*, 2009). A grande similaridade genômica e antigênica com BoHV-1, faz com que seja impossível, atualmente, discriminar dados epidemiológicos específicos para BoHV-5, pois estes se confundem com os levantamentos realizados sobre ocorrência de infecções pelo BoHV-1 (FRANCO; ROEHE; VARELA, 2012). Entretanto, chama atenção o fato de que, diferentemente do BoHV-1, que tem distribuição mundial, a distribuição geográfica de casos BoHV-5 parece estar concentrada no hemisfério sul, com surtos esporádicos de meningoencefalite herpética, principalmente no Brasil e Argentina (DEL MÉDICO ZAJAC *et al*, 2010; WRONSKI *et al*, 2018). Outro fato de interesse sobre a peculiar distribuição do BoHV-5 é o fato de que as infecções comprovadamente associadas a esse tipo de vírus ocorrem em regiões onde há alguma história de contato (atual ou prévio) com criações de bubalinos (ROEHE, P. M., dados não publicados).

A disponibilidade de sequências genômicas desses vírus é de particular importância para um maior conhecimento da biologia dos herpesvírus e suas relações com a espécie hospedeira, assim como para promover um melhor entendimento das variantes em circulação em nosso país e a participação de diferentes tipos e subtipos de vírus na patogenia dos diferentes quadros associados a estes vírus (DELHON *et al*, 2003; PAIM, 2017)

Como os herpesvírus tem genomas relativamente longos para vírus (cerca de 140 mil pb), a maioria dos estudos genéticos sobre estes vírus tem sido conduzidos focando determinados genes ou regiões genômicas. Como consequência, até o presente momento, há somente três sequências de genomas completos de BoHV-5 e cinquenta sequências de genomas completos de BoHV-1 depositadas no GenBank. Todas as sequências de BoHV-5 depositadas correspondem a amostras brasileiras, enquanto nenhuma sequência de BoHV-1 corresponde a vírus de origem brasileira.

Com as facilidades atualmente disponíveis para sequenciamento de genomas virais relativamente longos, tornou-se possível o uso de estratégias que simplificam a obtenção de genoma completo de herpesvírus. O sequenciamento destes classicamente envolve a multiplicação de vírus em cultivos celulares em grandes volumes, sendo depois o DNA extraído para posterior processamento. Entretanto, essa metodologia é demorada, de alto custo e está sujeita a contaminações com outros agentes. Uma alternativa é o enriquecimento das amostras através de técnicas de amplificação do genoma *in vitro*, que pode ser feito através de reação em cadeia da polimerase (PCR) e suas variações.

A *long-range* PCR (LR-PCR) ou “PCR de longo alcance” tem sido utilizada, combinada com sequenciamento de alto desempenho, para amplificação e sequenciamento de genomas de herpesvírus, permitindo que longos fragmentos sejam amplificados com alta sensibilidade e especificidade cobrindo toda a extensão do genoma viral (BAI *et al.*, 2019). Essa metodologia independe da produção de grandes volumes de suspensões virais em cultivo e extrações de DNA em grande quantidade, não necessita de purificações exaustivas de partículas virais, minimizando os custos e interferência de contaminações, levando em última análise a uma melhor qualidade dos resultados obtidos com o sequenciamento.

No entanto, o emprego a LR-PCR requer uma padronização específica para o genoma alvo, sendo essencial a construção de um conjunto de *primers* específicos para viabilizar a amplificação da totalidade dos segmentos que compõem o genoma. Assim, no presente projeto, será realizada a padronização de LR-PCR para BoHV-1 e BoHV-5, facilitando a obtenção de genomas completos destes vírus e permitindo o desenvolvimento de análises genômicas aprofundadas dessas espécies virais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 HERPESVÍRUS BOVINOS

2.1.1 Histórico e classificação

Historicamente, os primeiros relatos de infecções por herpesvírus em bovinos remetem à década de 50. Os relatos de lesões similares ao que foi chamado “exantema coital” na temporada de monta bovinos a campo eram comuns na Europa durante o século XIX. Contudo, a primeira descrição de herpesvírus bovino só foi possível após os primeiros isolamentos do vírus a partir de casos de rinotraqueíte infecciosa nos anos de 1956 e 1957 e de um quadro de vulvovaginite pustular no ano seguinte, 1958 (MADIN *et al.*, 1956; YORK; SCHWARZ; ESTELA, 1957; KENDRICK; GILLESPIE; MCENTEE, 1958). Esses isolamentos permitiram a posterior identificação do herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) (STUDDERT, 1999).

Após o isolamento e descrição dos primeiros herpesvírus em hospedeiros da espécie bovina, foi possível identificar outros herpesvírus nessa espécie animal, relacionados a diferentes manifestações clínicas. Até o momento, há seis espécies de herpesvírus bovinos descritas na literatura.

O herpesvírus bovino tipo 2 (BoHV-2) foi reconhecido nos anos 60 como agente causador da mamilite herpética bovina (STUDDERT, 1999). Há relatos na literatura a respeito do herpesvírus bovino tipo 3 (BoHV-3) (ROSSITER *et al.*, 1988; ROSSITER *et al.*, 1989) Contudo, este tipo atualmente não é reconhecido pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (*International Committee on Taxonomy of Viruses - ICTV*). A amostra antigamente considerada referência de BoHV-3, cepa WC 11, hoje é classificada como Vírus da Febre Catarral Maligna (OvHv-2) (BARTHA *et al.*, 1987).

O herpesvírus bovino tipo 4 (BoHV-4) foi isolado pela primeira vez em 1963 de animais com sinais respiratórios e oculares. Até o presente momento, poucos estudos relatam patologias possivelmente associadas a BoHV-4. Estudos *in vitro* demonstram a capacidade de replicação do vírus em células da mucosa nasal, estando de acordo com os sintomas do trato respiratório associados com infecções de BoHV-4 *in vivo*. Contudo, na maioria da população bovina o vírus parece estar presente causando infecções subclínicas (YANG *et al.*, 2019).

O primeiro relato de infecção por herpesvírus bovino tipo 5 foi realizado na Austrália em 1962 em um caso de meningoencefalite bovina. Na época, baseado no efeito citopatogênico em cultivo celular e apresentação do quadro clínico, foi considerado uma variante neuropatogênica do BoHV-1, denominado BoHV-1.3 (subtipo 3). Mais adiante, a

reclassificação do vírus como uma espécie diferente de BoHV-1 foi baseada no mapeamento de sítios de restrição do DNA viral, testes de soroneutralização e reatividade de anticorpos monoclonais, sendo então, no ano de 1992, o BoHV-5 reconhecido pelo ICTV (ROIZMANN *et al.*, 1992). Apesar de geneticamente e antigenicamente similares, BoHV-1 e BoHV-5 diferem na capacidade de neuro-invasão e neurovirulência. As infecções por BoHV-5 em bovinos variam de subclínicas a meningoencefalite letal (DEL MÉDICO ZAJAC *et al.*, 2010).

O herpesvírus bovino tipo 6 (BoHV-6), também chamado de vírus linfotrópico bovino, foi isolado pela primeira vez a partir de leucócitos de linfossarcomas em bovinos nos Estados Unidos na década de 70. Posteriormente, sequências de DNA de BoHV-6 foram reportadas em amostras de sangue periférico de populações bovinas, chegando a prevalências de até 87% em rebanhos saudáveis. Até o momento, o vírus não foi associado a manifestações clínicas, apesar de se mostrar ubíquo na população bovina (JIA *et al.*, 2014).

Os herpesvírus bovinos pertencem à Ordem *Herpesvirales*, Família *Herpesviridae* e suas classificações taxonômicas atuais, conforme cada espécie, estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Classificação taxonômica dos Herpesvírus bovinos.

Subfamília	Gênero	Espécie
<i>Alphaherpesvirinae</i>	<i>Simplexvirus</i>	BoHV-2
<i>Alphaherpesvirinae</i>	<i>Varicellovirus</i>	BoHV-1
<i>Alphaherpesvirinae</i>	<i>Varicellovirus</i>	BoHV-5
<i>Gammaherpesvirinae</i>	<i>Macavirus</i>	BoHV-6
<i>Gammaherpesvirinae</i>	<i>Rhadinovirus</i>	BoHV-4

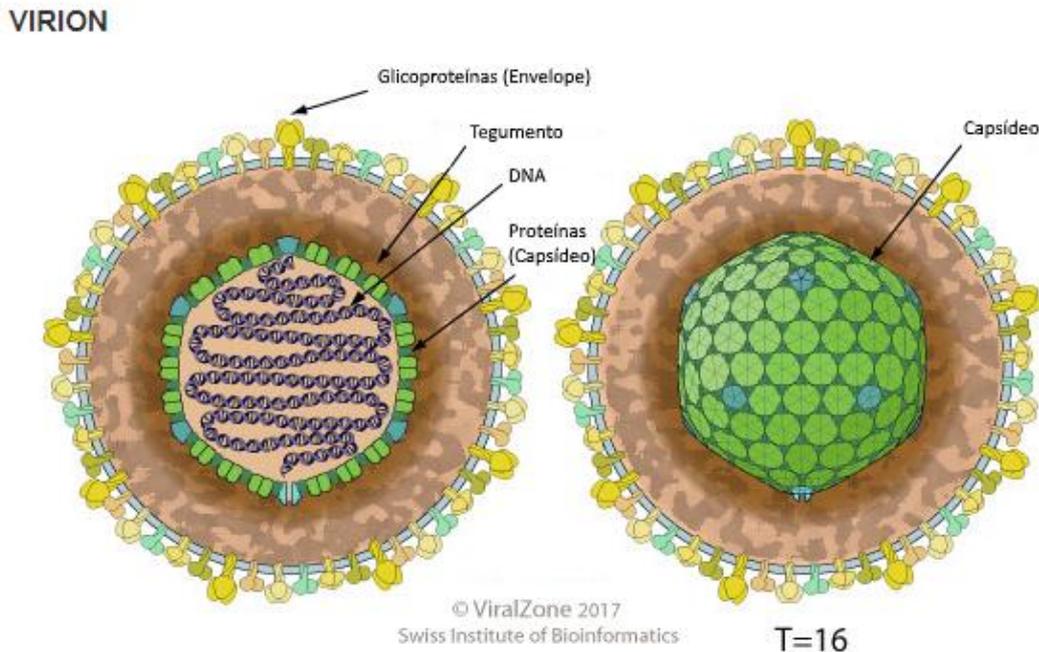
Fonte: Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV), 2021.

2.1.2 Genoma e replicação

O genoma dos herpesvírus vírus é composto por uma molécula de DNA de fita dupla linear. O vírion é formado por um núcleo, contendo o DNA, envolto em um capsídeo icosaédrico de cerca de 110 nm, que por sua vez, é envolto no tegumento, composto de uma camada proteica amorfa. O tegumento é coberto por um envelope lipoproteico que contém as glicoproteínas de superfície. Os vírions medem cerca de 120 a 300 nm de diâmetro, de maneira

que as variações na espessura do tegumento influenciam no tamanho das partículas virais (FRANCO; ROEHE; VARELA, 2012).

Figura 1. Estrutura do vírion, família *Herpesviridae*.



Fonte: adaptado de ViralZone, Swiss Institute of Bioinformatics, 2017.

O tamanho dos genomas, conforme a espécie viral, podem variar de acordo com seu conteúdo de GC, extensão e presença de sequências repetidas. Nos herpesvírus bovinos, o genoma possui tamanho aproximado de 135 a 138 mil pares de bases e codifica cerca de 70 genes (FRANCO; ROEHE; VARELA, 2012). Dentro da família *Herpesviridae*, a estrutura organizacional do genoma divide as espécies em seis grupos, designados de letra A a F. Os Herpesvírus bovinos tipo 1 e tipo 5 (BoHV-1; BoHV-5), que são as espécies de maior importância veterinária, pertencem ao Grupo D. A organização genômica desse grupo (Figura 2) consiste em duas sequências únicas, denominadas *unique long* (UL) e *unique short* (US) (ROIZMAN *et al.*, 1992). Nas regiões UL e US estão situados genes que apresentam apenas uma cópia no genoma. Aos lados da região US, estão situados os domínios IR (*internal repeats* - região repetida interna) e TR (*terminal repeats* - região repetida terminal), que são regiões de sequências repetidas que conseqüentemente apresentam genes em repetições (ROIZMAN *et al.*, 1992; FRANCO; ROEHE; VARELA, 2012).

majoritariamente acometimento clínico respiratório e reprodutivo em bovinos, embora já tenha sido associado a casos de encefalite (BATISTA *et al.*, 2010; DEL FAVA; PITUCO; D'ANGELINO, 2002).

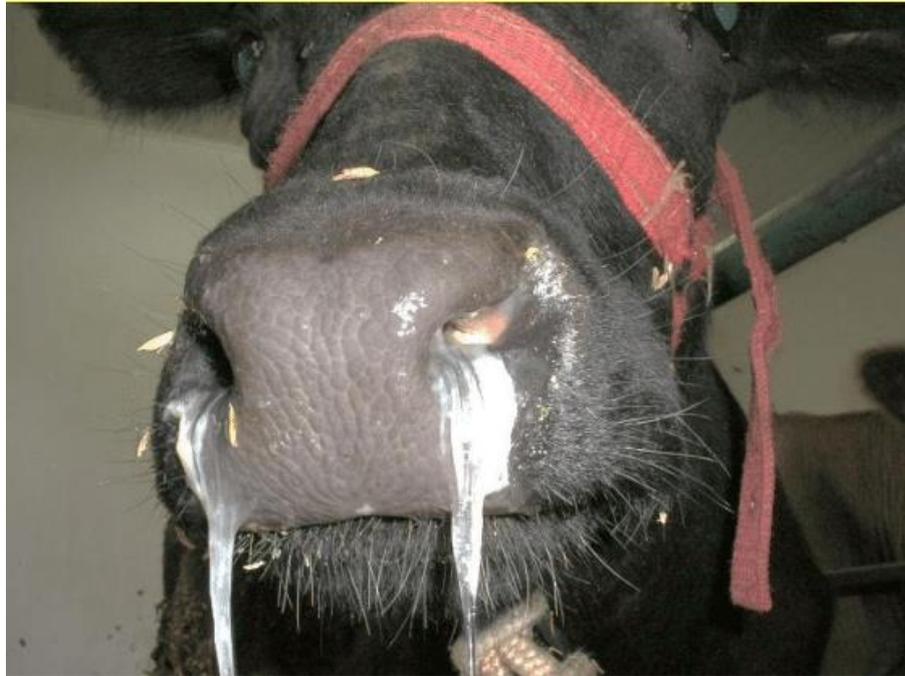
A partir de análises de endonucleases de restrição (REA), o BoHV-1 pode ser classificado em três subtipos: 1.1, 1.2a e 1.2b. O subtipo 1.1, também conhecido como “IBR like” (PAULI *et al.*, 1984), é mais frequentemente isolado de animais com sintomatologia respiratória e transtornos reprodutivos de infertilidade e abortamento. Os subtipos 1.2a e 1.2b são relacionados a diferentes quadros reprodutivos e respiratórios, sendo mais frequentemente isolados de vulvovaginites e balanopostites, sendo assim denominados “IPV like” (PAULI *et al.*, 1984). O subtipo 1.2b é considerado de patogenicidade reduzida e não foi até o momento relacionado a casos de abortamento (BATISTA *et al.*, 2010; DEL FAVA; PITUCO; D'ANGELINO, 2002; FINO *et al.* 2012). Os três subtipos virais apresentam intensa reatividade sorológica cruzada em testes de soroneutralização (FRANCO; ROEHE; VARELA, 2012).

2.1.3.2 Patogenia

Como já descrito anteriormente, após a penetração na mucosa, o BoHV-1 inicia a replicação primária, causando lise celular nas mucosas olfativas ou genitais (conforme via de infecção). A partir da lise celular, aparecem os primeiros sinais clínicos, apresentando mucosas congestionadas, secreções, lesões vesiculares ou erosivas. As secreções provenientes da replicação viral contêm altos títulos virais e são fontes de infecção para animais susceptíveis. Após a replicação, o vírus percorre as vias nervosas, e através de movimento axonal retrógrado, estabelece latência nos gânglios trigêmeo ou sacral (FRANCO; ROEHE; VARELA, 2012; FINO *et al.*, 2012). O vírus também pode realizar disseminação sistêmica por viremia, resultando em quadros de abortamentos/infecções fetais (FRANCO; ROEHE; VARELA, 2012).

A Rinotraqueíte Infecciosa Bovina é caracterizada pela infecção respiratória, podendo ser de subclínica a severa. Os sinais clínicos apresentados são febre, anorexia, apatia, descargas nasais e oculares serosas a mucopurulentas (Figura 3), erosões e hiperemia da mucosa nasal, conjuntivite, dispneia, tosse, sialorréia, estridor traqueal e aumento dos linfonodos locais (FINO *et al.*, 2012). Vacas leiteiras podem apresentar queda na produção de leite, representando prejuízos aos produtores; reprodutores podem apresentar alterações temporárias na morfologia espermática, prejudicando a qualidade do sêmen (FRANCO; ROEHE; VARELA, 2012).

Figura 3. Bovino apresentando descarga nasal mucopurulenta após infecção experimental por BoHV-5.



Fonte: CAMPOS *et al.*, 2011.

A vulvovaginite pustular infecciosa ocorre em fêmeas e está relacionada a montas naturais ou inseminações artificiais com sêmen de reprodutores infectados. Os sinais clínicos iniciam cerca de 2 dias pós-infecção, com edema e congestão da mucosa vulvar e vagina posterior (Figura 4), com evolução para o surgimento de vesículas na mucosa genital. As vesículas progridem para pústulas que podem ficar cobertas por secreções amareladas. As lesões podem ser acompanhadas de corrimento seromucoso a mucopurulento (FRANCO; ROEHE; VARELA, 2012). Em estudos experimentais, observou-se que a severidade das lesões aumenta até 8 dias pós-infecção e a partir disso iniciam a regressão, restando apenas lesões residuais no 10º dia. Durante a infecção as fêmeas podem apresentar disúria e polaquiúria, elevando a cauda ao urinar. Em casos de reativação, o vírus retorna a ser excretado nas secreções genitais, porém com títulos inferiores aos apresentados durante a infecção aguda (HENZEL *et al.*, 2008).

Em machos, a doença genital é denominada Balanopostite Pustular Infecciosa. Os sinais clínicos apresentados são similares aos da fêmea, apresentando mucosas peniana e prepucial hiperêmicas com pequenos pontos amarelados que podem progredir para formações vesiculares ou pustulares que evoluem para ulcerações (Figura 5). As lesões podem ser cobertas por exsudato fibrinoso e em casos graves pode haver hemorragia da mucosa. O animal pode

apresentar disúria, recusa à monta, exteriorização do pênis e corrimento. Assim como na vulvovaginite, os sintomas começam a regredir a partir do 8º dia e em casos de reativação, o reprodutor retorna a excretar o vírus no sêmen, sendo uma forma importante de perpetuação do vírus no rebanho (FRANCO; ROEHE; VARELA, 2012).

Figura 4. Edema e hiperemia de vulva, com presença de pústulas recobertas por exsudato fibrinoso.



Fonte: André Penido.

Figura 5. Exantema coital em bovino com BoHV-1. A e B) Edema e hiperemia de pênis e prepúcio de bovino, com presença de vesículas amareladas.



Fonte: Prof. Rudí Weiblen, UFSM.

Além das apresentações clínicas de IBR, IPV e IPB, o BoHV-1 está envolvido no complexo respiratório bovino, uma doença multifatorial com associações sinérgicas entre

patógenos. Os agentes que mais frequentemente fazem parte do complexo, além do BoHV-1, são o vírus da diarreia viral bovina (BVDV), vírus da parainfluenza 3 (bPI-3V), vírus respiratório sincicial (BRSV) e pasteurelas (FRANCO; ROEHE; VARELA, 2012). Estudos experimentais apontam que o BoHV-1 atua modificando as respostas fisiológicas do hospedeiro, promovendo um melhor ambiente para crescimento dos demais patógenos do complexo. As modificações causadas pelo BoHV-1 são principalmente: danos no epitélio, induzindo a secreção de muco e prejudicando a depuração através da redução da atividade ciliar; diminuição da atividade de macrófagos alveolares e neutrófilos polimorfonucleares, assim como redução nas populações de linfócitos CD4+ e exposição de leucócitos a citocinas inflamatórias (MUYLKENS *et al.*, 2007).

