

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**ISOLAMENTO VIRAL E DIAGNÓSTICO  
MOLECULAR DE HERPESVÍRUS CANINO**

**JACQUELINE KAZUE KURISSIO**

BOTUCATU-SP  
JUNHO 2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**ISOLAMENTO VIRAL E DIAGNÓSTICO  
MOLECULAR DE HERPESVÍRUS CANINO**

**JACQUELINE KAZUE KURISSIO**

Dissertação apresentada junto ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Medicina Veterinária para obtenção  
do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. João Pessoa  
Araújo Júnior.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Kurissio, Jacqueline Kazue.

Isolamento viral e diagnóstico molecular de herpesvírus canino /Jacqueline  
Kazue Kurissio. - Botucatu, 2013

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de  
Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: João Pessoa Araújo Júnior

Capes: 50502034

1. Vírus do herpes em animais. 2. Cão – Doenças. 3. Reação em cadeia de  
polimerase. 4. Herpesvírus – Diagnóstico. 5. Vírus – Isolamento.

Palavras-chave: Cães; Carga viral; Diagnóstico; Herpesvírus; HVC-1;  
Isolamento viral; PCR; Titulação viral; Vírus.

Nome do Autor: Jacqueline Kazue Kurissio  
Título: **ISOLAMENTO VIRAL E DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE  
HERPESVÍRUS CANINO**

## COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. João Pessoa Araújo Júnior  
Presidente e Orientador  
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública  
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. José Paes de Oliveira Filho  
Membro  
Departamento de Clínica Veterinária  
FMVZ-UNESP - Botucatu

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Clarice Weis Arns  
Membro  
Departamento de Evolução, Genética e Bioagentes  
IB-UNICAMP-Campinas

Data da Defesa: 17 de junho de 2013.

## Dedicatória

À minha família, pela força, dedicação e compreensão de todos e por sempre permanecermos unidos mesmo estando longe um dos outros.

## Agradecimentos

Primeiramente a Deus, por sempre iluminar o meu caminho. À São Miguel Arcanjo pela sua guarda e proteção e à Nossa Senhora por me amparar nos momentos difíceis.

Aos meus pais e irmãos por sempre me apoiarem em minhas decisões e pela confiança que sempre depositam em mim.

À Taís e Sueli pela paciência e compreensão, durante todo o período em que passamos até tarde no laboratório. Grata pelas amizades para vida toda, aprendi muito...

Aos amigos de todas as horas Ricardo e Marianna, grata pela força e compreensão.

Aos companheiros do laboratório Micheli, Lidiany, Eduardo (Duroc), Ariani, Cláudia, Vanessa, Viviam, Leila, Marina (Poca) e Elaine (Ploc) pelo apoio, solidariedade e companheirismo, durante a execução do projeto e para que fosse concluído.

Aos donos de canis, proprietários e funcionário que permitiram e auxiliaram a coleta das amostras do projeto.

A todos do Departamento de Microbiologia e Imunologia, pela acolhida e disposição em sempre ajudar nos momentos de necessidade.

Ao prof. João Pessoa que aceitou o desafio e acreditou no projeto até o fim. Apesar dos obstáculos e das muitas dificuldades, esteve sempre presente e otimista. E pela oportunidade de desenvolver e dar condições para que o trabalho fosse realizado.

## Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de Mestrado (processo 2011/04795-2).

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Martin Luther King)

## LISTA DE QUADROS

<b>QUADRO 1</b> - Oligonucleotídeos para HVC-1 testados .....	13
<b>QUADRO 2</b> - Comparação entre a sensibilidade analítica da qPCR para TK e gB.....	27
<b>QUADRO 3</b> - Quantificação da carga viral das amostras positivas .....	35

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b> - Os países onde foram realizados os levantamentos de soroprevalência de HVC-1 e a taxa de soropositividade.....	4
<b>TABELA 2</b> - Localidades onde foi realizada as coletas das amostras.....	11
<b>TABELA 3</b> - Dados das amostras coletadas e o número de amostras positivas .....	34
<b>TABELA 4</b> - Dados e procedência dos animais cujas amostras foram positivas .....	34
<b>TABELA 5</b> - A carga viral das diluições nas três técnicas de titulação pela qPCR. ....	44