2.1.4 Herpesvírus bovino tipo 5

2.1.4.1 Taxonomia

O BoHV-5 é o agente etiológico da meningoencefalite herpética bovina, patologia caracterizada por meningoencefalite necrosante (não supurativa) que afeta principalmente bovinos jovens (DEL MÉDICO ZAJAC *et al.*, 2010). A espécie viral é subdividida em três subtipos, denominados “a”, “b” e “c”, classificados por REA e reatividade a anticorpos monoclonais (MAb). Até o momento, devido às dificuldades na diferenciação tipo e subtipo-específica, não há uma correlação definida entre diferentes graus de patogenicidade ou apresentações clínicas e diferentes subtipos de BoHV-5 (D'ARCE *et al.*, 2002).

2.1.4.2 Patogenia

Embora genética e antigenicamente similares o BoHV-1 e o BoHV-5 são vírus neurotrópicos que diferem quanto à capacidade neuro-invasiva. Enquanto casos de meningoencefalite por BoHV-1 sejam eventualmente relatados, a infecção por BoHV-5 mais frequentemente leva a casos de meningoencefalite, quase sempre fatais (PÉREZ *et al.*, 2002). A principal diferença em relação à neuro-invasividade é que o BoHV-1 invade neurônios de primeira ordem localizados no gânglio trigeminal, onde estabelece latência, enquanto o BoHV-5 consegue invadir diferentes áreas do encéfalo (VOGEL *et al.*, 2003).

A maioria das infecções de herpesvírus em bovinos permanecem na forma latente e até o momento não se sabe em que fase da vida os animais se infectam. As manifestações clínicas

de infecções por BoHV-5, quando ocorrem, acometem principalmente bezerros, sendo mais frequentes a partir dos 10 meses de idade (SANTOS *et al.*, 2018). Inicialmente se caracterizam pelo surgimento de secreções nasais e oculares que ocorrem já na primeira semana pós-infecção (Figura 3). Em infecções experimentais, observou-se que os sinais neurológicos iniciam cerca de 12 dias pós-infecção, caracterizados por apatia, sialorréia, bruxismo, andar em círculos, protusão da língua, pressionamento da cabeça (Figura 6), tremores na cabeça, permanência de posição em base ampla ou decúbito (CAMPOS *et al.*, 2011). Os animais também podem apresentar convulsões e movimentos de pedaladas (PÉREZ *et al.*, 2002; WRONSKI *et al.*, 2018). O desenvolvimento dos sintomas é rápido e os animais tendem a evoluir para óbito em poucos dias (WRONSKI *et al.*, 2018). Embora a doença tenha alta taxa de mortalidade, pode haver terneiros sobreviventes. Nesses casos, o vírus estabelece latência após infecção (MEYER *et al.*, 2001).

Figura 6. Bezerro com Herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5).



A e C) Pressionamento da cabeça contra parede devido à ataxia. B) Protrusão da língua e sialorréia. Fonte: Fernando Spilki.

Embora a maior parte dos relatos de BoHV-5 sejam de casos de meningoencefalite herpética, Totti *et al.* (2020) e Marin *et al.* (2013) relataram a detecção de DNA de BoHV-5 em fetos abortados em coinfeções com *Neospora caninum* no Brasil e Argentina. Os autores sugerem que o BoHV-5 deve ser considerado entre as possíveis causas de perdas fetais. Contudo, a patogenia dos abortos em infecções pelo BoHV-5 ainda não é bem elucidada, assim como sua associação com *N. caninum*. Recentemente, foram reportados casos de aborto relacionados a BoHV-5 na Índia (KUMAR *et al.*, 2020).

2.1.4.3 Necropsia e histopatologia

Na necropsia de bezerros com meningoencefalite herpética são descritas alterações macroscópicas de áreas hemorrágicas no encéfalo, congestão de vasos em leptomeninges, áreas de descoloração e malácia e consistência gelatinosa do encéfalo. Histologicamente as lesões são caracterizadas por poliencefalomalácia, com presença de infiltrados inflamatórios em diversas áreas do encéfalo e coluna espinhal. Pode haver corpúsculos de inclusão intranucleares em neurônios e astrócitos, gliose multifocal, edema, neuronofagia, necrose isquêmica neuronal e satelitose (WRONSKI *et al.*, 2018; CAMPOS *et al.*, 2011; RISSI *et al.*, 2006).

2.1.5 Epidemiologia

Devido à reclassificação de BoHV-1.3 em BoHV-5, dados epidemiológicos anteriores à reclassificação podem não ser fidedignos pela não distinção entre BoHV-1 e BoHV-5. Como os testes sorológicos usuais não permitem a diferenciação entre infecções destes dois tipos de vírus (HOLZ *et al.*, 2009), os dados epidemiológicos sobre a ocorrência de infecções por estes vírus não são confiáveis no que diz respeito a discriminação tipo-específica.

O herpesvírus bovino tipo 1 tem distribuição mundial, com caráter endêmico em diversos países (ACKERMANN; ANGELS, 2006). No Brasil os levantamentos em busca de evidências sorológicas de infecções pelo BoHV-1 revelam uma ampla distribuição, embora com prevalência variável entre regiões e rebanhos amostrados. Dependendo do tipo de amostragem e população examinada, as prevalências reportadas apresentam variações de 7% a 87% entre diferentes Estados brasileiros (FRANCO; ROEHE; VARELA, 2012; FERNANDES *et al.*, 2018). As variações de prevalência encontradas entre os estados podem ser explicadas pelo tipo de criação e manejo dos animais, aspectos climáticos e fatores ambientais de cada região, bem como pelas diferenças de amostragem e técnicas diagnósticas utilizadas em cada pesquisa (SILVA *et al.*, 2015).

Com relação à prevalência individual, isto é, o número de animais positivos dentro dos rebanhos, esta pode chegar a 100% (SILVA *et al.*, 2015). Em estados que apresentam alta prevalência de rebanhos positivos, o vírus se constitui em problema sanitário e econômico para os produtores.

A ocorrência de BoHV-5 já foi relatada em diversos países com casos esporádicos, contudo, tem ocorrido maior número de relatos na América do Sul, principalmente no Brasil e Argentina (PÉREZ *et al.*, 2002). Suspeita-se que a rara ocorrência de casos de BoHV-5 em

outros países possa ser explicada pela proteção cruzada adquirida por infecções naturais ou vacinação para BoHV-1 (DEL MÉDICO ZAJAC *et al.*, 2006).

Em relação à ocorrência de subtipos de BoHV-5, o subtipo b foi mais prevalente na Argentina até o período de 1984 e aparentemente após esse período não permaneceu em circulação. O subtipo mais prevalente na Argentina, segundo estudos de caracterização é o subtipo a, enquanto no Brasil os subtipos mais descritos até o momento, nos poucos estudos de subtipagem disponíveis, foram a e c (MAIDANA *et al.*, 2011; D'ARCE *et al.*, 2002). Entretanto, estes dados não correspondem a estudos de prevalência mais amplos, pelo que devem ser interpretados com cautela. No Brasil, a prevalência de BoHV-5, nos limitados artigos sobre prevalência tipo-específica, foram detectadas variações entre 2,7 e 93,10%, considerando amostragem em diferentes Estados e a partir de diferentes métodos diagnósticos (GALIZA *et al.*, 2010; CAMPOS *et al.*, 2009). Recentemente foi reportada a primeira ocorrência de BoHV-5 na Índia. Curiosamente, o vírus foi isolado de um caso de aborto (KUMAR *et al.*, 2020). A amostra foi identificada como pertencente ao subtipo “a” e mostrou identidade superior a 99% com amostras de BoHV-5 de origem brasileira na análise filogenética, o que demonstra uma relação próxima entre os vírus.

No Rio Grande do Sul, em dois estudos retrospectivos, a meningoencefalite herpética foi considerada a segunda principal causa infecciosa de acometimento neurológico em bovinos, suplantada apenas pela raiva (SANCHES *et al.*, 2000; SANTOS *et al.*, 2018). Entre amostras encaminhadas para o serviço oficial de diagnóstico de raiva no Estado, foram detectadas 17% das amostras positivas como assim positivas para herpesvírus, dessas sendo 100% positiva para BoHV-5 e 19% para BoHV-1, e ainda 28% coinfectadas com raiva e herpesvírus (RODENBUSCH *et al.*, 2020). Um estudo molecular revelou alta prevalência de herpesvírus em animais de abate, sendo que 75,9% dos animais amostrados foram considerados positivos para coinfeções com BoHV-1 e BoHV-5 (CAMPOS *et al.*, 2009). Esses dados apontam a importância da identificação de infecções por estes dois herpesvírus no diagnóstico diferencial de doenças neurológicas em bovinos, ao mesmo tempo que salienta a precariedade do conhecimento a respeito dessas infecções no Brasil.

2.1.6 Diagnóstico

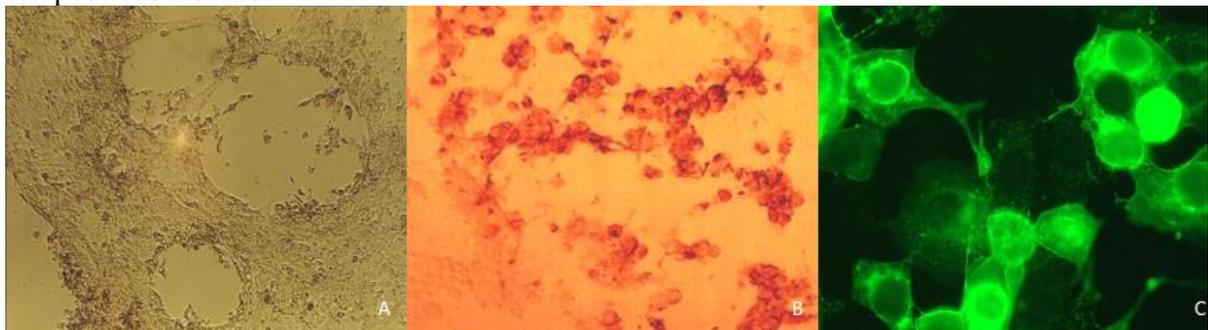
As suspeitas clínicas de BoHV-1 abrangem principalmente casos de aborto, infecções respiratórias e/ou reprodutivas no rebanho, e em casos de BoHV-5 relatos de meningoencefalite de curso fatal, principalmente em terneiros.

As amostras que devem ser encaminhadas para diagnóstico virológico deverão direcionadas ao quadro clínico observado, e podem incluir tecidos do encéfalo (em casos de meningoencefalite), secreções nasais e oculares, tecidos fetais (em casos de aborto), secreções vaginais, sêmen, secreções prepuciais e soro (FRANCO; ROEHE; VARELA, 2012)

O teste padrão para diagnóstico de herpesvírus é o isolamento em cultivo celular suscetível. Tanto BoHV-1 quanto BoHV-5 produzem efeito citopático (ECP) característico em cultivos celulares (Figura 7A). Podem ser utilizados tanto cultivos primários quanto células de linhagem, sendo estas últimas as mais utilizadas, especialmente células da linhagem de rim bovino (MDBK). Em função da possibilidade sempre presente de contaminação com o vírus da diarreia viral bovina (BVDV), em alguns laboratórios tem sido muito utilizada a linhagem CRIB, um clone de MDBK selecionado por sua resistência ao BVDV (FLORES; DONIS, 1995). Geralmente, após a infecção, o ECP característico é evidenciado entre 1 a 3 dias após inoculação. Em alguns casos (incomuns), podem ser necessárias até três passagens subsequentes até a evidenciação do ECP. Se após três passagens virais não houver evidência de ECP, o material é considerado negativo (FRANCO; ROEHE; VARELA, 2012).

Após surgimento do ECP, a identidade do agente pode ser confirmada por testes de imunocoloração, como imunoperoxidase (IPX) ou imunofluorescência (IF) (Figura 7B e 7C) (FRANCO; ROEHE; VARELA, 2012).

Figura 7. Efeito citopático e testes de imunocoloração em cultivo celular infectado com Herpesvírus Bovino.



A) Cultivo celular com efeito citopático característico de Herpesvírus após inoculação de amostra de BoHV-1. B) Teste de imunoperoxidase, em cultivo celular, positivo para Herpesvírus bovino. C) Teste de imunofluorescência, em cultivo celular, positivo para Herpesvírus bovino. Fonte: A e B) Paulo Roehe; C) Vikram Misra.

Também podem ser utilizados testes de PCR para detecção de DNA viral. Os testes de PCR podem ser utilizados para identificação do DNA viral presente tanto em tecidos, quanto em amostras de sangue ou isolados de cultivo celular. Apesar do “*gold standard*” para identificação de herpesvírus bovinos seja o isolamento viral, os testes com alvos genéticos têm

ganhado importância para detecção de herpesvírus em laboratório, visto que apresentam vantagens na rapidez, especificidade e sensibilidade. Além disso, alguns fatores como contaminação da amostra, condições de transporte inadequadas e autólise do tecido influenciam negativamente nos resultados do isolamento viral. Em função disso, os ensaios baseados em PCR têm se tornado de escolha para o diagnóstico, especialmente para o diagnóstico rápido (MARIN *et al.*, 2013; WRONSKI *et al.*, 2018; RODENBUSCH *et al.*, 2020). A nested-PCR padronizada por Campos *et al* (2009) foi o primeiro ensaio capaz de diferenciar entre genomas de BoHV-1 e BoHV-5 aplicado a uma população de animais de abate. Esse método representou uma mudança significativa na forma de discriminar as infecções por BoHV-1 e BoHV-5 através da identificação discriminatória dos genomas.

Também pode ser feita a sorologia dos animais afetados e do rebanho. Contudo, a sorologia isolada não tem valor diagnóstico, uma vez que indica apenas se o animal teve contato com o antígeno, tanto via vacinação ou infecção natural. É indicado que seja feita sorologia pareada durante a infecção aguda e 21-28 dias após infecção, de maneira que um aumento de quatro vezes no título de anticorpos é considerado sugestivo de infecção recente (FRANCO; ROEHE; VARELA, 2012).

2.1.7 Prevenção e controle

Uma vez que BoHV-1 e BoHV-5 são genética e antigenicamente similares, as mesmas medidas sanitárias podem ser aplicadas para controle dos dois vírus (ACKERMANN; ANGELS, 2006).

Para o controle dos vírus no rebanho, deve ser determinado o *status* sorológico dos animais, permitindo a separação ou até mesmo o descarte dos animais positivos. A testagem do rebanho e controle de entrada de novos animais resultaram no sucesso da erradicação de BoHV-1 na Europa, mesmo sem aplicação de vacinação (ACKERMANN; ANGELS, 2006).

A vacinação do rebanho também deve ser considerada, tanto como uma medida preventiva como no controle da doença. Embora a vacinação para herpesvírus não evite a infecção, evita o surgimento ou gravidade dos sinais clínicos. A aplicação da vacinação também é importante pois animais vacinados diminuem a excreção viral, diminuindo a propagação do vírus nos rebanhos (ACKERMANN; ANGELS, 2006).

Além disso, visto que o sêmen é uma importante via de transmissão viral, tanto em montas naturais quanto em programas de inseminação, a testagem do sêmen é imprescindível (KAHRS, 2001).

Embora alguns autores suspeitem que a vacinação intensiva contra BoHV-1 possa estar relacionada ao raro surgimento de casos de BoHV-5 em diversos países (ACKERMANN; ANGELS, 2006), vale ressaltar que até o momento não há comprovação de que a vacina para BoHV-1 promova imunidade cruzada efetiva contra BoHV-5. Em estudo experimental utilizando vacina de BoHV-1 gE-negativo, a vacina não promoveu imunidade satisfatória em desafio com BoHV-5 (SILVA *et al.*, 2006). Por esse motivo, deve-se ter ressalvas ao empregar programas de vacinação utilizando vacinas produzidas com antígenos de BoHV-1 na tentativa de controlar BoHV-5. No Brasil, já há vacinas comerciais produzidas com antígenos de BoHV-1 e BoHV-5. No entanto, embora possam proteger contra os sinais clínicos que causa as perdas, não há evidências de que tais vacinas possam prevenir a infecção com estes vírus.

2.2 ENRIQUECIMENTO E SEQUENCIAMENTO DE DNA VIRAL

A disponibilidade de sequências genômicas completas de herpesvírus bovinos é importante para identificação de genes envolvidos em virulência, assim como para comparações genotípicas entre diferentes vírus, tais como a definição do papel dos diferentes tipos e subtipos nos diferentes quadros clínicos observados. Como exemplo, até o presente, não são conhecidos quais os determinantes da maior ou menor neuropatogenicidade ou neurovirulência de amostras de BoHV-1 e/ou BoHV-5. Assim, somente a ampliação do conhecimento sobre as sequências genômicas completas desses agentes permitirá que tenhamos uma melhor compreensão da biologia do vírus, bem como de suas relações com a espécie hospedeira (DELHON *et al.*, 2003; D'OFFAY *et al.*, 2019).

Para obter um sequenciamento de genomas virais com qualidade, é necessário obter o DNA alvo íntegro, purificado e em quantidades suficientes. Dessa forma o enriquecimento de DNA torna-se uma etapa fundamental para o sucesso da montagem dos genomas. Esse enriquecimento do DNA viral pode ser realizado através de diversas metodologias, como multiplicação viral em cultivo celular (PAIM, 2017), clonagem do DNA viral utilizando plasmídeos (DELHON *et al.*, 2003), clonagem em cromossomo artificial de fungos (KETNER *et al.*, 1994) e amplificação através de polimerases com *primers* específicos ou randômicos (BAI *et al.*, 2019; BURTT, 2011).

Tradicionalmente, para sequenciamento de genomas de vírus considerados “grandes”, como os herpesvírus, o método de enriquecimento utilizado é através da multiplicação em cultivo celular. Contudo, durante a liberação das partículas virais formadas, ocorre a lise celular, liberando DNA celular para suspensão. Com isso, o sequenciamento pode ser comprometido

pela presença de ácidos nucleicos do cultivo celular. Além disso, outros fatores podem interferir na qualidade do sequenciamento, como contaminações no cultivo (HOULDCROFT; BEALE; BREUER, 2017).

Uma alternativa para obtenção de um sequenciamento de melhor qualidade é o enriquecimento específico do genoma-alvo através de PCR. Para essa metodologia, é necessário o desenho de *primers* complementares a sequências previamente conhecidas do vírus. Essa técnica tem sido utilizada com sucesso para obtenção de genomas completos de Ebola e Zika vírus (HOULDCROFT; BEALE; BREUER, 2017). Contudo, as reações tradicionais de PCR usualmente dão origem a fragmentos de tamanho limitado. Assim, trabalhos com genomas-alvo grandes, como é o caso dos genomas de herpesvírus, necessitam adaptações, como a técnica de “long-range PCR”. Esta é uma adaptação da técnica tradicional utilizando polimerases de alta processividade, que em tese permitem a amplificação de fragmentos de até 30 mil pb. A combinação de uma série de pares de primers específicos distribuídos ao longo do genoma possibilitam o mapeamento e sequenciamento de genomas completos (JIA *et al.*, 2014). A técnica já foi adaptada com sucesso para sequenciamento de outros membros da família *Herpesviridae*, como o herpesvírus de ostras (Ostreid herpesvirus 1; OsHV-1; BAI *et al.*, 2019), entretanto, não foi ainda aplicada para o estudo de herpesvírus bovinos.

Uma vez amplificado o genoma de interesse, a etapa seguinte envolve o sequenciamento do genoma. Para tanto, tem sido utilizadas plataformas de sequenciamento de alto desempenho, como os equipamentos Illumina ou Ion Torrent. Nessas, são geradas leituras de fragmentos ou “*reads*” curtos, denominados *short-reads data*, as quais são pequenas sequências de DNA que variam entre 100 a 500 pares de bases e que correspondem aos segmentos amplificados do genoma viral. Algumas plataformas mais modernas, como a MinION ou PacBio, geram *reads* longas, ideais para sequenciamento de *amplicons* maiores ou pequenos genomas virais inteiros (até 20 mil pares de bases). Contudo, a utilização de plataformas de *reads* longas é cara e muitas vezes inviável financeiramente para análises de amostras clínicas. De maneira geral, para se obter êxito no sequenciamento, é necessária uma alta cobertura do genoma. Para tanto, o enriquecimento prévio da amostra através de ampliações genômicas específicas é uma ferramenta importante (HOULDCROFT; BEALE; BREUER, 2017).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Contribuir para o estudo das infecções por herpesvírus bovinos tipos 1 e 5.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Desenvolver e padronizar painéis de *primers* para amplificação de genomas completos de herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5), através de *Long-range* PCR.

Sequenciar, através de sequenciamento de alto desempenho, os genomas virais amplificados.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAS

A amostra de BoHV-1 SV609/03 foi isolada no Laboratório de Virologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) a partir de encéfalo de bovino com sintomatologia neurológica proveniente do Rio Grande do Sul no ano de 2003. A amostra de BoHV-5 EVI88/95 foi isolada no Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), a partir do encéfalo de caso de meningoencefalite herpética proveniente de Campo Grande, estado do Mato Grosso do Sul, no ano de 1995. Ambas as amostras foram identificadas e tipificadas através de *nested-PCR* por SILVA *et al.* (2007).

4.2 EXTRAÇÃO DO DNA VIRAL

O DNA viral foi extraído a partir de 200 µl de ampolas de suspensões virais do banco de amostras do LabVir-UFRGS utilizado o kit PureLink™ Viral RNA/DNA Mini Kit (Invitrogen™), conforme as orientações do fabricante. As suspensões virais são oriundas dos isolados virais das amostras SV609/03 e EVI88/95, previamente multiplicados em cultivos celulares de linhagens CRIB e/ou MDBK.

4.3 ENRIQUECIMENTO ATRAVÉS DE PCR

O enriquecimento do genoma viral foi obtido através de reações em cadeia de polimerase (PCR). Os *primers* foram desenhados utilizando o software PrimalScheme (QUICK *et al.*, 2017) e conferidos manualmente nas sequências de genomas completos de BoHV-1 e BoHV-5 disponíveis no GenBank® (BENSON *et al.*, 2013) através do software Geneious, versão 9.1.3 (Biomatters Ltd.). Em caso de divergência em alguma sequência, os primers foram alterados manualmente através do programa Primer3 (UNTERGASSER *et al.*, 2012). Cada painel tem a capacidade de amplificar genomas completos de DNA viral específico das espécies para qual foram desenhados. As amplificações foram feitas em uma reação para cada par de *primer*, uma vez que as regiões-alvo são de tamanho elevado (entre 5 kpb e 10 kpb).

Foram testadas as seguintes DNA polimerases, a fim de avaliar sua processividade: Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fischer Scientific) e Primestar GXL DNA Polymerase (TaKaRa Bio) (TWEEDY *et al.*, 2015; BAI *et al.*, 2018; MORRISON *et al.*, 2018). Inicialmente foram utilizados os parâmetros sugeridos pelos fabricantes de cada enzima e, subsequentemente, foram realizadas alterações na quantidade inicial de amostra, na temperatura de anelamento, na quantidade de ciclos, no tempo de extensão e nas concentrações de enzima, DMSO, MgCl₂ e dNTPs. Após cada amplificação, os produtos foram submetidos a eletroforese em gel de agarose para conferência da reação (presença de produto, tamanho do produto, presença de bandas inespecíficas e integridade do DNA). Os produtos foram quantificados (Qubit Fluorometric Quantification) e submetidos a sequenciamento de alto desempenho.

4.4 SEQUENCIAMENTO DE ALTO DESEMPENHO

As amostras foram enviadas para sequenciamento em *pools* em concentrações equimolares entre os produtos (amostra SV609/03: 112 ng/μl; amostra EVI88/95: 65 ng/μl). O sequenciamento foi realizado pela empresa Macrogen utilizando a plataforma Illumina (Miseq). As bibliotecas de DNA foram preparadas com o kit de preparação TruSeq Nano DNA (LMW) e sequenciadas com o MiSeq Reagent Nano Kit v2.

4.5 ANÁLISES DOS GENOMAS

Uma classificação inicial das *reads* obtidas foi realizada através do software Kaiju (<https://kaiju.binf.ku.dk/>), seguida de uma classificação utilizando uma base de dados

específicas para vírus através do *software* Genome Detective (<https://www.genomedetective.com/app/typingtool/virus/>). A qualidade das *reads* obtidas foi verificada através do *software* Geneious, versão 9.1.3 (Biomatters Ltd.). A montagem dos genomas completos foi realizada pela metodologia de montagem por referência (*map to reference*) no *software* Geneious, versão 9.1.3 (Biomatters Ltd.). Também, foi realizada a montagem dos genomas pela metodologia *de novo* no *software* SPAdes, versão 3.15.3 (Center for Algorithmic Biotechnology, St. Petersburg State University), pelo Laboratório de Bioinformática e Biotecnologia da Universidade Federal do Tocantins. A análise de cobertura e a conferência manual dos sítios alterados no genoma completo em relação à amostra referência e a predição de ORFs foram realizadas no *software* Geneious, versão 9.1.3 (Biomatters Ltd.). As ORFs preditas foram comparadas com o banco de dados do GenBank® através do Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e nomeadas conforme a identidade com as ORFs de BoHV.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PAINÉIS DE *PRIMERS*

Os *primers* utilizados para amplificação do genoma completo de BoHV-1 e BoHV-5 são apresentados nas tabelas 2 e 3, respectivamente.

Inicialmente foram desenhados dois painéis de *primers* com 15 e 16 pares de *primers* para BoHV-1 e BoHV-5, respectivamente, para a amplificação de fragmentos de aproximadamente 10 mil pares de bases (kpb). Após as primeiras rodadas de amplificação foi necessário desenhar *primers* para amplificação de produtos menores (5 kpb) que cobrissem algumas regiões que não foram amplificadas pelos pares de *primers* inicialmente selecionados. O painel resultante que permitiu à amplificação da amostra de para BoHV-1 é constituído por 14 pares, que amplificam 126.612 pares de bases (pb), representando 93,37% de cobertura (genoma de referência: número de acesso GenBank® NC_001847). Por sua vez, o painel para BoHV-5 é constituído por 22 pares de *primers*, amplificando um total de 132.555 pares de bases (pb), representando 96,25% de cobertura (genoma de referência: número de acesso GenBank® KY549446).

Tabela 2. Paineis de *primers* para BoHV-1.

Par de <i>primer</i>	Sequência <i>primers</i> (5'-3')	%GC <i>primers</i>	T _m * (°C)	T _m ** (°C)	Condições de amplificação	Tamanho fragmento (pb)	%GC fragmento
P1	F: GAGGCCGTCCTTGTGTCTG R: CGTACAGGTCTGCGTTGGTC	60,0 60,0	64 64	60 60	Fig.10 (T5)	10.036	70,5
P2	F: ATGTTGAAGTCGGCGGCAAT R: GGGGGCGAAACTCCTTAAGC	50,0 60,0	60 64	55 60	Fig.10 (T6) e Fig.12	9.635	72,9
P3	F: GCGTACCGCCAGATCTTGTAG R: AAAAGCGTTAGCCTCACCCG	57,14 55,0	66 62	60 57	Fig.10 (T6)	9.776	69,3
P4	F: CGGGTCGGGTGTTATAGGGT R: CCAGCATAATGAGGCAGGGC	60,0 60,0	64 64	60 60	Fig.10 (T5)	10.395	76,8
P5	F: CTGGTAAACTTCACGCGCCT R: CATCGGCAGTACTGCATCC	55,0 60,0	62 64	57 60	Fig.10 (T5)	10.224	72,0
P6	F: CAAAGACCGAGTCCGTGTCTG R: CCAGCGAGCACACGTTTTTG	60,0 55,0	64 62	60 57	Fig.10 (T5)	10.333	72,0
P7	F: AAAGTCGCGCTTCTTCGTGT R: GCCTCCCGGAGCATCAAAAA	50,0 55,0	60 62	55 57	Fig.10 (T5 e T6)	9.769	71,8
P8	F: ACAGAGACGCCCGATACGAA R: GCGCCCGTTGTGGTACATTA	55,0 55,0	62 62	57 57	Fig.10 (T6)	9.981	72,3
P9	F: GCTGTTTCAGGAGGCGTACC R: CCACGTGGCGAGTCCAATAG	60,0 60,0	64 64	60 60	Fig.10 (T5) e 12	10.158	74,4
P10	F: AGGGCTTATGGAGAGCAGCA R: GCTCTGCCAGCTGCTTAACA	55,0 55,0	62 62	57 57	Fig.10 (T5) e (T6)	9.976	71,8
P11	F: TAAGAGTCCGGGCCCATCAG R: CTCGGAGGACGACTCTTGGT	60,0 60,0	64 64	60 60	Fig.11	9.626	70,1
P13	F: CTTTTGCATTTGGCTCGCCC R: ACGCACAGAGGCACTAGGAT	55,0 55,0	62 62	57 57	Fig.11	***	69,9
P15	F: GGGAAGAACACGTCGTCGTC R: GCCGGGGTTTTGCGTTTTG	60,0 57,89	64 60	60 57	Fig.10 (T6)	10.489	75,2
A12 2	F: CGTTGAGTACCGCGCGA R: GAGCAGGGCCCTAAAAACCC	64,71 60,0	56 64	57 60	Fig.15	5.079	72,4

T_m*: Temperatura de *melting* calculada a partir da fórmula $T_m = (2xAT) + (4xGC)$; T_m** : Temperatura de *melting* em soluções com 50 mM de NaCl; ***Tamanho do fragmento para BoHV-1.1 e BoHV-1.2b: 11.043; Tamanho do fragmento para BoHV-1.2a: 9.773. Genoma referência para montagem do painel: MG407776. Fonte: A própria autora.

Tabela 3. Paineis de *primers* para BoHV-5.

Primer	Sequência <i>primers</i> (5'-3')	%GC <i>primers</i>	T _m * (°C)	T _m ** (°C)	Condições de amplificação	Tamanho fragmento (pb)	%GC fragmento
P1	F: GCCAGTACACTTCATCGGCC R: TAAGTCCTCGTTCCACCGCT	60,0 55,0	62 62	60 57	Fig.10 (T5) e Fig.12	10,063	74,5
P2	F: ACCGAATGCTGAAGTCTGCG R: GATGACGACGACGACGGAAG	55,0 60,0	62 64	57 60	Fig.10(T6)	9,858	74,4
P3	F: ACCGGCAGATCTTGTAATGGC R: CACGAAGGGGTCTCGGTAGG	52,38 65,0	64 66	58 62	Fig.10 (T6)	9,975	72,5
P5	F: CTGGTGAACCTTACGCGCCT R: TCATGGTGCTGGACTTTGCC	55,0 55,0	62 62	57 57	Fig.10 (T5)	9,706	75,8
P7	F: GCACCAGTTCTTCGACCTCG R: GTAGCTCCAGGAGAAGGCCA	60,0 60,0	64 64	60 60	Fig.10 (T6)	9,951	75,1
P8	F: CGAGGTCTTCATGCTGGACG R: AGCACGATCTCCACCTCGAA	60,0 55,0	64 62	60 57	Fig.10 (T5)	10,055	74,8
P10	F: GCGTGGCCGTAAAGACCTTT R: GTGCTCGATGACCTCGTGTG	55,0 60,0	62 64	57 60	Fig.10 (T6)	10,009	74,6
P11	F: GCGACTACTGCTTCCTGCTG R: GGTCCTTGAGAACGCCTTCG	60,0 60,0	64 64	60 60	Fig.10 (T5) e Fig.12	9,725	72,9
F1	F: GGATGAACCTCAACCCGCTG ^a R: CAACAACAGCAGCAACGGTG	60,0 55,0	64 62	60 57	Fig.13	4.867	74,4
F1+F2	F: GGATGAACCTCAACCCGCTG ^a R: GAGGAGGAGGAGGAGGAGGA	60,0 65,0	64 66	60 62	Fig.16	9.546	80,3
F2+F3	F: GGGGTCTTTAGGAGGCGTT R: CCGACTGTACCTTCGTTGCC	60,0 60,0	64 64	60 60	Fig.16	8.300	80,9
F4+F5	F: CGATGAGGTTCGTACAGGTCG R: CCGCGCCTTATATGCCCCATT ^b	60,0 57,14	64 66	60 62	Fig.16	9.612	67,9
F5	F: CATTGCGAGGTGAGCTCGGC R: CCGCGCCTTATATGCCCCATT ^b	65,0 57,14	66 66	62 60	Fig.15	5.447	74,2
F6	F: CTGGCACCTGGAGACGAA R: CATCGCCAGACGCTTCTCTC	63,16 60,0	62 64	59 60	Fig.14	4.997	72,6
F8	F: ATCTCGTCCCGTCGCGT R: GGCAACGAAGGTACAGTCGG	64,71 60,0	56 64	57 60	Fig.14 e Fig.15	4.983	67,7
F9	F: CGCGGATGTTCCACATGCCAGA R: CCATGTCCTTGCGCCCGT	59,09 66,67	70 60	61 59	Fig.15	4.912	79,6
A4 1	F: GACATGCCCTTCTTCCAGGC ^c R: CAGGAAGTACTGCCGACG	60,0 63,16	64 62	60 59	Fig.14	4.812	79,6

A4	F: GACATGCCCTTCTTCCAGGC ^c R: CAGGAAGGCGTCGTAGCTCT	60,0 60,0	60 64	57 60	Fig.16	9.294	80,2
A6 1	F: GCGAAGGTCTTCTCGCACTC R: TGTACGCGCTGTTTCATGGTC	60,0 55,0	64 62	60 57	Fig.13	4.809	73,6
A6 2	F: GGTGTTTCAGCTCCAACCTCGG R: AACACGTCCCGGTCGTAGAT	60,0 55,0	64 62	60 57	Fig.13	5.113	74,3
A9 1	F: GCGGACCTTGCGTACTTCC R: AGACCTTGATCACCTCCCCG	63,16 60,0	62 64	59 60	Fig.14	4.924	75,7
A9 2	F: CGCTGGCCGAGTGGTTTGAC R: GCGGGTTCGGGTGGCAAAG	65,0 65,0	66 66	62 62	Fig.13 e Fig.14	5.378	76,0

T_m*: Temperatura de *melting* calculada a partir da fórmula $T_m = (2 \times AT) + (4 \times GC)$; T_m** : Temperatura de *melting* em soluções com 50 mM de NaCl; ^aPrimers iguais; ^bPrimers iguais; ^cPrimers iguais. Genoma referência para montagem do painel: KY549446. Fonte: a própria autora.

A disposição dos *primers* dentro dos genomas referência é apresentada nas Figuras 8 e 9 para BoHV-1 e BoHV-5, respectivamente.

Figura 8. Posição dos *primers* para BoHV-1.



Disposição do genoma de BoHV-1 destacando as regiões única longa (UL), única curta (US), as regiões repetidas invertidas (IRS e TRS) e os *primers forward* (em verde escuro) e *reverse* (em verde claro) dentro do genoma referência (MG407776). Fonte: a própria autora.

Figura 9. Posição dos *primers* para BoHV-5.



Disposição do genoma de BoHV-5 destacando as regiões única longa (UL), única curta (US), as regiões repetidas invertidas (IRS e TRS) e os *primers forward* (em verde escuro) e *reverse* (em verde claro) dentro do genoma referência (KY549446). Fonte: a própria autora.

5.2 AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS GENÔMICOS

Para a amplificação dos fragmentos foram realizadas reações separadas, uma para cada par de *primer* utilizando as enzimas Primestar GXL (Takara Bio Inc.) e Phusion High-fidelity (Thermo Fisher Scientific). As reações foram realizadas separadamente uma vez que os produtos possuem um tamanho elevado e uma grande concentração de guanina (G) e citosina

(C), o que aumenta a estabilidade da molécula de DNA dificultando a amplificação. Inicialmente foram utilizadas as condições de reação indicadas pelos fabricantes (Figura 1A – Apêndice A) com 6 pares de *primers* testados, sendo 3 para BoHV-1 e 3 para BoHV-5. Os resultados (Figura 1B – Apêndice A) da eletroforese demonstraram que ocorreu amplificação apenas em algumas reações utilizando a enzima PrimesSTAR GXL (Takara Bio). Porém, os produtos apresentaram baixa intensidade, algumas bandas inespecíficas e arraste, demandando uma otimização da reação. Dessa forma, optou-se pela utilização da enzima PrimesSTAR GXL (Takara Bio) para a tentativa de amplificação do restante dos produtos, alterando os parâmetros indicados pelo fabricante.

Para definir as melhores condições de reação para amplificação dos fragmentos, foram feitos diferentes testes alterando parâmetros da reação na tentativa de obter produtos únicos, íntegros e em concentração adequada para o sequenciamento de alto desempenho. Os testes desenvolvidos utilizaram diferentes quantidades de DNA, concentrações de DMSO, MgCl₂ e *primers*, temperaturas de anelamento e ciclos de amplificação.

O primeiro parâmetro da reação modificado foi a quantidade de DNA molde (Figura 2A – Apêndice A) com o objetivo de aumentar a intensidade das bandas na eletroforese e certificar que a primeira reação não apresentou um resultado negativo por insuficiência de amostra. Foram realizados testes utilizando uma concentração inicial de 2,5 e 5 vezes a quantidade inicial. Também, foi testada a utilização de 2,0 µl do produto da primeira reação realizada. A quantidade de DNA molde é considerada um fator crítico para insucessos de reações, de maneira que a baixa concentração de DNA molde pode resultar na não amplificação de fragmentos ou na não visualização dos fragmentos na eletroforese (FERREIRA; GRATTAPLIA, 1998). Porém, os resultados obtidos demonstraram que o aumento da quantidade inicial de DNA não surtiu efeito na amplificação dos fragmentos (Figura 2B – Apêndice A). Os produtos obtidos continuaram apresentando uma baixa intensidade e as reações negativas no primeiro teste continuaram apresentando resultado negativo.

Uma vez que a quantidade de DNA molde não apresentou melhorias na amplificação dos produtos, outros parâmetros foram alterados. Para esses testes subsequentes foram selecionados dois pares de *primers* de BoHV-1, que não haviam apresentado amplificação de produto. O intuito da utilização desses *primers* foi amplificar reações negativas para posteriormente aplicar a metodologia no restante das reações.

Dessa forma, a continuidade dos testes foi realizada através da metodologia de amplificação rápida, segundo o manual do fabricante (Takara Bio Inc.). Essa metodologia é baseada no aumento da processividade da reação através do aumento da concentração de enzima

disponível. Para isso, foi utilizado 1,25 unidade de enzima por reação e diminuído o tempo de extensão para 5 minutos (Figura 10A).

Adicionalmente ao protocolo de amplificação rápida, foram realizados testes utilizando 7 e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Figura 10B). Genomas ricos em GC, como genomas de BoHV, são mais difíceis de amplificar, uma vez que as três pontes de hidrogênio entre as bases G e C dão uma maior estabilidade para as fitas duplas de DNA, dificultando a permanência das fitas desnaturadas para ação da enzima polimerase e aumentando a formação de dímeros de *primers* na reação. Sendo assim, uma maior quantidade de GC implica em uma maior dificuldade de desnaturação do DNA na PCR. A adição de DMSO é uma maneira de facilitar a amplificação, pois torna as bases GC mais termolábeis, diminuindo a estabilidade das fitas duplas de DNA e, como consequência, diminuindo a temperatura necessária para a desnaturação. Além disso, a adição de DMSO evita o reanelamento de fitas simples de DNA, evitando formação de estruturas secundárias (ex: *hairpin-like*), facilitando o anelamento dos *primers* e aumentando a formação de produtos mais específicos (STRIEN; SANFT; MALL, 2013).

Ainda, para aumentar a eficiência da PCR, além da adição de DMSO, foram realizados testes, utilizando o protocolo rápido, para avaliar o aumento da concentração de $MgCl_2$, visando aumentar a sensibilidade da reação (Figura 3A – Apêndice A). A disponibilidade de $MgCl_2$ influencia a especificidade e sensibilidade da reação de PCR, uma vez que a disponibilidade de Mg^{2+} interfere na desnaturação da fita dupla de DNA e no anelamento dos *primers*. Ainda, o Mg^{2+} é um cofator da enzima DNA polimerase. Dessa forma, uma quantidade insuficiente de Mg^{2+} pode resultar na não amplificação de fragmentos, sendo a adição de $MgCl_2$ uma maneira de corrigir a não amplificação e aumentar a eficiência da PCR (SCHMIDT *et al.*, 2014).

Figura 10. Testes 4, 5 e 6 de parâmetros de reação com enzima PrimeSTAR GXL (Takara Bio), alterando a quantidade de enzima polimerase e adicionando 7 e 10% de DMSO.