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b> - Países onde foram detectados a presença do herpesvírus canino. .....	5
<b>FIGURA 2</b> - Produtos de amplificação de snPCR de fragmentos de órgãos submetidos à eletroforese. ....	25
<b>FIGURA 3</b> - Gel de agarose da reação de seminested (produto de 169 pb). ...	25
<b>FIGURA 4</b> - Gel de agarose de produto da <i>Seminested</i> PCR de DNA de fragmento de rim diluído em pool de matriz. ....	26
<b>FIGURA 5</b> - Curvas de amplificação do teste de sensibilidade analítica para TK e gB do HVC-1. ....	28
<b>FIGURA 6</b> - Curva da dissociação com base na temperatura de <i>melting</i> ( $T_m$ ) resultante do teste de sensibilidade analítica. ....	29
<b>Figura 7</b> - Gráfico da curva padrão das reações de sensibilidade analítica.....	30
<b>Figura 8</b> - Curva de amplificação com DNA plasmidial recombinante. ....	31
<b>FIGURA 9</b> - Avaliação da curva de dissociação em relação a $T_m$ . ....	32
<b>FIGURA 10</b> - Gráfico da Curva padrão absoluta com DNA do plasmídeo recombinante. ....	32
<b>FIGURA 11</b> - Cultura de células infectadas com HVC-1 com efeitos citopáticos .....	37
<b>FIGURA 12</b> - Cultura de células MDCK infectadas HVC-1 corada com Romanovski tipo May-Grunwald-Giemsa. ....	38
<b>FIGURA 13</b> - Vírions do HVC-1 visualizando as estruturas virais na microscopia eletrônica de transmissão .....	41
<b>FIGURA 14</b> - Nucleocapsídeos em nucleoplasma celular .....	41
<b>FIGURA 15</b> - Presença de vesículas contendo partículas virais intranuclear e citoplasmática. ....	42
<b>FIGURA 16</b> - Vírions em vesículas, com nucleocapsídeo denso com conteúdo genômicos viral.....	42
<b>FIGURA 17</b> - Vírions invaginados na membrana citoplasmática. ....	43

## LISTA DE ABREVIATURAS

µg: microgramas

µL: microlitros

µM: micromolar

CaCl<sub>2</sub>: Cloreto de cálcio

cDNA: *complementary deoxyribonucleic acid* (ácido dexorribonucléico complementar)

CO<sub>2</sub>: Dióxido de Carbono

CT: *Cycle Threshold*

°C: temperatura Celsius

DKTC: *Dog Kidney Tissue Culture*

DICT<sub>50</sub>: Dose infectante em Células de Tecido em 50% das culturas de células inoculadas

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: *Deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucléico)

*E.coli: Escherichia coli*

EDTA: *Ethylenediamine tetraacetic acid* (ácido etilenodiamino tetra- acético)

ELISA: *Enzyme-linked Immunosorbent assay*

gB: glicoproteína B

HVC-1: herpesvírus canino tipo 1

IFA: *Indirect immunofluorescence antibody*

IFD: Imunofluorescência Direta

IPTG: Isopropil beta-tiogalactopiransídeo

KCL: Cloreto de Potássio

KC<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>: Acetato ou etanoato de potássio