A) TESTE 4: ENZIMA PRIMESTAR GXL					
Reagente	Volume		Temperatura	Tempo	Ciclos
Tampão (5X)	5,0		95°C	4 min	1 X
dNTPS (10mM)	2,0		98°C	10 seg	
PF (10pm/μl)	1,0		60° C	15 seg	35 X
PR (10pm/μl)	1,0		68°C	5 min	
Enzima (1,25U/μl)	1,0		68°C	10 min	1 X
H ₂ O	13,0				
DNA	2,0				
B) TESTES 5 E 6: ADIÇÃO DE DMSO, ENZIMA PRIMESTAR GXL					
Reagente	Volume (T5)	Volume (T6)	Temperatura	Tempo	Ciclos
Tampão (5X)	5,0	5,0	95°C	4 min	1 X
DMSO	2,5	1,8			
dNTPS (10mM)	2,0	2,0	98°C	10 seg	
PF (10pm/μl)	1,0	1,0	60° C	15 seg	35 X
PR (10pm/μl)	1,0	1,0	68°C	5:00 min	
Enzima (1,25U/μl)	1,0	1,0	68°C	10 min	1 X
H ₂ O	10,5	11,2			
DNA	2,0	2,0			

A) Condições de reação do teste 4; em vermelho aumento de 0,5 μl de enzima polimerase. B) Condições de reação dos testes 5 e 6; em vermelho adição de 7 e 10% de DMSO. Fonte: a própria autora.

Também, uma quantidade suficiente de desoxinucleotídeos trifosfatos (dNTPs) disponível para incorporação nas novas fitas de DNA é essencial para o sucesso da reação. Portanto, foi realizado o aumento na quantidade de dNTPs, uma vez que, devido ao tamanho do produto, a quantidade de dNTPs disponível pode ser um limitante para a amplificação (Figura 3B – Apêndice A). Contudo, dNTPs atuam como quelantes de Mg²⁺, diminuindo uma parte do Mg²⁺ disponível na reação (VON AHSEN; WITTNER; SCHUTZ, 2001). Dessa forma, o último teste realizado com o protocolo rápido foi o aumento conjunto de MgCl₂ e dNTPs (Figura 3C – Apêndice A).

Avaliando o resultado dos testes realizados (Figura 4 – Apêndice A), observamos que a utilização do protocolo rápido (1,25 unidade de enzima e 5 min de extensão) aliada a adição de 7% de DMSO (Figura 10B - T6) apresentou amplificação nos dois pares de *primers* testados. Também foi possível visualizar a amplificação do produto desejado em um dos pares de *primers* no teste utilizando 10% de DMSO (Figura 10B - T5). As alterações nas concentrações de MgCl₂ e dNTPs não surtiram efeito em relação aos resultados obtidos.

Dessa forma, a tentativa de amplificação de todos os fragmentos do genoma de BoHV-1 foi feita utilizando as condições do teste 6 (Figura 10B - T6). Os resultados demonstraram que os pares de primers P2, P3, P8, P10 e P15 (Tabela 2) para BoHV-1 deram origem aos *amplicons* esperados (Figura 5 – Apêndice A). Apesar da ocorrência de arraste e algumas bandas inespecíficas, a banda na altura esperada sugere uma concentração elevada de DNA, tornando o produto adequado para sequenciamento.

Alguns ensaios não deram origem a *amplicons* com 7 % de DMSO; estes foram testados com 10 % de DMSO (Figura 10B - T5). Com esse protocolo, foi possível visualizar produtos de amplificação com os pares de *primers* P4, P5, P6, P9, P10 e P11 para BoHV-1 (Figura 6 – Apêndice A). Novamente, algumas deram origem a *amplicons* com bandas inespecíficas e arraste, porém, o *amplicon* na altura esperada apresentou uma intensidade muito maior, sugerindo concentração adequada.

Para a amplificação do genoma da amostra de BoHV-5 foi utilizada a mesma abordagem: foram inicialmente realizadas tentativas de amplificação com 7% de DMSO (*primers* positivos: P2, P3, P7 e P10; Tabela 3) e, na ausência de amplificação, foi utilizado o protocolo com 10% de DMSO (*primers* positivos: P1, P5, P8 e P11) (Figura 7B – Apêndice A).

Com as duas reações utilizando estes protocolos foi possível amplificar 11 fragmentos da amostra de BoHV-1 (P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10 e P15) e oito de BoHV-5 (P1, P2, P3, P5, P7, P8, P10 e P11), demonstrando a necessidade de novos ajustes na reação para amplificar os fragmentos restantes. Para tanto, com o intuito de amplificar os fragmentos dos pares de *primers* de BoHV-1 e BoHV-5 que não amplificaram nas condições anteriores, foi realizada uma reação utilizando o protocolo rápido, com adição de 10 % de DMSO e a diminuição da temperatura de anelamento para 59 °C (Figura 11A), visando aumentar a sensibilidade da ligação dos *primers*. A diminuição da temperatura de anelamento da reação é indicada pelo fabricante da enzima (Takara Bio Inc.) em casos onde não há amplificação ou há pouca amplificação de fragmentos. Nessas condições os *primers* P11 e P13 de BoHV-1 apresentaram amplificação (Figura 11B).

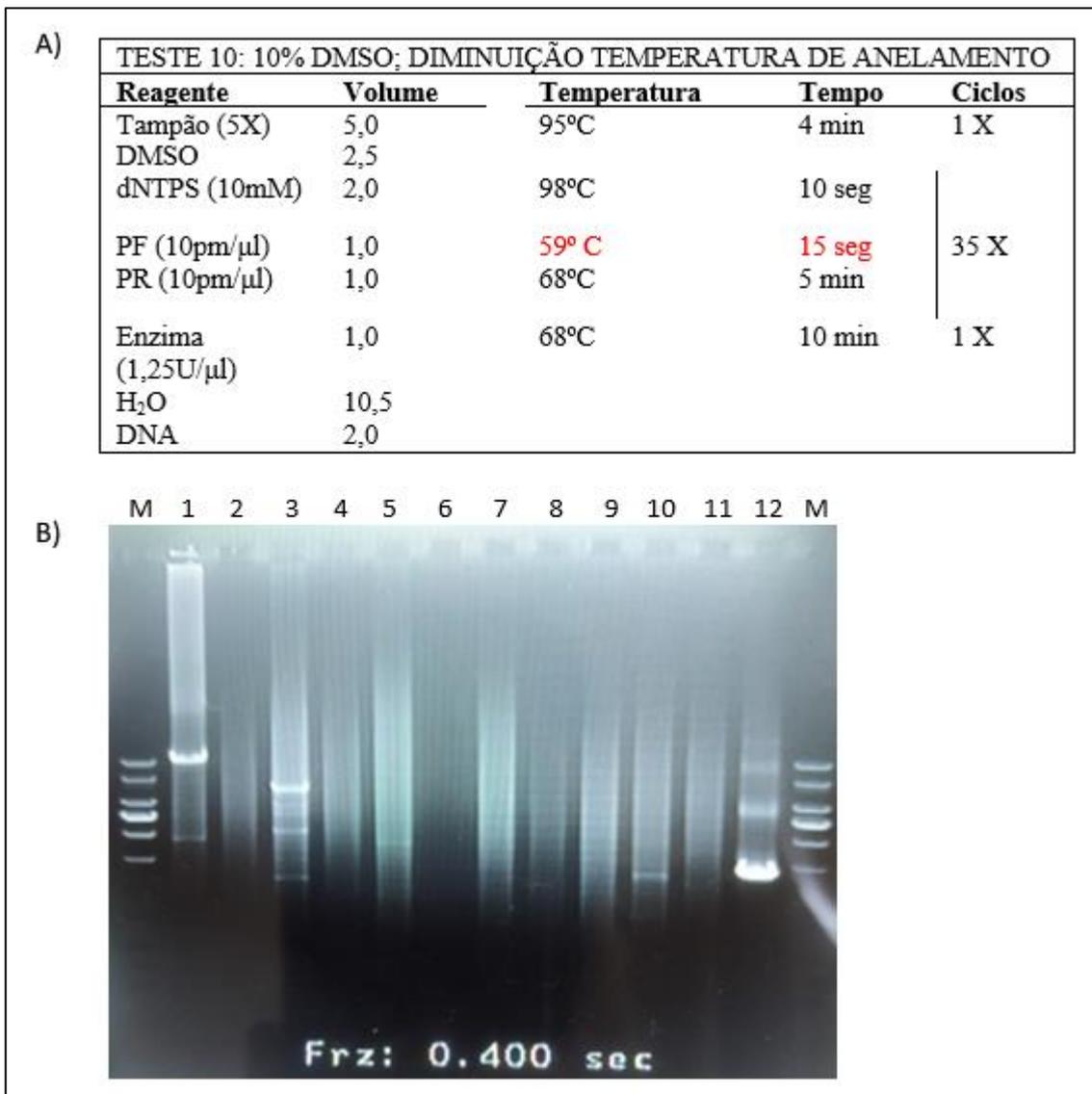
Para os fragmentos que ainda não haviam dado origem a *amplicons* em nenhuma das reações anteriores, foi elaborada uma reação em duas etapas, a qual não apresenta um passo único de anelamento dos *primers* (Figura 12A). Nesse protocolo, as etapas de anelamento e extensão são combinadas em uma etapa única. Essa estratégia foi adotada seguindo as instruções do fabricante da enzima para a amplificação de fragmentos difíceis e é indicada em casos onde a amplificação dos fragmentos se apresenta insuficiente ou ausente e também em casos onde há presença de arrastes e bandas inespecíficas. Nessa tentativa foram utilizados 3

pares de *primers* de BoHV-1 e 4 pares de BoHV-5. Além de utilizar *primers* com resultados positivos, visando possibilitar a comparação entre ampliações com os protocolos anteriores, foram utilizados *primers* que não haviam dado origem a *amplicons* em nenhuma das condições avaliadas anteriormente. Apesar de resultados positivos apenas para os *primers* que já haviam apresentado amplificação (*primers* P2 e P14 de BoHV-1 e P1 e P11 para BoHV-5), com esse protocolo as reações apresentaram menos arraste quando comparada com as anteriores (Figura 12B).

Por fim, foi realizada uma tentativa de amplificação de fragmentos de 20 mil pares de bases, utilizando *primers* intercalados (para BoHV-1: *primer forward* (PF) 11 + *primer reverse* (PR) 12; PF12+PR13; PF13+PR14; e PF14+PR15; para BoHV-5: PF3+PR4; PF5+PR6; PF8_PR9; PF11+PR12; e PF12+PR13). Para essa reação foi utilizado o protocolo em duas etapas, um tempo de extensão maior (7 min) e 30 ciclos de amplificação (Figura 8A – Apêndice A). A redução da quantidade dos ciclos de amplificação seguiu a orientação do fabricante (Takara Bio Inc.) para diminuir a quantidade de arraste, uma vez que a enzima começa a se desestabilizar conforme a quantidade de ciclos aumenta.

Uma análise global dos resultados das PCRs utilizando os *primers* desenhados inicialmente demonstrou que 13 pares para o genoma de BoHV-1 e 8 pares para BoHV-5 obtiveram êxito em amplificar seus fragmentos-alvo. Assim, não foi possível amplificar duas regiões do genoma de BoHV-1 e oito regiões do genoma de BoHV-5 com estes *primers*. Essa diferença significativa entre a quantidade de regiões amplificadas pode ser explicada pela quantidade de sequências disponíveis no banco de dados para a conferência da especificidade dos *primers*. Enquanto foram utilizadas 48 sequências do genoma completo de BoHV-1 para realizar o alinhamento e conferência do anelamento dos *primers*, para BoHV-5 foram utilizadas apenas três.

Figura 11. Teste 10 de parâmetros de reação, utilizando protocolo rápido com adição de 10 % de DMSO e diminuição da temperatura de anelamento.



A) Condições da reação. Em vermelho, diminuição da temperatura de anelamento para 59°C. B) Gel de agarose - M: marcador 1000 pb; 1: P11 BoHV-1 (positivo); 2: P12 BoHV-1; 3: P13 BoHV-1 (positivo); 4: P14 BoHV-1; 5: P4 BoHV-5; 6: P6 BoHV-5; 7: P9 BoHV-5; 8: P12 BoHV-5; 9: P13 BoHV-5; 10: P14 BoHV-5; 11: P15 BoHV-5; 12: P16 BoHV-5. Fonte: a própria autora.

Figura 12. Teste 11 de parâmetros de reação, utilizando protocolo de reação em duas etapas.

A) TESTE 11: REAÇÃO EM DUAS ETAPAS				
Reagente	VOLUME (T5)	Temperatura	Tempo	Ciclos
Tampão (5X)	5,0	95°C	4 min	1 X
DMSO	2,5			
dNTPS (10mM)	2,0	98°C	10 seg	35 X
PF (10pm/μl)	1,0			
PR (10pm/μl)	1,0	68°C	5 min	
Enzima (1,25U/μl)	1,0	68°C	10 min	1 X
H ₂ O	10,5			
DNA	2,0			

B)							
M	1	2	3	4	5	6	7

A) Condições de reação do teste 11, reação em duas etapas. B) Gel de agarose - M: marcador 1000 pb; 1: P2 BoHV-1 (positivo); 2: P9 BoHV-1 (positivo); 3: P14 BoHV-1; 4: P1 BoHV-5 (positivo); 5: P11 BoHV-5 (positivo); 6: P13 BoHV-5; 7: P15 BoHV-5. Fonte: a própria autora.

Para preencher as lacunas deixadas pela não amplificação de alguns fragmentos de 10 kpb optou-se pelo desenho de novos pares de *primers*. Esses novos *primers* foram desenhados utilizando as mesmas metodologias dos *primers* de 10 kpb, porém, com fragmentos-alvos com tamanho aproximado de 5 kpb. Essa redução no tamanho dos fragmentos visou facilitar as ampliações. Inicialmente o painel de *primers* de fragmentos de 5 kbp era composto por 3 pares para BoHV-1 e 16 pares para BoHV-5.

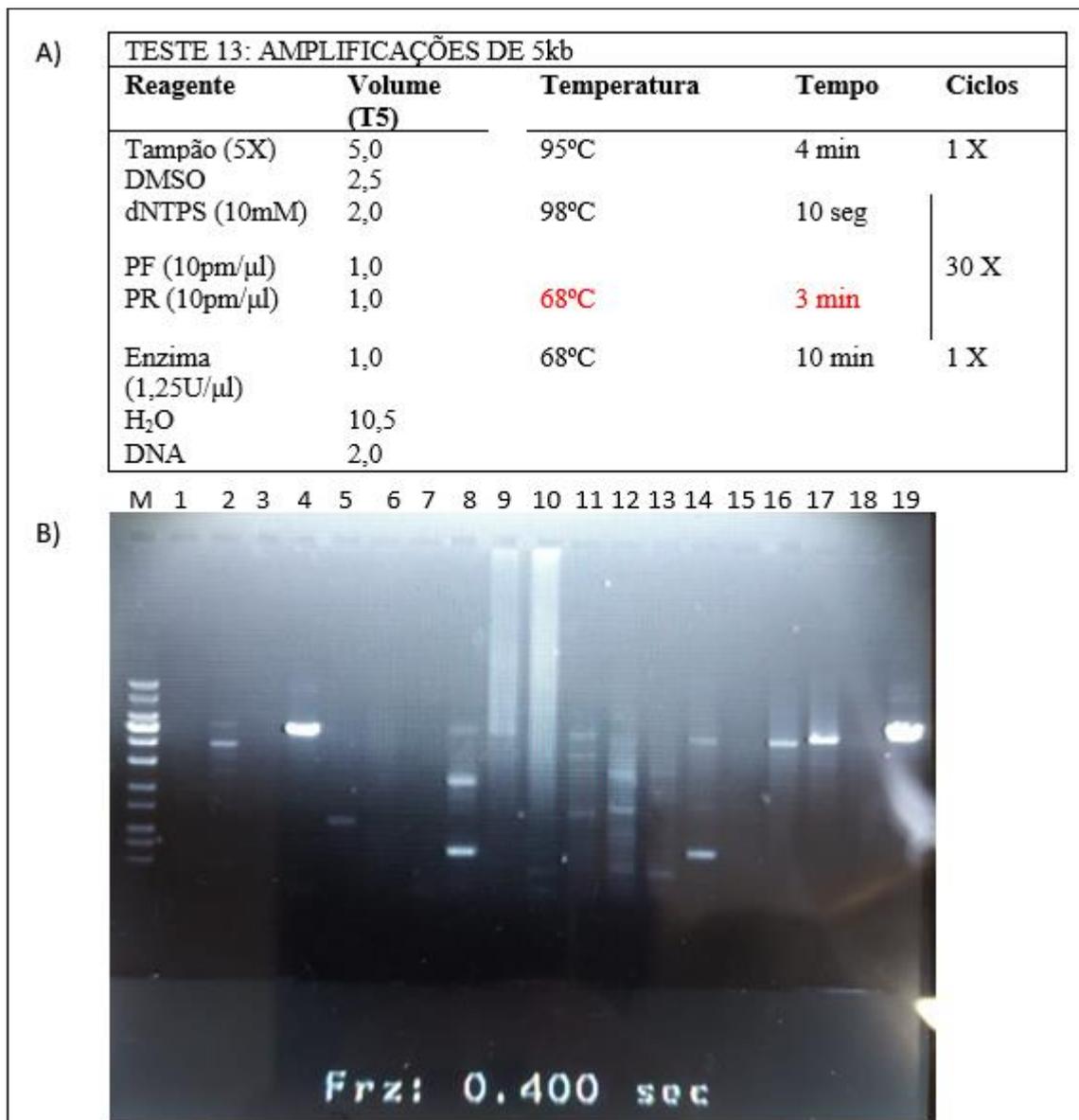
Para amplificação dos fragmentos de 5 kpb, inicialmente foi utilizada a metodologia de reação em duas etapas com a redução do tempo de extensão para 3 min (Figura 13A). Os resultados (Figura 13B) demonstraram produtos na altura esperada, com intensidade adequada e banda única em apenas 4 pares, F1, A6 1, A6 2 e A9 2, todos para o genoma de BoHV-5. Porém, outros pares apresentaram produtos com baixa intensidade ou com bandas inespecíficas.

Após a análise dos resultados dessa reação, foi realizada a tentativa de amplificação incluindo o passo de anelamento dos *primers* com temperatura de 60 °C (Figura 14A). Com essas condições, foram obtidos produtos de mais 4 pares de *primers*, F6, F8, A4 1 e A9 1, novamente todos tendo alvo o BoHV-5 (Figura 14B e 14C).

Numa terceira tentativa para amplificação dos produtos de 5 kpb, foram testadas 3 diferentes temperaturas de anelamento (Figura 15A). Quatro dos cinco pares de *primers* testados, A12 2 para BoHV-1 e F5, F8 e F9 para BoHV-5, apresentaram amplificação de produtos na altura esperada em todas as temperaturas testadas (Figura 15B). O par F8 já havia apresentado amplificação nos testes anteriores e foi utilizado como um controle positivo da reação. Também, foi possível identificar que a diminuição da temperatura de anelamento aumentou a intensidade da banda amplificada nos *primers* testados. Porém, a diminuição da temperatura de anelamento também ocasionou o aumento da intensidade das bandas inespecíficas, o que já era esperado.

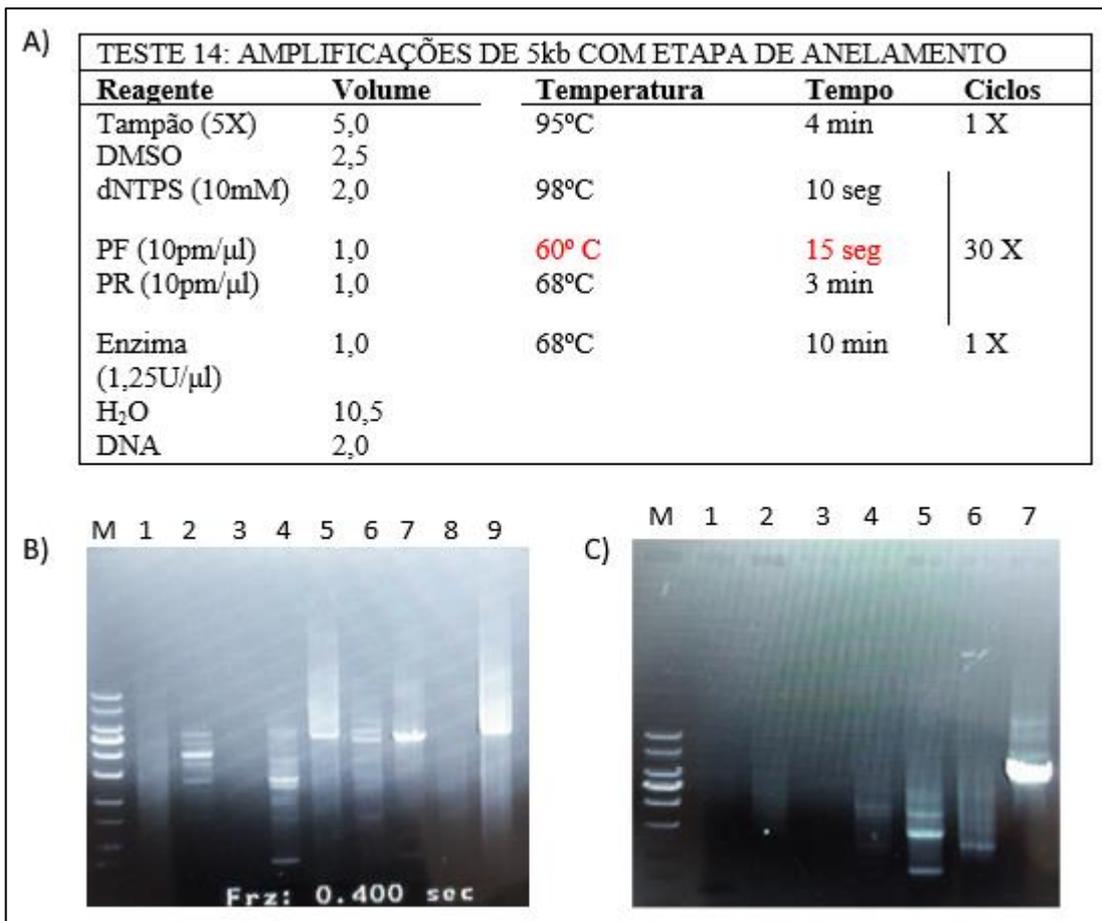
Por fim, foi realizada uma tentativa de amplificar fragmentos de 10 kpb utilizando pares de *primers* mesclados (para BoHV-1: PF A14 1+PR15 e PF A12 1+PR A12 2; para BoHV-5: PF F1+PR F2, PF F2+PR F3, PF F3+PR F4, PF F4+PR F5, PF F6+PR F7 e PF A5 1+PR A5 2). Essa reação utilizou o protocolo rápido com uma temperatura de anelamento de 60°C (Figura 16A). Nessa reação foram considerados positivos os produtos obtidos com os pares PF F1+PR F2, PF F2+PR F3, PF F4+PR F5 e PF A5 1+PR A5 2, mesmo que alguns apresentaram bandas com intensidade baixa, bandas inespecíficas e bandas abaixo da altura desejada.

Figura 13. Teste 13 de parâmetros de reação, utilizando protocolo de reação em duas etapas para ampliações de fragmentos de 5 mil pares de bases.



A) Condições de reação do teste 13 para ampliações de fragmentos de 5 mil pares de bases, utilizando protocolo de reação em duas etapas. Em vermelho, diminuição do tempo de extensão. B) Gel de agarose - M: marcador 1000 pb; 1: A12 1 BoHV-1; 2: A12 2 BoHV-1; 3: A14 BoHV-1; 4: F1 BoHV-5 (positivo); 5: F2 BoHV-5; 6: F3 BoHV-5; 7: F4 BoHV-5; 8: F5 BoHV-5; 9: F6 BoHV-5; 10: F7 BoHV-5; 11: F8 BoHV-5; 12: F9 BoHV-5; 13: F10 BoHV-5; 14: A4 1 BoHV-5; 15: A4 2 BoHV-5; 16: A6 1 BoHV-5 (positivo); 17: A6 2 BoHV-5 (positivo); 18: A9 1 BoHV-5; 19: A9 2 BoHV-5 (positivo). Fonte: a própria autora.

Figura 14. Teste 14 de parâmetros de reação para ampliações de fragmentos de 5 mil pares de bases com adição da etapa de anelamento.



A) Condições de reação do teste 14 para ampliações de fragmentos de 5 mil pares de bases. Em vermelho, adição da etapa de anelamento. B) Gel de agarose - M: marcador 1000 pb; 1: A12 1 BoHV-1; 2: A12 2 BoHV-1; 3: A14 BoHV-1; 4: F5 BoHV-5; 5: F6 BoHV-5 (positivo); 6: F8 BoHV-5 (positivo); 7: A4 1 BoHV-5 (positivo); 8: A4 2 BoHV-5; 9: A9 1 BoHV-5 (positivo). C) Gel de agarose - M: marcador 1000 pb; 1: F2 BoHV-5; 2: F3 BoHV-5; 3: F4 BoHV-5; 4: F7 BoHV-5; 5: F9 BoHV-5; 6: F10 BoHV-5; 7: A9 2 BoHV-5 (positiva). Fonte: a própria autora.

Figura 15. Teste 15 de parâmetros de reação para ampliações de fragmentos de 5 mil pares de bases com diferentes temperaturas de anelamento (T1, T2 e T3).

A)

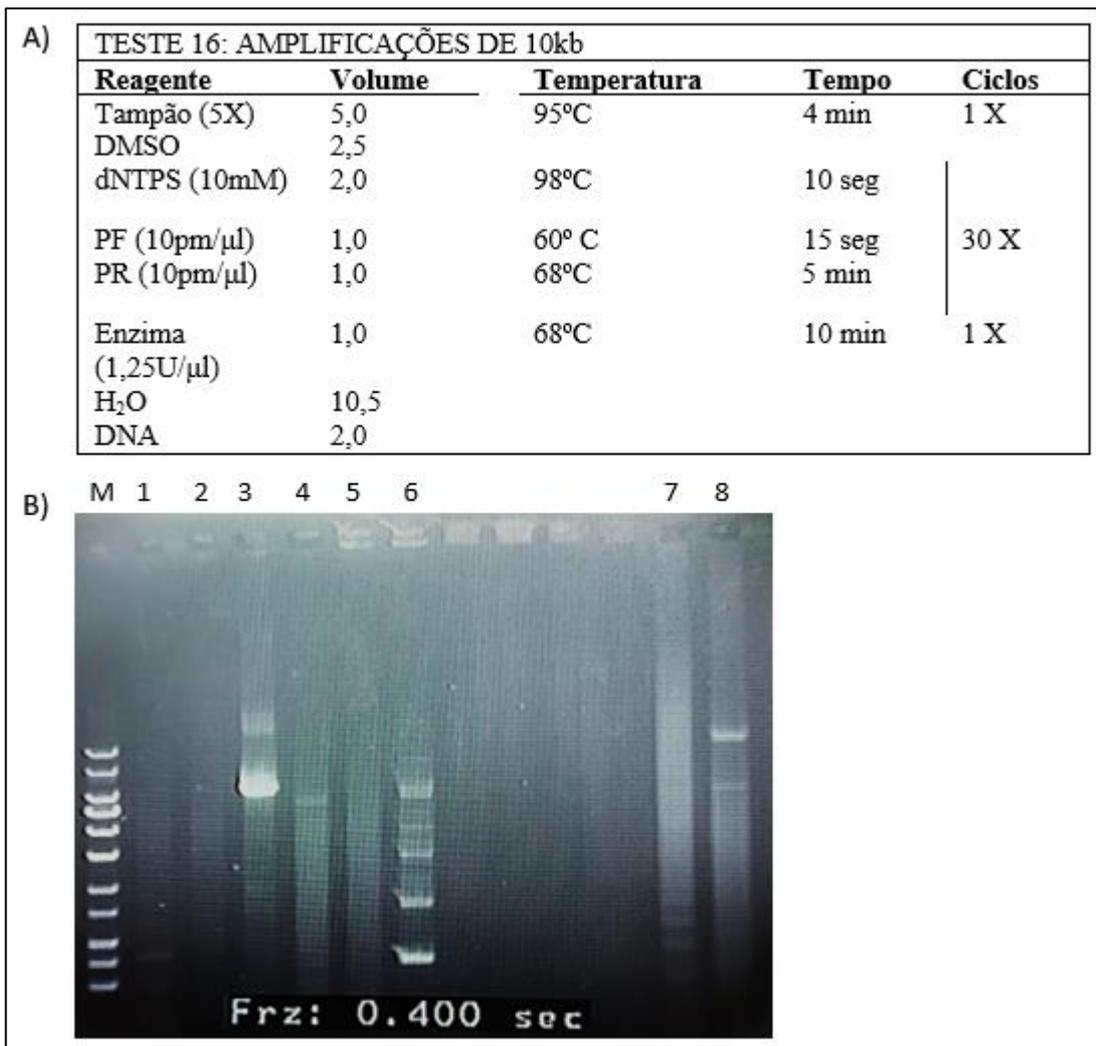
TESTE 15: AMPLIFICAÇÕES DE 5kb, DIFERENTES TEMPERATURAS DE ANELAMENTO						
Reagente	Volume	Temperatura (1)	Temperatura (2)	Temperatura (3)	Tempo	Ciclos
Tampão (5X)	5,0	95°C	95°C	95°C	4 min	1 X
DMSO	2,5					
dNTPS (10mM)	2,0	98°C	98°C	98°C	10 seg	30 X
PF (10pm/μl)	1,0	58°C	61°C	62°C	15 seg	
PR (10pm/μl)	1,0	68°C	68°C	68°C	3 min	
Enzima (1,25U/μl)	1,0	68°C	68°C	68°C	10 min	1 X
H ₂ O	10,5					
DNA	2,0					

B)

Frz: 0.400 sec

A) Condições de reação do teste 15 para ampliações de fragmentos de 5 mil pares de bases. Em vermelho, testes de diferentes temperaturas de anelamento - T1: 58°C; T2: 61°C; T3 62°C. B) Gel de agarose - M: marcador 1000 pb; 1: A12 1 BoHV-1 58; 2: A12 1 BoHV-1 61; 3: A12 1 BoHV-1 62; 4: A12 2 BoHV-1 58 (positivo); 5: A12 2 BoHV-1 61 (positivo); 6: A12 2 BoHV-1 62 (positivo); 7: F5 BoHV-5 58 (positivo); 8: F5 BoHV-5 61 (positivo); 9: F5 BoHV-5 62 (positivo); 10: F8 BoHV-5 58 (positivo); 11: F8 BoHV-5 61 (positivo); 12: F8 BoHV-5 62 (positivo); 13: F9 BoHV-5 58 (positivo); 14: F9 BoHV-5 61 (positivo); 15: F9 BoHV-5 62 (positivo). Fonte: a própria autora.

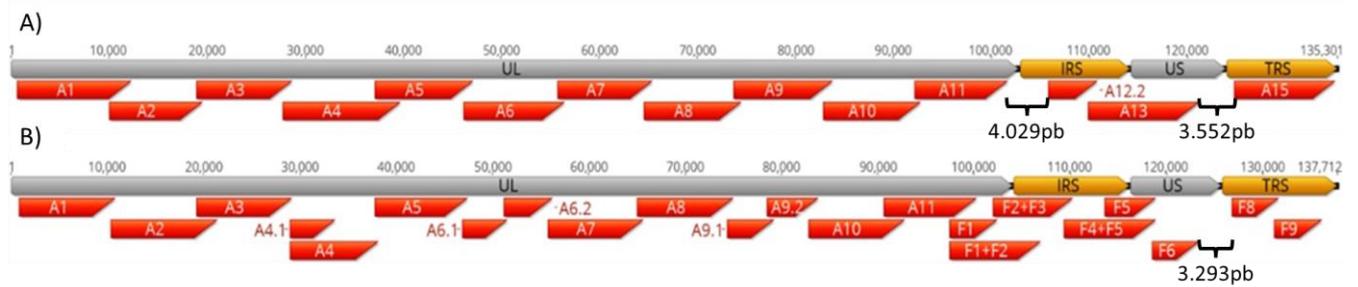
Figura 16. Teste 16 de parâmetros de reação para ampliações de fragmentos de 10 mil pares de bases utilizando *primers* mesclados.



A) Condições de reação do teste 16 para ampliações de fragmentos de 10 kpb, utilizando *primers* da mesclados, desenhados para ampliações de 5 kpb. B) Gel de agarose - M: marcador 1000 pb; 1: PF A14 1+PR15; 2: PF A12 1+PR A12 2; 3: PF F1+PR F2 (positivo); 4: PF F2+PR F3 (positivo); 5: PF F3+PR F4; 6: PF F4+PR F5 (positivo); 7: PF F6+PR F7; 8:PF A4 1+PR A4 2 (positivo). Fonte: a própria autora.

Os resultados obtidos durante as reações de LR-PCR deram origem aos painéis de *primers* apresentados nas Tabelas 2 e 3. Analisando os fragmentos amplificados, nota-se que algumas regiões não foram cobertas, sendo duas de aproximadamente 4.029 e 3.552 pb do genoma de BoHV-1 (Figura 17A) e uma de aproximadamente 3.293 pb do genoma de BoHV-5 (Figura 17B). Porém, como as regiões não amplificadas poderiam ser oriundas de alterações nos genomas das amostras testadas, os produtos das ampliações foram quantificados, agrupados em *pools* por cada espécie viral e enviados para o sequenciamento para uma análise parcial dos genomas para que, se necessário, posteriormente fossem desenhados *primers* específicos para cada amostra, visando a cobertura das regiões não amplificadas.

Figura 17. Disposição dos fragmentos amplificados pelos painéis de *primers* de BoHV-1 e BoHV-5.



A) Posição dos *amplicons* do painel de *primers* para amplificação de genomas de BoHV-1. B) Posição dos *amplicons* do painel de *primers* para amplificação de genomas de BoHV-5. Destacado com colchetes as regiões, e seus tamanhos, que não foram amplificadas com os painéis de *primers*.

5.3 SEQUENCIAMENTO DE ALTO DESEMPENHO

O resultado bruto do sequenciamento pode ser visualizado na Tabela 4.

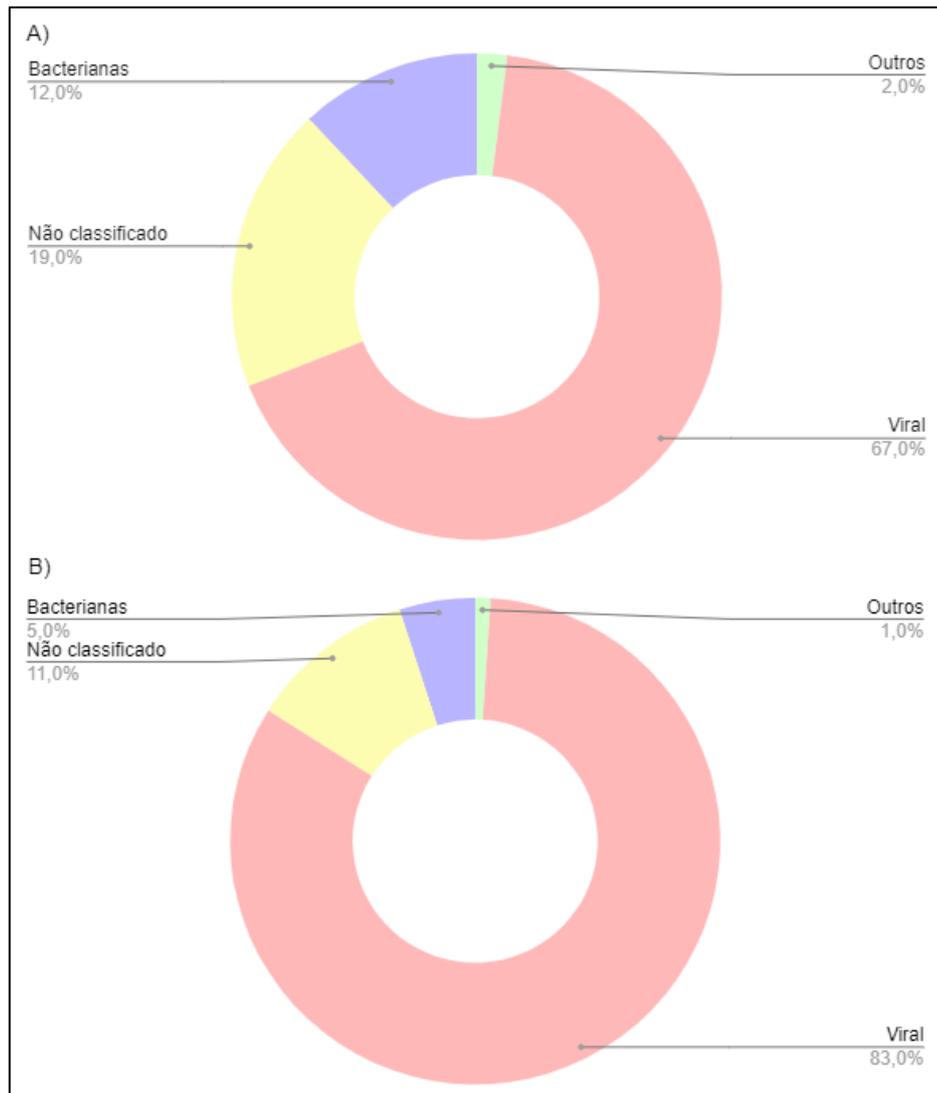
Tabela 4. Resultado do sequenciamento das amostras EVI88/95 e SV609/03.

Amostra	Total de bases sequenciadas	Total de <i>reads</i> obtidas	% CG	% AT	% Q20	% Q30
SV609/03	1.207.607.184	4.011.984	65,17	34,83	83,32	73,65
EVI88/95	1.167.142.550	3.877.550	64,54	35,46	82,0	72,27

Fonte: a própria autora.

Apesar da grande quantidade de *reads*, para confirmar a especificidade do protocolo de enriquecimento dos genomas de BoHV-1 e BoHV-5 foi feita uma classificação das *reads* (Figura 18). Essa classificação inicial demonstrou que o enriquecimento apresentou uma especificidade adequada para os genomas-alvo, apesar de uma pequena quantidade de *reads* de origem de bactérias contaminantes e de origem não determinada.

Figura 18. Classificação inicial da *reads* pelo *software* Kaiju.



A) Amostra SV609/03; B) Amostra EVI88/95. Fonte: a própria autora.

A seguir, foi realizada uma classificação das *reads* utilizando um banco de dados específico para vírus. Os resultados foram ainda mais robustos em relação à especificidade das *reads* obtidas. O *software* classificou 94,01% das *reads* da amostra SV609 como sendo de BoHV-1 e 91,43% das *reads* da amostra EVI88 como sendo de BoHV-5. Ainda, esse *software* gera um gráfico de cobertura montado através dos resultados da classificação das *reads* (Figura 19). Novamente, esses resultados corroboram a grande especificidade do sequenciamento realizado e demonstram que as coberturas dos genomas obtidas foram maiores do que a esperada através da análise da disposição dos *amplicons* dentro dos genomas. Porém, para a certificação da cobertura dos genomas foi necessário realizar a montagem e conferência dos genomas.

Figura 19. Classificação das *reads* pelo *software* Genome Detective.

A)	Assignment	# Reads	Coverage (%)	Depth of Coverage	Identity (%)		Genome Coverage
					NT	AA	
	Bovine alphaherpesvirus 1	3771836	97.2	6044.2	99.5	99.4	
B)	Assignment	# Reads	Coverage (%)	Depth of Coverage	Identity (%)		Genome Coverage
					NT	AA	
	Bovine alphaherpesvirus 5	3545301	99.6	5223.7	99.9	99.9	

A) Classificação das *reads* da amostra SV609/03, demonstrando uma cobertura de 97,2% do genoma. B) Classificação das *reads* da amostra EVI88/95, demonstrando uma cobertura de 99,6%. Fonte: a própria autora.

5.4 MONTAGEM DO GENOMA

A montagem dos genomas através da metodologia *map to reference* utilizou as amostras MG407776 e KY549446 como referência para BoHV-1 e BoHV-5, respectivamente. A tabela 5 resume a quantidade de *reads* utilizadas na montagem de cada genoma, bem como o tamanho, o conteúdo de bases GC e a cobertura.

Tabela 5. Resultado da montagem das amostras SV609/03 e EVI88/95

Amostra	Total de <i>reads</i> utilizadas	% de <i>reads</i> utilizadas	Tamanho do genoma (pb)	% CG	Cobertura média
SV609/03	3,214,505	80,12	134.106	72,2	6567,6
EVI88/95	2,435,287	63,89	137.654	74,7	4733,6

Fonte: a própria autora.

Também, para fins de comparação, foram utilizados os *contigs* resultantes da análise no *software* Genome Detective e da montagem através da metodologia *de novo* pelo *software* SPAades, versão 3.15.3. Dessa forma, os genomas montados foram conferidos manualmente e comparados com montagens realizadas por diferentes metodologias.