LB: Luria-Bertani

mL: mililitro

mg: miligrama

MDCK: *Madin Darby Canine Kidney*

MET: Microscopia Eletrônica de Transmissão  
MgCl<sub>2</sub>: Cloreto de Magnésio  
mmol/L: milimoles por litro  
MnCl<sub>2</sub>: Cloreto de Manganês  
MO: Microscopia Óptica  
NaMOPS: ácido 3-[N-morpholino] propanesulfônico de sódio  
nPCR: *nested Polymerase Chain Reaction*  
nm: nanômetros  
pb: pares de bases  
PBS: *Phosphate Buffered Saline* (tampão fosfato)  
PCR: *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)  
pmol: picomols  
pH: potencial Hidrogeniônico  
qPCR: *quantitative Polymerase Chain Reaction*  
rpm: rotações por minuto  
SFB: Soro Fetal Bovino  
SM: Submandibular  
SNC: Sistema Nervoso Central  
SN: *seminested*  
snPCR: *seminested Polymerase Chain Reaction*  
TK: *Thymidine Kinase* (timidina quinase)  
TM: Temperatura de *Melting*  
UI: Unidades Internacionais  
VNab: *Virus neutralizing by antibodies* (vírus neutralização por anticorpos)  
VP-SFM: *Virus Production–Serum Free Medium*  
Xgal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactopiranosídeo

## SUMÁRIO

1. Introdução e Revisão de Literatura.....	1
1.1. Introdução.....	1
1.2. Herpesvírus.....	1
1.3. Epidemiologia.....	3
1.4. Patogenia e sinais clínicos.....	6
1.5. Diagnóstico.....	7
1.6. Controle e Profilaxia.....	8
2. Objetivos.....	10
3. Material e Métodos.....	11
3.1. Amostras biológicas.....	11
3.1.1. Localidades.....	11
3.1.2. Fluidos corpóreos.....	11
3.1.3. Fragmentos de órgãos.....	12
3.2. Extração de DNA total.....	12
3.3. Amplificação de DNA.....	12
3.3.1. Amplificação do fragmento do gene que codifica a proteína da Timidina quinase através da Seminested PCR.....	13
3.3.2. Amplificação do fragmento do gene que codifica a proteína da Timidina quinase pela qPCR.....	14
3.3.3. Amplificação do fragmento do gene que codifica a glicoproteína B envelope viral através da qPCR.....	15
3.3.4. Determinação da sensibilidade analítica.....	15
3.3.5. Avaliação da especificidade analítica.....	16
3.4. Método da Curva Padrão para Quantificação Absoluta.....	16
3.4.1. Clonagem do fragmento do gene da Timidina quinase.....	16
3.4.1.1. Preparo das células competentes.....	16
3.4.2. Quantificação absoluta.....	18
4. Isolamento Viral.....	18
4.1. Preparo das células infectadas e coloração.....	19
5. Microscopia eletrônica de Isolado viral em células MDCK.....	20
6. Titulação viral por Diluição limitante.....	20
6.1. Titulação Viral em placas com células MDCK com Meio DMEM e Soro fetal bovino.....	21
6.2. Titulação Viral em placas com células MDCK com Meio VP-SFM (livre de soro fetal bovino).....	21
6.3. Titulação viral de HVC-1 em tubos.....	22
7. Resultados e Discussão.....	24
7.1. Amplificação da snPCR para HVC-1.....	24
7.2. Avaliação e desempenho da sensibilidade da snPCR.....	26
7.3. Avaliação e desempenho da sensibilidade da qPCR.....	26
7.4. Amostras.....	33
7.4.1. Determinação da carga viral das amostras positivas.....	35
7.4.2. Sequenciamento das amostras positivas.....	36
7.5. Isolamento viral de tecido renal.....	36
7.6. Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	39
7.7. Titulação Viral.....	43
8. Conclusões.....	45

9. Referências Bibliográficas .....	46
10. Trabalho para ser enviado à revista <i>Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science</i> .....	53
Isolamento viral e identificação molecular do herpesvírus canino .....	53
Resumo.....	53
Abstract.....	54
Introdução.....	54
Material e Métodos .....	56
Amostra.....	56
Isolamento Viral .....	56
Microscopia eletrônica de Transmissão .....	57
<i>Seminested</i> da Reação em Cadeira pela Polimerase (snPCR).....	58
Titulação Viral .....	58
Resultados .....	59
Isolamento e Titulação Viral.....	59
Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	61
<i>Reação de seminested PCR (snPCR)</i> .....	64
Discussão.....	66
Conclusões.....	68
Referências .....	69

KURISSIO, J.K. **Isolamento viral e diagnóstico molecular de herpesvírus canino**. Botucatu, 2013, 72 p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