5.4.1 SV609/03

Com as *reads* obtidas do sequenciamento da amostra SV609/03 foi possível realizar a montagem parcial do genoma contendo 69 ORFs, descritas na Tabela 6, e a configuração estrutura do grupo D, com uma região única longa (UL) de 103.015 pb, seguido de uma região repetida invertida (IRS) de 10.966 pb, uma região única curta (US) de 9.746 pb e uma região repetida invertida terminal (TRS) de 10.379 pb.

Apesar da alta cobertura do genoma montado, o mesmo apresentou uma região com um *gap* 289 pb na região IRS, e seis regiões com *gaps* duplicadas, sendo um no gene BICP22 com tamanho aproximado de 37 pb e cinco no gene BICP4 de 283 pb, 215 pb, 189 pb, 27 pb, e 12 pb aproximadamente. Essas regiões com *gaps* estão dentro das regiões não amplificadas com os *primers* (Figura 17), porém, outros genes que pertencem a essa região foram montados com grande confiabilidade. Ainda, a região que abriga o sentido *forward* do gene BICP4 foi amplificada com o *amplicon* 15. Com a análise da montagem dos genomas, acredita-se que essas regiões possam ser resultantes da dificuldade de montagem de regiões repetidas invertidas. Dessa forma, apesar da não amplificação de algumas regiões, é sugerido, para o sequenciamento de genomas completos de BoHV-1, utilizar o painel de *primers* aqui apresentados e, após a análise do resultado do sequenciamento, desenhar *primers* específicos para as regiões de *gap*, quando necessário.

A classificação do subtipo da amostra SV609/03 foi feita por análise *in silico* utilizando a enzima *HindIII* segundo D'ARCE *et al.* (2002). O padrão de clivagem resultante foi igual ao do subtipo 1, classificando a amostra como BoHV-1.1 (Figura 20). Essa classificação foi confirmada através da análise filogenética (Figura 21).

Tabela 6. Anotações dos genes da amostra SV609/03 (BoHV-1).

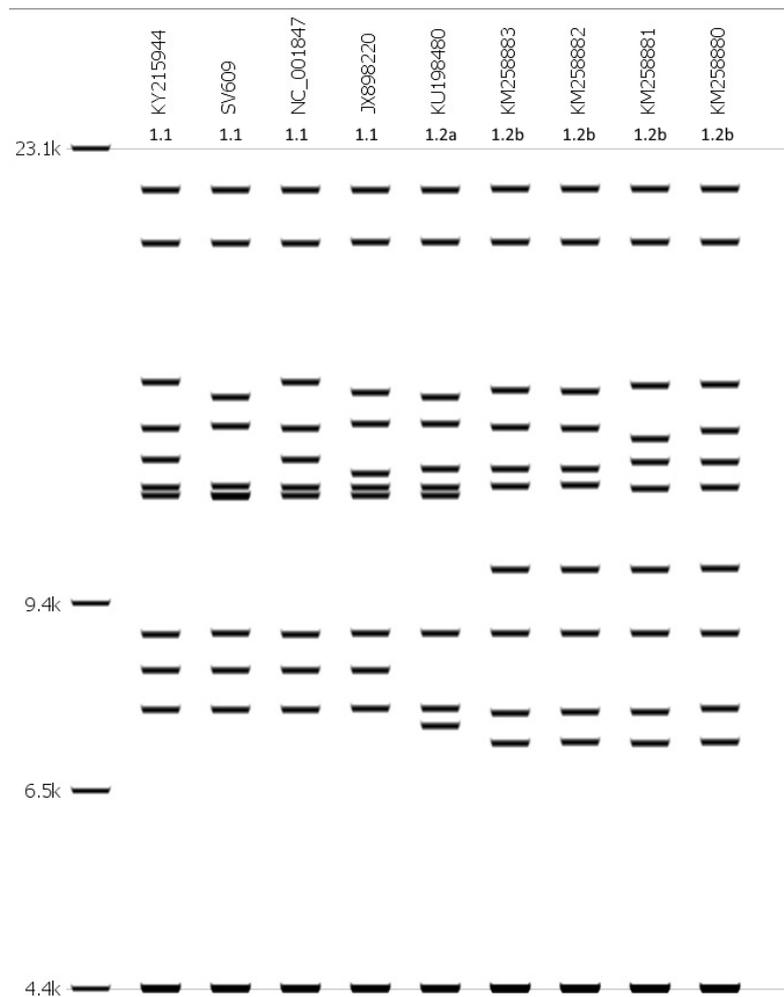
Gene	Início	Fim	Tamanho (aa)	Orientação	Predição de produto
circ	490	1,301	812	<i>forward</i>	Proteína de miristoilação do vírion
UL54	1,671	2,882	1,212	<i>reverse</i>	Regulador multifuncional de expressão
UL53	1,671	4,078	2,408	<i>reverse</i>	Glicoproteína K
UL52	1,671	7,289	5,619	<i>reverse</i>	Componente do complexo helicase/primase do DNA
UL51	7,288	8,024	737	<i>forward</i>	Proteína de palmitoilação
UL50	8,072	9,065	994	<i>reverse</i>	Pirofosfatase de DUT
UL49.5	9,013	10,272	1,260	<i>forward</i>	Glicoproteína N
UL49	9,427	10,272	846	<i>forward</i>	Proteína do tegumento
UL48	10,387	16,649	6,263	<i>forward</i>	Fator de trans
UL47	12,006	16,649	4,644	<i>forward</i>	Fosfoproteína do tegumento

UL46	14,364	16,649	2,286	<i>forward</i>	Proteína do tegumento
UL44	16,663	18,259	1,597	<i>reverse</i>	Glicoproteína C
UL43	16,663	19,575	2,913	<i>reverse</i>	Proteína de membrana
UL42	19,633	20,874	1,242	<i>reverse</i>	Fator de processividade para DNA polimerase
UL41	21,119	22,499	1,381	<i>forward</i>	Proteína <i>virion host shutoff</i> (VHS)
UL40	22,545	23,561	1,017	<i>reverse</i>	Pequena subunidade da ribonucleotídeo redutase
UL39	22,545	25,944	3,400	<i>reverse</i>	Grande subunidade da ribonucleotídeo redutase
UL38	26,257	27,710	1,454	<i>reverse</i>	Proteína do capsídeo
UL37	27,926	40,784	12,859	<i>forward</i>	Proteína do tegumento
UL36	31,125	40,784	9,660	<i>forward</i>	Proteína do tegumento
UL35	40,839	41,256	418	<i>reverse</i>	Proteína do capsídeo
UL34	40,839	42,095	1,257	<i>reverse</i>	Proteína de membrana
UL33	40,839	42,532	1,694	<i>reverse</i>	Proteína do empacotamento do capsídeo
UL32	42,513	45,469	2,957	<i>forward</i>	Proteína de clivagem e empacotamento
UL31	44,311	45,469	1,159	<i>forward</i>	Proteína nuclear UL34-associada
UL30	45,302	49,063	3,762	<i>reverse</i>	DNA polimerase, subunidade catalítica
UL29	49,318	53,035	3,718	<i>forward</i>	Proteína de ligação de fita simples do DNA
UL28	53,140	58,313	5,174	<i>forward</i>	Proteína de clivagem e empacotamento
UL27	55,476	58,313	2,838	<i>forward</i>	Glicoproteína B
UL26.5	58,656	59,697	1,042	<i>reverse</i>	Proteína-esqueleto (capsídeo)
UL26	58,656	60,636	1,981	<i>reverse</i>	Serino-protease (maturação do capsídeo)
UL25	58,656	62,491	3,836	<i>reverse</i>	Proteína de empacotamento do DNA
UL24	58,656	63,354	4,699	<i>reverse</i>	Proteína putativa associada a membrana
UL23	63,353	67,129	3,777	<i>forward</i>	Timidina quinase
UL22	64,548	67,129	2,582	<i>forward</i>	Glicoproteína H
UL21	67,185	69,962	1,778	<i>reverse</i>	Proteína do tegumento
UL20	69,074	75,110	6,037	<i>forward</i>	Proteína de membrana
UL19	69,842	75,110	5,269	<i>forward</i>	Proteína maior do capsídeo
UL18	74,160	75,110	1,011	<i>forward</i>	Proteína do capsídeo
UL15	75,159	80,776	5,618	<i>reverse</i>	Proteína de empacotamento e clivagem do DNA
UL17	76,449	79,703	3,255	<i>forward</i>	Proteína do tegumento
UL16	78,591	79,703	1,113	<i>forward</i>	Proteína do víron
UL14	80,839	84,620	3,782	<i>forward</i>	Proteína menor do tegumento
UL13	81,422	84,620	3,199	<i>forward</i>	Serina/treonina proteína quinase
UL12	82,900	84,620	1,721	<i>forward</i>	Exonuclease alcalina
UL11	84,315	84,620	306	<i>forward</i>	Proteína de miristoilação do tegumento
UL10	84,735	85,970	1,236	<i>reverse</i>	Glicoproteína M
UL9	85,969	90,896	4,928	<i>forward</i>	Proteína de ligação da origem
UL8	88,615	90,896	2,282	<i>forward</i>	Componente do complexo helicase/primase do DNA
UL7	90,849	91,816	968	<i>reverse</i>	Proteína vírion-associada
UL6	90,849	93,839	2,991	<i>reverse</i>	Proteína do vírion
UL5	93,889	96,490	2,602	<i>forward</i>	Componente do complexo helicase/primase do DNA
UL4	96,426	97,005	580	<i>forward</i>	Proteína nuclear
UL3.5	97,019	97,430	412	<i>reverse</i>	Proteína do vírion
UL3	97,019	98,047	1,029	<i>reverse</i>	Fosfoproteína
UL2	97,019	98,700	1,682	<i>reverse</i>	Uracil glicosilase

UL1	97,079	99,459	2,441	<i>reverse</i>	Glicoproteína L
BICP0	100,593	102,818	2,226	<i>reverse</i>	Proteína transativadora precoce imediata com dedo de zinco (<i>zinc finger</i>)
BICP4*	103,726	107,773	4,048	<i>reverse</i>	Regulador de gene positivo e negativo
BICP22*	112,712	113,691	980	<i>forward</i>	Fator de transcrição
US1.67	113,534	114,691	1,158	<i>reverse</i>	Proteína do vírion
US2	114,748	115,059	312	<i>reverse</i>	Proteína do tegumento
US3	115,545	118,469	2,925	<i>forward</i>	Serina/treonina proteína quinase
US4	117,084	118,469	1,386	<i>forward</i>	Glicoproteína G
US6	118,643	121,183	2,541	<i>forward</i>	Glicoproteína D
US7	120,034	121,183	1,150	<i>forward</i>	Glicoproteína I
US8	121,461	123,251	1,791	<i>forward</i>	Glicoproteína E
BICP22*	123,996	124,981	986	<i>reverse</i>	Fator de transcrição
BICP4 *	129,920	133,967	4,048	<i>forward</i>	Regulador de gene positivo e negativo

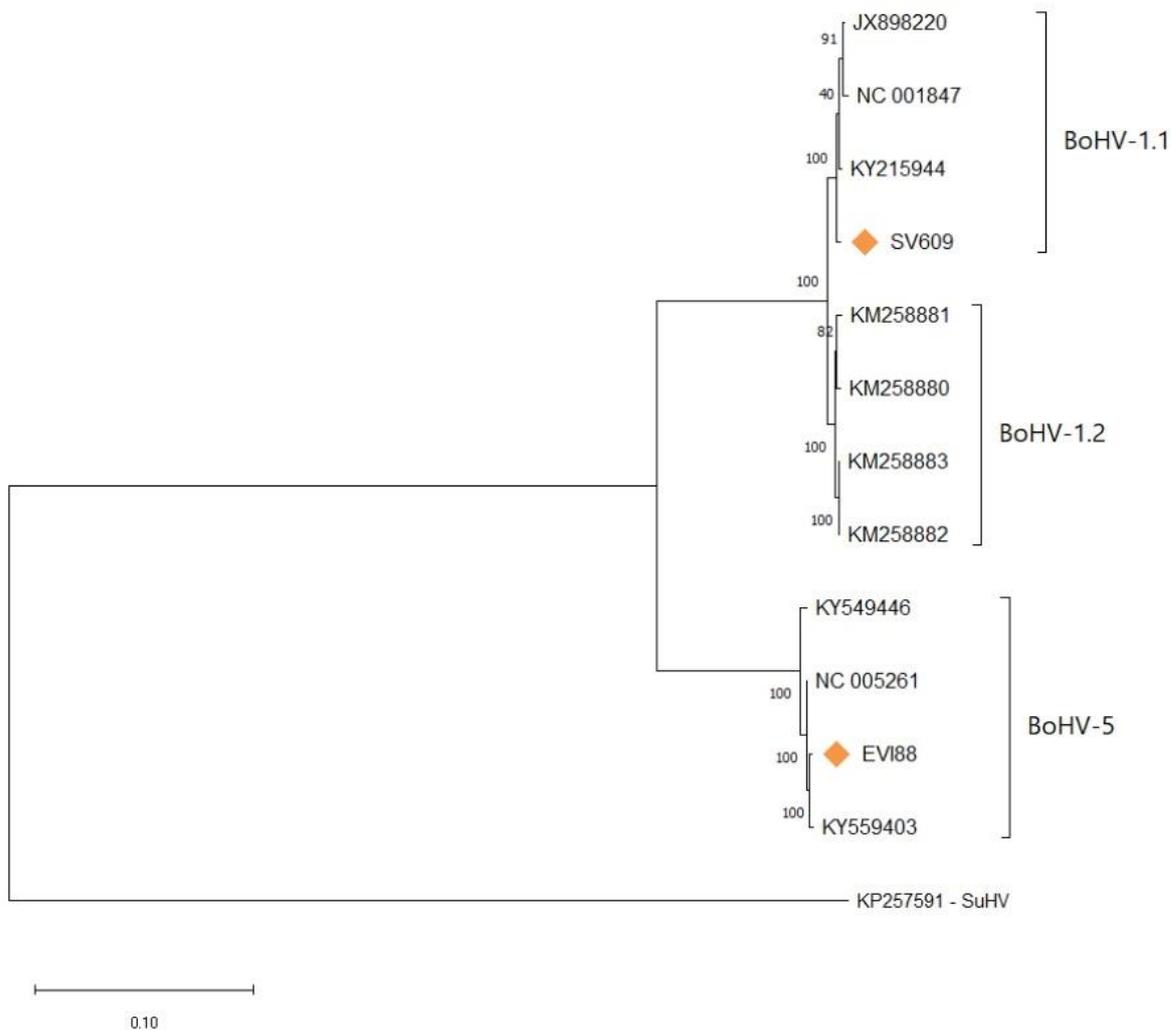
*Genes que apresentam regiões com *gaps* de cobertura. Fonte: a própria autora

Figura 20. Análise de restrição enzimática com *HindIII* para classificação de subtipos de BoHV-1.



Fonte: a própria autora.

Figura 21. Árvore filogenética de BoHV-1 e BoHV-5.



◆: amostras oriundas deste estudo. Fonte: a própria autora.

5.4.2 EVI88/95

Com o resultado do sequenciamento foi possível obter o genoma completo da amostra EVI88/95, o qual apresenta 73 ORFs, descritas na Tabela 7. O genoma apresenta a configuração estrutura do grupo D, com uma região única longa (UL) de 104.123 pb, seguido de uma região repetida invertida (IRS) de 12.046 pb, uma região única curta (US) de 9.541 pb e uma região repetida invertida terminal (TRS) de 11.944 pb.

A subtipagem do genoma foi feita por análise *in silico*, utilizando a metodologia de análise de restrição enzimática (REA) com a enzima *BstEII* segundo D'ARCE *et al.* (2002). A

amostra EVI88 apresentou o mesmo padrão de bandas da amostra P160 (KY559403) classificada por PAIM (2017) como BoHV-5 C ("não A, não B") (Figura 22). Contudo, ambas as amostras apresentam padrões de bandas diferentes do padrão "não A, não B" proposto por D'ARCE *et al.* (2002). Ainda, a amostra EVI88/95 foi classificada por D'ARCE *et al.* (2002) como subtipo A, porém através da análise *in silico* realizada com o genoma completo da amostra EVI88, apresenta padrões de banda distinto dos três padrões (A, B e "não A, não B"/C) descrito por aqueles autores. A REA utilizando a enzima *BstEII* da amostra EVI88 pode ser verificada na Figura 22A, assim como das demais amostras com genoma completo depositados no GenBank, seguidas dos padrões propostos por D'ARCE *et al.* (2002) na Figura 22B. Podemos observar que os genomas completos sequenciados até o momento confirmam os padrões de subtipagem de A e C. Contudo, os padrões de clivagem observados nas amostras EVI88/95 e P160 (KY559403) divergem dos propostos por D'ARCE *et al.* (2002), sugerindo um perfil diferente, que pode representar a existência de um quarto subtipo.

Recentemente, através do sequenciamento de genoma completo da amostra A663 (isolada de quadro de meningoencefalite herpética), foi comprovada a possibilidade de recombinação entre BoHV-1 e BoHV-5 e o isolado A663 foi identificado como um recombinante (MAIDANA *et al.*, 2021). A mesma amostra foi utilizada por D'ARCE *et al.* (2002) na padronização de REA para identificação de subtipos de BoHV-5 e foi utilizada como padrão de classificação para o subtipo B. Em nossas análises, nenhuma das amostras com genoma completo de BoHV-5 sequenciadas até o momento correspondem com o padrão de clivagem do subtipo B estabelecido por D'ARCE *et al.* (2002), o que pode ser devido a recombinações. Ainda, nos estudos de D'ARCE *et al.* (2002) nenhuma outra amostra além da A663 foi classificada como BoHV-5 B.

Para uma melhor classificação quanto ao subtipo da amostra EVI88, foi realizada uma análise filogenética, a qual demonstrou que essa amostra forma um clado com a amostra P160 (KY559403), confirmando que as duas pertencem ao mesmo subtipo (Figura 22). Porém, estes achados sugerem que a denominação dos subtipos de BoHV-5 deva ser revista.

Tabela 7. Anotações dos genes da amostra EVI88/95 (BoHV-5).

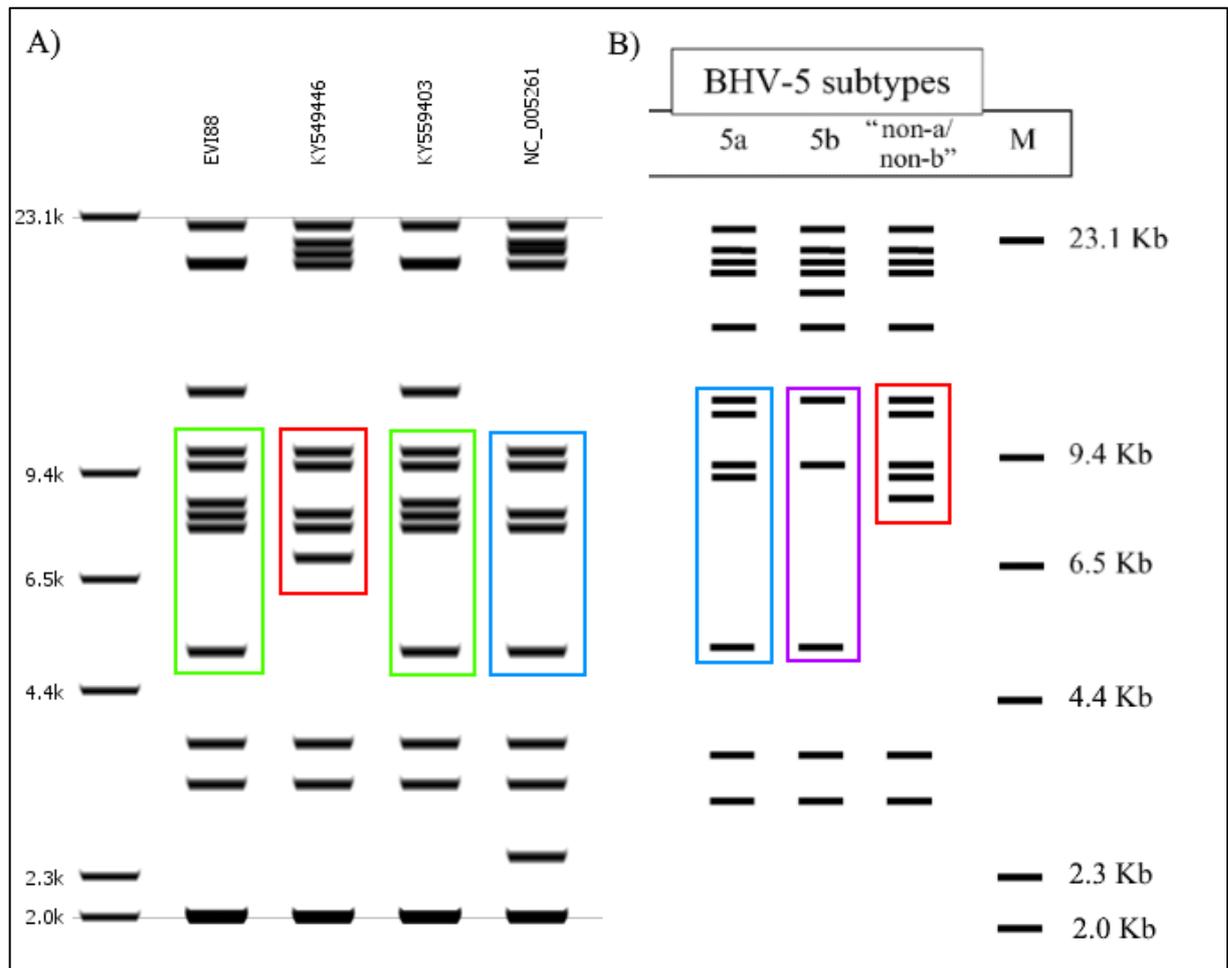
Gene	Início	Fim	Tamanho (aa)	Orientação	Predição de produto
circ	719	1,456	738	<i>forward</i>	Proteína de miristoilação do vírion
UL54	1,823	3,034	1,212	<i>reverse</i>	Regulador multifuncional de expressão
UL53	3,256	4,251	996	<i>reverse</i>	Glicoproteína K
UL52	4,226	7,483	3,258	<i>reverse</i>	Componente do complexo helicase/primase do DNA

UL51	7,482	8,270	789	<i>forward</i>	Proteína de palmitoilação
UL50	8,408	9,373	966	<i>reverse</i>	Pirofosfatase de DUT
UL49.5	9,324	9,611	288	<i>forward</i>	Glicoproteína N
UL49	9,745	10,548	804	<i>forward</i>	Proteína do tegumento
UL48	10,741	12,189	1,449	<i>forward</i>	Fator de trans
UL47	12,360	14,585	2,226	<i>forward</i>	Fosfoproteína do tegumento
UL46	14,718	16,922	2,205	<i>forward</i>	Proteína do tegumento
UL44	17,143	18,603	1,461	<i>reverse</i>	Glicoproteína C
UL43	18,792	19,934	1,143	<i>reverse</i>	Proteína de membrana
UL42	19,985	21,223	1,239	<i>reverse</i>	Fator de processividade para DNA polimerase
UL41	21,266	22,843	1,578	<i>forward</i>	Proteína <i>virion host shutoff</i> (VHS)
UL40	22,968	23,915	948	<i>reverse</i>	Pequena subunidade da ribonucleotídeo redutase
UL39	23,935	26,337	2,403	<i>reverse</i>	Grande subunidade da ribonucleotídeo redutase
UL38	26,702	28,339	1,638	<i>reverse</i>	Proteína do capsídeo
UL37	28,421	31,585	3,165	<i>forward</i>	Proteína do tegumento
UL36	31,685	41,299	9,615	<i>forward</i>	Proteína do tegumento
UL35	41,526	41,903	378	<i>reverse</i>	Proteína do capsídeo
UL34	41,948	42,778	831	<i>reverse</i>	Proteína de membrana
UL33	42,859	43,191	333	<i>reverse</i>	Proteína do empacotamento do capsídeo
UL32	43,172	44,968	1,797	<i>forward</i>	Proteína de clivagem e empacotamento
UL31	44,961	46,106	1,146	<i>forward</i>	Proteína nuclear UL34-associada
UL30	46,030	49,770	3,741	<i>reverse</i>	DNA polimerase, subunidade catalítica
UL29	50,041	53,667	3,627	<i>forward</i>	Proteína de ligação de fita simples do DNA
UL28	53,904	56,354	2,451	<i>forward</i>	Proteína de clivagem e empacotamento
UL27	56,207	59,050	2,844	<i>forward</i>	Glicoproteína B
UL26	59,560	61,419	1,860	<i>reverse</i>	Serino-protease (maturação do capsídeo)
UL26.5	59,560	60,507	948	<i>reverse</i>	Proteína-esqueleto (capsídeo)
UL25	61,524	63,335	1,812	<i>reverse</i>	Proteína de empacotamento do DNA
UL24	63,317	64,156	840	<i>reverse</i>	Proteína putativa associada a membrana
UL23	64,155	65,225	1,071	<i>forward</i>	Timidina quinase
UL22	65,342	67,888	2,547	<i>forward</i>	Glicoproteína H
UL21	68,082	69,893	1,812	<i>reverse</i>	Proteína do tegumento
UL20	69,933	70,694	762	<i>forward</i>	Proteína de membrana
UL19	70,774	74,949	4,176	<i>forward</i>	Proteína maior do capsídeo
UL18	75,056	76,006	951	<i>forward</i>	Proteína do capsídeo
UL15	76,214	81,823	2,214	<i>reverse</i>	Proteína de empacotamento e clivagem do DNA
UL17	77,474	79,597	2,124	<i>forward</i>	Proteína do tegumento
UL16	79,624	80,655	1,032	<i>forward</i>	Proteína do víron
UL14	81,886	82,560	675	<i>forward</i>	Proteína menor do tegumento
UL13	82,469	83,956	1,488	<i>forward</i>	Serina/treonina proteína quinase
UL12	83,953	85,416	1,464	<i>forward</i>	Exonuclease alcalina
UL11	85,368	85,670	303	<i>forward</i>	Proteína de miristoilação do tegumento
UL10	85,813	87,072	1,260	<i>reverse</i>	Glicoproteína M
UL9	87,193	89,664	2,472	<i>forward</i>	Proteína de ligação da origem

UL8	89,762	92,035	2,274	<i>forward</i>	Componente do complexo helicase/primase do DNA
UL7	92,092	92,997	906	<i>reverse</i>	Proteína vírion-associada
UL6	92,831	95,299	2,469	<i>reverse</i>	Proteína do vírion
UL5	95,055	97,571	2,517	<i>forward</i>	Componente do complexo helicase/primase do DNA
UL4	97,592	98,158	567	<i>forward</i>	Proteína nuclear
UL3.5	98,185	98,631	447	<i>reverse</i>	Proteína do vírion
UL3	98,637	99,290	654	<i>reverse</i>	Fosfoproteína
UL2	99,337	100,233	897	<i>reverse</i>	Uracil glicosilase
UL1	100,217	100,705	489	<i>reverse</i>	Glicoproteína L
UL0.7	100,509	101,114	606	<i>forward</i>	Produto desconhecido
LRORF2	101,663	101,818	156	<i>forward</i>	Proteína da região relacionada a latência
BICP0	101,750	103,909	2,160	<i>reverse</i>	Proteína transativadora precoce imediata com dedo de zinco (<i>zinc finger</i>)
LRORF1	102,057	103,139	1,083	<i>forward</i>	Proteína da região relacionada a latência
BICP4	105,177	109,403	4,227	<i>reverse</i>	Regulador de gene positivo e negativo
BICP22	114,275	115,201	927	<i>forward</i>	Fator de transcrição
US1.67	115,986	116,729	744	<i>reverse</i>	Proteína do vírion
US2	116,787	117,467	681	<i>reverse</i>	Proteína do tegumento
US3	117,590	118,924	1,335	<i>forward</i>	Serina/treonina proteína quinase
US4	119,032	120,354	1,323	<i>forward</i>	Glicoproteína G
US6	120,609	121,862	1,254	<i>forward</i>	Glicoproteína D
US7	122,011	123,174	1,164	<i>forward</i>	Glicoproteína I
US8	123,457	125,256	1,800	<i>forward</i>	Glicoproteína E
US9	125,348	125,752	405	<i>forward</i>	Proteína do tegumento
BICP22	126,762	127,685	924	<i>reverse</i>	Fator de transcrição
BICP4	132,546	136,778	4,233	<i>forward</i>	Regulador de gene positivo e negativo

Fonte: a própria autora

Figura 22. Análise de restrição enzimática *in silico* com *BstEII* para classificação de subtipos de BoHV-5.



A) REA utilizando *BstEII* de genomas completos de BoHV-5. B) Padrões de REA com *BstEII* segundo D'ARCE *et al.* (2002). Em azul, padrão de clivagem definido por D'ARCE *et al.* (2002) como BoHV-5 A. Em vermelho, padrão de clivagem definido por D'ARCE *et al.* (2002) como BoHV-5 C ("não A, não B"). Em roxo, padrão de clivagem da amostra A663. Em verde, padrão de clivagem das amostras EVI88 e P160 (KY559403). Fonte: a própria autora.

6. CONCLUSÃO

O enriquecimento dos genomas por *long-range* PCR desenvolvido neste trabalho resultou em uma alta especificidade das *reads* obtidas no sequenciamento, sem a necessidade de multiplicação do vírus em cultivo celular. Também, a metodologia proposta resultou na obtenção do genoma completo da amostra de BoHV-5 EVI88/95 e do genoma parcial da amostra de BoHV-1 SV609/03. Dessa forma, esta metodologia pode ser empregada como uma ferramenta rápida, de baixo custo e de alta especificidade, para obtenção de genomas de BoHV-1 e BoHV-5, contribuindo para um melhor entendimento da biologia desses herpesvírus.

REFERÊNCIAS

- ACKERMANN, M.; ANGELS, M. Pro and contra-IBR eradication. **Veterinary Microbiology**, Netherlands, v. 113. p. 293-302, 2006.
- ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F. Doenças infecciosas que impactam a reprodução de bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.41, n.1, p.133-139, 2017.
- BAI, C. M. *et al.* Long-range PCR and high-throughput sequencing of Ostreid herpesvirus indicate high genetic diversity and complex evolution process. **Virology**, 526, p. 81–90, 2019.
- BATISTA, H. B. C. R. *et al.* Herpesvírus bovinos (BoHV-1.1 e BoHV-1.2b) em forma infecciosa em encéfalos de bovinos submetidos ao diagnóstico de raiva no estado do Rio Grande do Sul. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 5, p. 1023–1028, 2010.
- BARTHA, A. *et al.* Problems concerning the taxonomy of the ‘movar-type’ bovine herpesviruses. **Intervirolgy**, v. 28, n. 1, p. 1–7, 1987.
- BENSON, D. A. *et al.* GenBank. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. Database issue, p. D36-42, 2013.
- BURTT, N. P. Whole-genome amplification using Φ 29 DNA polymerase. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2011, n. 1, p. pdb.prot5552, 2011.
- CAMPOS, F. S. *et al.* Efficacy of an inactivated, recombinant bovine herpesvirus 5 (BoHV-5) vaccine. **Veterinary Microbiology**, Netherlands, v.148, p.18-26, 2011.
- CAMPOS, F. S. *et al.* High prevalence of co-infections with bovine herpesvirus 1 and 5 found in cattle in southern Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 139, n. 1–2, p. 67–73, 2009.
- D’ARCE, R. C. F. *et al.* Restriction endonuclease and monoclonal antibody analysis of Brazilian isolates of bovine herpesviruses types 1 and 5. **Veterinary Microbiology**, v. 88, n. 4, p. 315–324, 2002.
- D’OFFAY, J. M. *et al.* Complete genome sequence of bovine herpesvirus type 1.1 (BoHV-1.1) Los Angeles (LA) strain and its genotypic relationship to BoHV-1.1 Cooper and more recently isolated wild-type field strains. **Archives of Virology**, v. 164, n. 11, p. 2843–2848, 2019.
- DEL FAVA, C.; PITUCO, E. M.; D’ANGELINO, J. L. Herpesvírus Bovino tipo 1 (HVB-1): revisão e situação atual no Brasil. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 5, n. 3, p. 300–312, 2002.
- DEL MÉDICO ZAJAC, M. P. *et al.* BHV-1 vaccine induces cross-protection against BHV-5 disease in cattle. **Research in Veterinary Science**, v. 81, n. 3, p. 327–334, dez. 2006.
- DEL MÉDICO ZAJAC, M. P. *et al.* Biology of bovine herpesvirus 5. **Veterinary Journal**, v. 184, n. 2, p. 138–145, 2010.

DELHON, G. *et al.* Genome of Bovine Herpesvirus 5. **Journal of Virology**, v. 77, n. 19, p. 10339–10347, 2003.

FERNANDES, L. G. *et al.* Spatial analysis for bovine viral diarrhea virus and bovine herpesvirus type 1 infections in the state of Paraíba, northeastern Brazil. **BMC Veterinary Research**, v. 14, n. 1, 2018.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed, 220 p. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998.

FINO, T. M. C. *et al.* Infecções por herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e suas implicações na reprodução bovina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.36, n.2, p.122-127, 2012.

FLORES, E. F.; DONIS, R. O. Isolation of a mutant MDBK cell line resistant to bovine viral diarrhea virus infection due to a block in viral entry. **Virology**, v. 208, n. 2, p. 565–575, 1995.

FRANCO, A. C.; ROEHE, P. M.; VARELA, A. P. M. Herpesviridae. *In*: FLORES, E. F. (Org.). **Virologia Veterinária**, Cap.18, p.503-570. Santa Maria: Editora UFSM, 2012.

GALIZA, G. J. N. *et al.* Diseases of the nervous system of cattle in the semiarid of Northeastern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, p. 267-276, 2010.

HENZEL, A. *et al.* Aspectos virológicos e clínico-patológicos da infecção genital aguda e latente pelo herpesvírus bovino tipo 1.2 em bezerras infectadas experimentalmente. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 3, p. 140–148, 2008.

HOULDCROFT, C. J.; BEALE, M. A.; BREUER, J. Clinical and biological insights from viral genome sequencing. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 3, p. 183–192, 2017.

HOLZ, C. L. *et al.* Soroprevalência de herpesvírus bovinos tipos 1 e/ou 5 no estado do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 9, p. 767-773, 2009.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa da Pecuária Municipal - Tabela 3939: Efetivo de rebanho por tipo de rebanho**. 2018. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3939>>. Acesso em 24 de ago. de 2021.

JIA, J. *et al.* Novel gammaherpesvirus functions encoded by bovine herpesvirus 6 (bovine lymphotropic virus). **The Journal of general virology**, v. 95, n. Pt 8, p. 1790–1798, ago. 2014.

KAHRS, R. F. **Viral Diseases of Cattle**. Iowa: Blackwell Publishing, p. 324, 2001.

KENDRICK, J. W.; GILLESPIE, J. H.; MCENTEE, K. Infectious pustular vulvovaginitis of cattle. **The Cornell Veterinarian**, v. 48, n. 4, p. 458–495, 1958.

- KETNER, G. *et al.* Efficient manipulation of the human adenovirus genome as an infectious yeast artificial chromosome clone. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 13, p. 6186–6190, jun. 1994.
- KUMAR, N. *et al.* Isolation and characterization of bovine herpes virus 5 (BoHV5) from cattle in India. **Plos One**, v. 15, n. 4, p. e0232093, 2020.
- MADIN, S. H.; YORK, C. J.; MCKERCHER, D. G. Isolation of the Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus. **Science**, v. 124, n. 3225, p. 721–722, 19 out. 1956.
- MAIDANA, S. S. *et al.* Characterization of BoHV-5 field strains circulation and report of transient specific subtype of bovine herpesvirus 5 in Argentina. **BMC Veterinary Research**, v. 7, n. 1, p. 8, 2011.
- MAIDANA, S. S. *et al.* Whole-genome analysis of one natural interspecific recombinant strain between bovine alphaherpesviruses 1 and 5. Montpellier: **Anais do Ecology and Evolution of Infectious Diseases Meeting 2021**, p. 144, 2021. Disponível em: <<https://www.eeidconference2021.org/wp-content/uploads/2021/06/A-148.pdf>>. Acesso em 14 de novembro de 2021.
- MARIN, M. S. *et al.* Concomitant infection of Neospora caninum and Bovine Herpesvirus type 5 in spontaneous bovine abortions. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 11, p. 1291–1295, 2013.
- MENDES, M. B. *et al.* Determinação da prevalência das principais doenças da reprodução no rebanho bovino da região de Uberaba – MG. **Ciência Animal Brasileira**. Goiânia, suplemento 1, Anais do VIII Congresso Brasileiro de Buiatria, 2009.
- METZLER, A. E.; SCHUDEL, A. A.; ENGELS, M. Bovine herpesvirus 1: Molecular and antigenic characteristics of variant viruses isolated from calves with neurological disease. **Archives of Virology**, v. 87, n. 3, p. 205–217, 1986.
- MEYER, G. *et al.* Comparative pathogenesis of acute and latent infections of calves with bovine herpesvirus types 1 and 5. **Archives of Virology**, v. 146, n. 4, p. 633–652, 2001.
- MORRISON, C.L. *et al.* Genomic evolution, recombination, and inter-strain diversity of chelonid alphaherpesvirus 5 from Florida and Hawaii green sea turtles with fibropapillomatosis. **PeerJ**, 2018. doi:10.7717/peerj.4386.
- MUYLKENS, B. *et al.* Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. **Veterinary Research**, v. 38, n. 2, p. 181–209, 2007.
- OLIVEIRA, R. A. M. *et al.* Prevalence of latent infection with BoHV-1 and BoHV-5 in beef cattle of Parana, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, n. 5, 2015.
- PAIM, W. P. **Sequência completa do genoma de Herpesvírus bovino 5 subtipo C**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, 2017.

- PAULI, G. *et al.* Biology and Molecular Biology of Latent Bovine Herpes Virus Type 1 (BHV-1). *In*: WITTMANN, G. *et al.* (eds) Latent Herpes Virus Infections in Veterinary Medicine. **Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science**, vol 27. Springer, Dordrecht, 1984.
- PEREZ, S. E. *et al.* Primary infection, latency, and reactivation of bovine herpesvirus type 5 in the bovine nervous system. **Veterinary Pathology**, v. 39, n. 4, p. 437–444, jul. 2002.
- QUICK, J. *et al.* Multiplex PCR method for MinION and Illumina sequencing of Zika and other virus genomes directly from clinical samples. **Nature Protocols** 12, 1261–1276, 2017.
- RISSI, D. R. *et al.* Artigo de revisão: Meningoencefalite por herpesvírus bovino-5. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n.7, p. 251-260, 2007.
- RISSI, D. R. *et al.* Epidemiologia, sinais clínicos e distribuição das lesões encefálicas em bovinos afetados por meningoencefalite por herpesvírus bovino 5. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n.2, p. 123-132, 2006.
- RODENBUSCH, C. R. *et al.* Molecular evidence of bovine herpesvirus 1 and 5 in cattle with suspected rabies in Rio Grande do Sul state, Brazil. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 73, 2020.
- ROIZMANN, B. *et al.* The family Herpesviridae: an update. The Herpesvirus Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. **Archives of Virology**, v. 123, n. 3–4, p. 425–449, 1992.
- ROSSITER, P. B. *et al.* Isolation of bovine herpesvirus-3 from African buffaloes (*Syncerus caffer*). **Research in Veterinary Science**, v. 46, n. 3, p. 337–343, 1989.
- ROSSITER, P. B.; GUMM, I. D.; MIRANGI, P. K. Immunological relationships between malignant catarrhal fever virus (Alcelaphine herpesvirus 1) and Bovine cytomegalovirus (Bovine herpesvirus 3). **Veterinary Microbiology**, v. 16, n. 3, p. 211–218, 1988.
- SANCHES, A.W.D. *et al.* Doenças do sistema nervoso central em bovinos no Sul do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.20, p.113-118, 2000.
- SANTOS, B. L. *et al.* Central nervous system disease of calves in southern Brazil: A contribution to the differential diagnosis. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 4, p. 685–691, 2018.
- SCHMIDT, G. *et al.* Number of PCR cycles and magnesium chloride concentration affect detection of tet genes encoding ribosomal protection proteins in swine manure. **Advances in Microbiology**, v. 4, n. 12, 2014.
- SILVA, A. M. *et al.* Vaccination with a gE-negative bovine herpesvirus type 1 vaccine confers insufficient protection to a bovine herpesvirus type 5 challenge. **Vaccine**, Netherlands, v. 24, p. 3313-3320, 2006.
- SILVA, F. DOS S. *et al.* Seroepidemiological Survey of Infection Bovine Herpesvirus Type 1 (BoHV-1) in Cattle in the State of Pernambuco. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 43, 2015.

SILVA, M. S. *et al.* Identificação e diferenciação de herpesvírus bovino tipos 1 e 5 isolados de amostras clínicas no Centro-Sul do Brasil, Argentina e Uruguai (1987-2006). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 10, p. 403–408, out. 2007.