## Resumo

O herpesvírus canino (HVC-1) causa doença infecto-contagiosa que acomete cães em todo o mundo. É considerado o responsável por causar problemas reprodutivos, respiratórios, oculares, alterações neurológicas podendo levar à morte neonatos e adultos imunossuprimidos. Assim, o presente trabalho teve como objetivos isolar o HVC-1 a partir de amostras biológicas, padronizar uma técnica diagnóstica para detecção do herpesvírus canino, verificar a presença de cães infectados no estado de São Paulo e comparar 3 modificações na técnica de diluição limitante em relação à quantificação molecular pela qPCR (*quantitative Polymerase Chain Reaction*). Para isso, foram coletadas 139 amostras sangue, fragmentos de órgãos de 12 neonatos que foram a óbito e 5 amostras de suabes de secreção genital, de animais provenientes de canis e domicílios. Após a obtenção do DNA das amostras colhidas, foram submetidas à qPCR e snPCR (*seminested Polymerase Chain Reaction*) para o teste de detecção do HVC-1. Foi encontrada positividade em nove foram amostras de sangue e em fragmentos de órgãos de um animal, as amostras de secreções genitais foram todas negativas. O isolamento viral foi realizado a partir de fragmento de rim. As células infectadas apresentaram efeitos citopáticos compatíveis com as do HVC-1. As amostras positivas foram sequenciadas apresentando identidade de 100% com o HVC-1 (*Genbank*™: X75765). As técnicas moleculares para a detecção do agente mostraram-se sensíveis e específicas, tanto a snPCR como a qPCR. Nessas técnicas foi possível detectar até 15,35 cópias/  $\mu$ L de DNA de amostras de sangue e 1,15 cópias/ $\mu$ g de tecido. O uso de técnicas moleculares possibilitou a detecção de infecções ativas por HVC-1 com ótimo limiar de detecção. No entanto, mais estudos são necessários para conhecer a epidemiologia da infecção do HVC-1 na população canina no Brasil.

Palavras chaves: Herpesvírus canino, diagnóstico, cão, qPCR; snPCR, isolamento viral.

KURISSIO, J. K. **Viral isolation and molecular diagnosis of canine herpesvirus**. Botucatu, 2013, 72 p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

## **Abstract**

The canine herpesvirus (CHV-1) causes contagious disease affecting dogs worldwide. It is considered the responsible for cause reproductive problems, respiratory, eyes, neurologic changes may lead to death newborns and immunocompromised adults. Therefore, our study aimed to isolate CHV-1 from biological samples, standardize a diagnostic techniques for the detection of canine herpesvirus, verify the presence of infected dogs in São Paulo state and compare three modifications in the technique of limiting dilution in relation to molecular quantification to qPCR (by quantitative PCR to determine the viral titer). Thus, we collected 139 blood samples, organ's fragments from 12 neonates death and 5 genital secretions samples with swabs of animals from kennels and households. After obtaining the DNA from samples were accomplished the qPCR (quantitative PCR) and snPCR (seminested PCR) assay for detection of CHV-1. It was found positivity in nine blood sample and organ's fragments of an animal, the genital secretions samples were all negative. The viral isolation was performed from kidney. The infected cells showed cytopathic effects compatible with the CHV-1. Positive samples were sequenced showed 100% identity with the CHV-1 (Genbank™: X75765). The molecular techniques for detection agent were sensitive and specific, both the snPCR as the qPCR. In these techniques was enabled to detect DNA 15.35 copies/mL of blood samples and 1.15 copies/ $\mu$ g of tissue. The use of molecular techniques allowed the detection active infections of of HCV-1 with optimal detection limit. More studies are needed to understand the infection epidemiology of CHV-1 in the canine population in Brazil.

Keys words: canine herpesvirus, diagnosis, qPCR, snPCR; viral isolation, virus.