SILVA, M. S. *et al.* Molecular and antigenic characterization of Brazilian bovine herpesvirus type 1 isolates recovered from the brain of cattle with neurological disease. **Virus Research**, v. 129, p. 191-199, 2007.

STRIEN, J.; SANFT, J.; MALL, G. Enhancement of PCR Amplification of Moderate GC-Containing and Highly GC-Rich DNA Sequences. **Molecular Biotechnology**, v. 54, n. 3, p. 1048–1054, 2013.

STUDDERT, M. J. Bovine Herpesvirus (Herpesviridae). *In*: **Encyclopedia of Virology**. Second Edition. Oxford: Elsevier, 1999. p. 180–184.

TOTTI, T. M. *et al.* Coinfecção por *Neospora caninum* e Herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) em feto bovino abortado: relato de caso. Erechim: Edifapes, **Anais da II Semana Acadêmica e I Mostra Científica da Medicina Veterinária**, p. 168-172, 2020.

TWEEDY, J. *et al.* Complete genome sequence of the Human Herpesvirus 6A Strain AJ from Africa resembles Strain GS from North America. **Genome Announcements**, v.3 I.1 e01498-14, 2015.

UNTERGASSER, A. *et al.* Primer3--new capabilities and interfaces. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 15, p. e115, 2012.

VOGEL, F. S. F. *et al.* Distribution of bovine herpesvirus type 5 DNA in the central nervous system of latently, experimentally infected calves. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 10, 2003.

VON AHSEN, N.; WITTEWER, C. T.; SCHÜTZ, E. Oligonucleotide melting temperatures under PCR conditions: Nearest-neighbor corrections for MG₂⁺, deoxynucleotide triphosphate, and dimethyl sulfoxide concentrations with comparison to alternative empirical formulas. **Clinical Chemistry**, v. 47, n. 11, 2001.

WRONSKI, J. G. *et al.* Outbreak of Bovine Herpetic Meningoencephalomyelitis in Southern Brazil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.46, suppl.1: 340, 2018.

YANG, B. *et al.* Gammaherpesvirus BoHV-4 infects bovine respiratory epithelial cells mainly at the basolateral side. **Veterinary Research**, v. 50, n. 1, p. 11, 2019.

YORK, C. J.; SCHWARZ, A. J. F.; ESTELA, L. A. Isolation and Identification of Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus in Tissue Culture. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 94, n. 4, p. 740–744, 1 abr. 1957.

APÊNDICE A

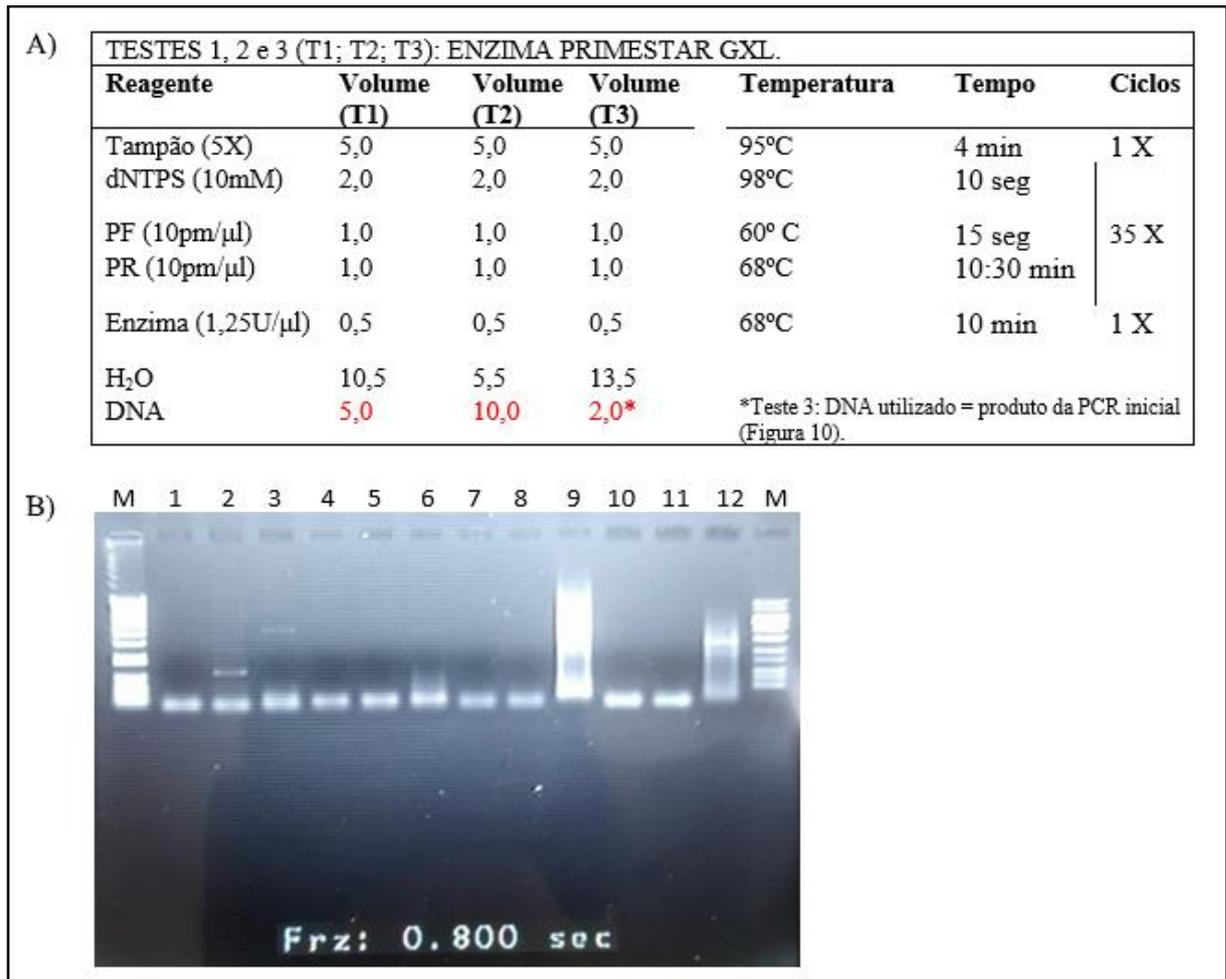
Figura 1. Testes iniciais de amplificação, utilizando as enzimas PrimeSTAR GXL (Takara Bio) e Phusion High-Fidelity (Thermo Fisher Scientific).

A) TESTE INICIAL: ENZIMA PRIMESTAR GXL				
Reagente	Volume	Temperatura	Tempo	Ciclos
Tampão (5X)	5,0	95°C	4 min	1 X
dNTPS (10mM)	2,0	98°C	10 seg	
PF (10pm/μl)	1,0	60° C	15 seg	35 X
PR (10pm/μl)	1,0	68°C	10:30 min	
Enzima (1,25U/μl)	0,5	68°C	10 min	1 X
H ₂ O	13,5			
DNA	2,0			
TESTE INICIAL: ENZIMA PHUSION HIGH FIDELITY				
Reagente	Volume	Temperatura	Tempo	Ciclos
Tampão (5X)	4,0	95°C	4 min	1 X
DMSO	0,6	98°C	30 seg	
dNTPS (10mM)	1,0	60° C	30 seg	35 X
PF (10pm/μl)	1,0	72°C	5:30 min	
PR (10pm/μl)	1,0	72°C	10 min	1 X
Enzima (1,25U/μl)	0,2			
H ₂ O	10,2			
DNA	2,0			

B)													
M	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	M

A) Condições iniciais recomendadas pelos fabricantes das enzimas PrimeSTAR GXL (Takara Bio) e Phusion High Fidelity (Thermo Fisher Scientific), respectivamente. B) Eletroforese em gel de agarose dos testes de amplificação com as enzimas PrimeSTAR GXL (Takara Bio) e Phusion High-fidelity (Thermo Fisher Scientific) - M: Marcador de 1.000pb; 1: P1 BoHV-1 Phusion; 2: P1 BoHV-1 PrimeSTAR GXL; 3: P7 BoHV-1 Phusion; 4: P7 BoHV-1 PrimeSTAR GXL; 5: P8 BoHV-1 Phusion; 6: P8 BoHV-1 PrimeSTAR GXL; 7: P5 BoHV-5 Phusion; 8: P5 BoHV-5 PrimeSTAR GXL; 9: P7 BoHV-5 Phusion; 10: P7 BoHV-5 PrimeSTAR GXL; 11: P10 BoHV-5 Phusion; 12: P10 BoHV-5 PrimeSTAR GXL. Fonte: a própria autora.

Figura 2. Testes 1, 2 e 3 de parâmetros de reação com enzima PrimeSTAR GXL (Takara Bio), alterando a quantidade de DNA molde.



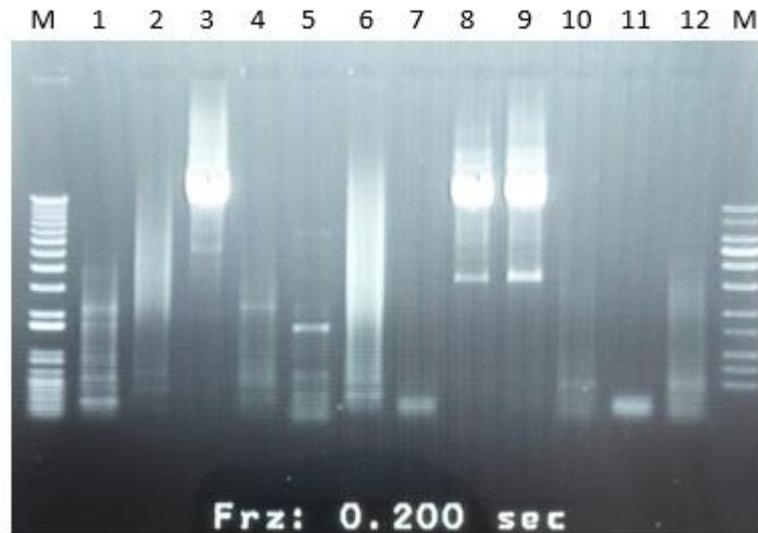
A) Condições de reação; em vermelho indicando a alteração na quantidade de DNA. B) M: Marcador de 1.000pb; 1: P1 BoHV-1 T1; 2: P1 BoHV-1 T2; 3: P1 BoHV-1 T3; 4: P7 BoHV-1 T1; 5: P7 BoHV-1 T2; 6: P7 BoHV-1 T3; 7: P5 BoHV-5 T1; 8: P5 BoHV-5 T2; 9: P5 BoHV-5 T3; 10: P7 BoHV-5 T1; 11: P7 BoHV-5 T1; 12: P7 BoHV-5 T3. Fonte: a própria autora.

Figura 3. Testes 7, 8 e 9 de parâmetros de reação com enzima PrimeSTAR GXL (Takara Bio), adicionando MgCl₂ e alterando a quantidade de dNTPs.

A) TESTE 7: ADIÇÃO DE MgCl ₂ , ENZIMA PRIMESTAR GXL					
Reagente	Volume	Temperatura	Tempo	Ciclos	
Tampão (5X)	5,0	95°C	4 min	1 X	
MgCl ₂	0,5				
dNTPS (10mM)	2,0	98°C	10 seg		
PF (10pm/μl)	1,0	60° C	15 seg	35 X	
PR (10pm/μl)	1,0	68°C	5 min		
Enzima (1,25U/μl)	1,0	68°C	10 min	1 X	
H ₂ O	12,5				
DNA	2,0				
B) TESTE 8: ALTERAÇÃO NA QUANTIDADE DE dNTPs, ENZIMA PRIMESTAR GXL					
Reagente	Volume	Temperatura	Tempo	Ciclos	
Tampão (5X)	5,0	95°C	4 min	1 X	
dNTPS (10mM)	2,5	98°C	10 seg		
PF (10pm/μl)	1,0	60° C	15 seg	35 X	
PR (10pm/μl)	1,0	68°C	5 min		
Enzima (1,25U/μl)	1,0	68°C	10 min	1 X	
H ₂ O	14,5				
DNA	2,0				
C) TESTE 9: ADIÇÃO DE MgCl ₂ E dNTPs, ENZIMA PRIMESTAR GXL					
Reagente	Volume	Temperatura	Tempo	Ciclos	
Tampão (5X)	5,0	95°C	4 min	1 X	
MgCl ₂	0,5				
dNTPS (10mM)	2,5	98°C	10 seg		
PF (10pm/μl)	1,0	60° C	15 seg	35 X	
PR (10pm/μl)	1,0	68°C	5 min		
Enzima (1,25U/μl)	1,0	68°C	10 min	1 X	
H ₂ O	14,0				
DNA	2,0				

A) Condições de reação do teste 7; em vermelho adição de 0,5 μl de MgCl₂. B) Condições de reação do teste 8; em vermelho adição de 0,5 μl de dNTPs. C) Condições de reação do teste 9; em vermelho adição de 0,5 μl de dNTPs e de 0,5 μl de MgCl₂. Fonte: a própria autora.

Figura 4. Gel de agarose com resultados dos testes 4 a 9.



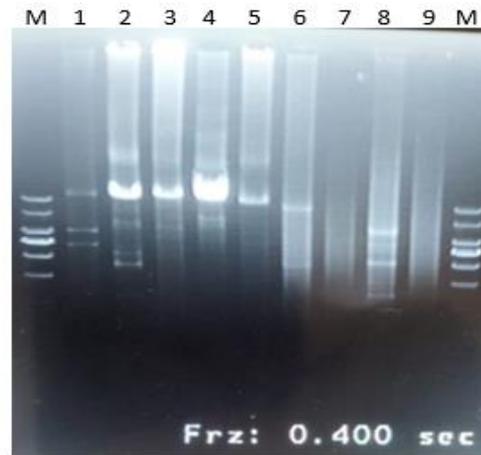
M: Marcador de 1.000pb; 1: P1 BoHV-1 T4; 2: P1 BoHV-1 T5; 3: P1 BoHV-1 T6 (positivo); 4: P1 BoHV-1 T7; 5: P1 BoHV-1 T8; 6: P1 BoHV-1 T9; 7: P7 BoHV-1 T4; 8: P7 BoHV-1 T5 (positivo); 9: P7 BoHV-1 T6 (positivo); 10: P7 BoHV-1 T7; 11: P7 BoHV-1 T8; 12: P7 BoHV-1 T9. Fonte: a própria autora.

Figura 5. Amplificação de fragmentos de 10 mil pares de bases de BoHV-1, utilizando 7% de DMSO.



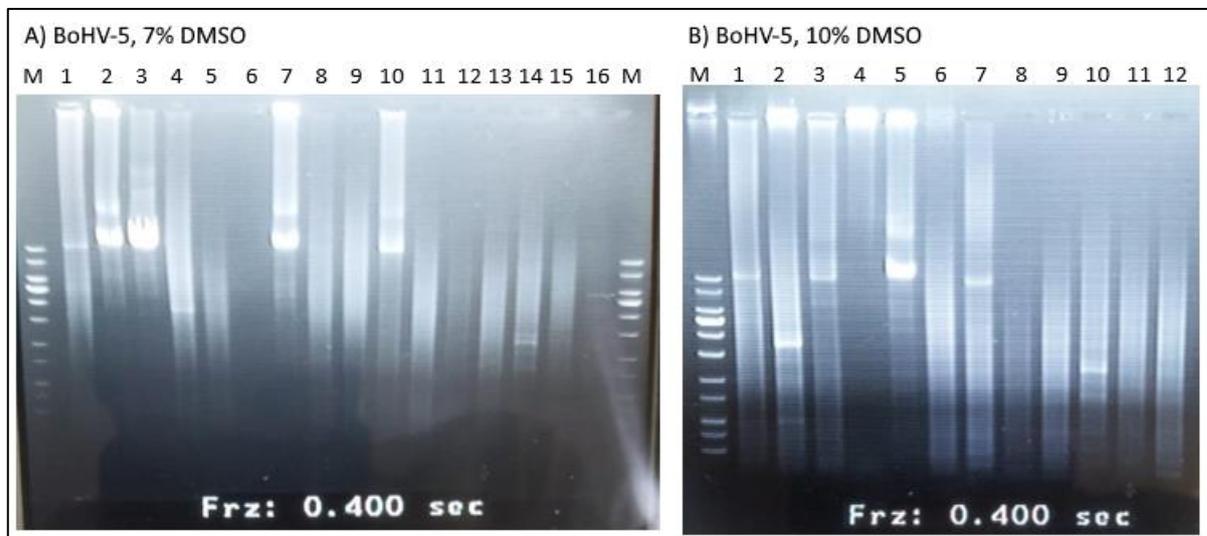
M: Marcador de 1.000pb; 1: P2 BoHV-1 (positivo); 2: P3 BoHV-1 (positivo); 3: P4 BoHV-1; 4: P5 BoHV-1; 5: P6 BoHV-1; 6: P8 BoHV-1 (positivo); 7: P9 BoHV-1; 8: P10 BoHV-1 (positivo); 9: P11 BoHV-1; 10: P12 BoHV-1; 11: P13 BoHV-1; 12: P14 BoHV-1; 13: P15 BoHV-1 (positivo). Fonte: a própria autora.

Figura 6. Amplificação de fragmentos de 10 mil pares de bases de BoHV-1, utilizando 10% de DMSO.



M: Marcador de 1.000pb; 1: P4 BoHV-1 (positivo); 2: P5 BoHV-1 (positivo); 3: P6 BoHV-1 (positivo); 4: P9 BoHV-1 (positivo); 5: P10 BoHV-1 (positivo); 6: P11 BoHV-1; 7: P12 BoHV-1; 8: P13 BoHV-1; 9: P14 BoHV-1. Fonte: a própria autora.

Figura 7. Amplificação de fragmentos de 10 mil pares de bases de BoHV-5, utilizando 7 e 10% de DMSO.



A) Gel de agarose, amplificação de fragmentos de 10 mil pares de bases de BoHV-5, utilizando 7% de DMSO - M: marcador 1000 pb; 1: P1 BoHV-5; 2: P2 BoHV-5 (positivo); 3: P3 BoHV-5 (positivo); 4: P4 BoHV-5; 5: P5 BoHV-5; 6: P6 BoHV-5; 7: P7 BoHV-5 (positivo); 8: P8 BoHV-5; 9: P9 BoHV-5; 10: P10 BoHV-5 (positivo); 11: P11 BoHV-5; 12: P12 BoHV-5; 13: P13 BoHV-5; 14: P14 BoHV-5; 15: P15 BoHV-5; 16: P16 BoHV-5. B) Gel de agarose, amplificação de fragmentos de 10 mil pares de bases de BoHV-5, utilizando 10% de DMSO - M: marcador 1000 pb; 1: P1 BoHV-5 (positivo); 2: P4 BoHV-5; 3: P5 BoHV-5 (positivo); 4: P6 BoHV-5; 5: P8 BoHV-5 (positivo); 6: P9 BoHV-5; 7: P11 BoHV-5 (positivo); 8: P12 BoHV-5; 9: P13 BoHV-5; 10: P14 BoHV-5; 11: P15 BoHV-5; 12: P16 BoHV-5. Fonte: a própria autora.

Figura 8. Teste 12 de parâmetros de reação, utilizando protocolo de reação em duas etapas para ampliações de fragmentos de 20 mil pares de bases.

A)

TESTE 12: AMPLIFICAÇÕES DE 20KB, REAÇÃO EM DUAS ETAPAS				
Reagente	Volume (I5)	Temperatura	Tempo	Ciclos
Tampão (5X)	5,0	95°C	4 min	1 X
DMSO	2,5			
dNTPS (10mM)	2,0	98°C	10 seg	30 X
PF (10pm/μl)	1,0			
PR (10pm/μl)	1,0	68°C	7 min	
Enzima (1,25U/μl)	1,0	68°C	10 min	1 X
H ₂ O	10,5			
DNA	2,0			

B)

A) Condições de reação do teste 12, para amplificação de fragmentos de 20 mil pares de bases, utilizando protocolo de reação em duas etapas. B) Gel de agarose, todas as amostras negativas - M: marcador 1000 pb; 1: *primer forward* (PF) 11 + *primer reverse* (PR) 12 BoHV-1; 2: PF12 + PR13 BoHV-1; 3: PF13 + PR14 BoHV-1; 4: PF14 + PR15 BoHV-1; 5: PF3 + PR4 BoHV-5; 6: PF5 + PR6 BoHV-5; 7: PF8 + PR9 BoHV-5; 8: PF11 + PR12 BoHV-5; 9: PF12 + PR13 BoHV-5.