# 1. Introdução e Revisão de Literatura

## 1.1. Introdução

A detecção e identificação de vírus em amostras clínicas em cultivo celular constituíram uma das primeiras formas de identificação viral. A propagação do agente em cultura de células permite que pequenas quantidades de partículas virais sejam detectadas, amplificadas e caracterizadas. O isolamento em cultivo celular é considerado a prova ouro em alguns diagnósticos virológicos (BLUM e WEIBLEN, 2007). O advento da PCR possibilitou a detecção dos agentes, de forma rápida e sensível de amostras clínicas (VRIONI et al., 2007). Principalmente em relação ao tempo e custo, e em se tratando de alguns agentes, em que o seu isolamento é fastidioso e depende de vários fatores para o seu crescimento em meios de culturas celulares (LELAND e LANDRY, 2010). Mesmo que o isolamento ocorra com sucesso dependerá de técnicas moleculares ou outros métodos para confirmar a sua identificação.

A infecção pelo herpesvírus canino é considerada uma enfermidade endêmica em muitos países, onde estudos realizados comprovam a sua existência e persistência em animais infectados (LEDBETTER, 2013). No Brasil, foram confirmados apenas dois casos da infecção e óbitos nesses animais infectados (ÁVILA et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2011). A baixa casuísta pode ser devida a poucas técnicas diagnósticas disponíveis para detectar a infecção. A falta de diagnósticos em animais infectados pode prejudicar o controle e prevenção da doença, contribuindo para a propagação do agente entre os indivíduos susceptíveis.

## 1.2. Herpesvírus

A família *Herpesviridae* inclui os vírus isolados de vários hospedeiros incluindo peixes, anfíbios, aves, mamíferos e alguns invertebrados (THIRY et

al., 2007). Baseado em características biológicas, tropismo tecidual e organização genômica, os herpesvírus são classificados em três subfamílias: *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* e *Gammaherpesvirinae* (KARLIN, et al., 1994).

Os herpesvírus incluídos na subfamília dos alphaherpesvírus apresentam uma variabilidade de espécies de hospedeiros, com ciclo replicativo curto, rápida disseminação em cultura, destruição eficiente das células infectadas e capacidade de estabelecer infecções latentes em gânglios sensoriais (ROIZMANN et al., 1992; SPEAR e LONGNECKER, 2003). Muitos alphaherpesvírus seguem uma via de infecção primária em células epiteliais de mucosa ou trato respiratório variando quanto à infectividade no hospedeiro natural. Em seguida, deixam estes sítios para invadir o sistema nervoso periférico (SNP), estabelecendo a infecção latente, nos quais podem ocorrer episódios recorrentes e leves da doença (HONESS e WHATSON, 1977; ROIZMANN et al., 1993). A entrada do herpesvírus é um processo complexo, portanto requer múltiplas glicoproteínas e cada qual é multifuncional. Cada glicoproteína pode se ligar a múltiplos receptores, interagindo com outras glicoproteínas e /ou alterar a conformação e induzir a fusão de membrana (CONNOLLY et al., 2011; JONHSON e BAINES, 2011; METTENLEITER, 2004). As proteínas que determinam a virulência pelos alfaherpesvírus são as glicoproteínas do envelope, as enzimas codificadas pelo vírus (timidina quinase, ribonucleotideo redutase, proteína quinase e exonuclease alcalina) e as proteínas do capsídeo. A enzima timidina quinase (TK) foi o primeiro fator de virulência reconhecido em herpesvírus (ZANELLA e FLORES, 1995).

Dentro da subfamília *Alphaherpesvirinae* encontram-se os gêneros *Simplexvirus* e *Varicellovirus*.

Os membros do gênero *Varicellovirus* são amplamente encontrados em hospedeiros mamíferos. Alguns podem ter reação cruzada sorologicamente, indicando relações antigênicas entre estes vírus (MANNING et al., 1988; KING et al, 2012).

O herpesvírus canino é um dos membros do gênero *Varicellovirus*. O HVC-1 foi primeiramente, isolado em cultura de célula primária, cultivada de neonatos com infecção aguda, que apresentaram alterações hemorrágicas (CARMICHAEL et al., 1965). Em outros relatos, foram observadas alterações

citopáticas de forma espontânea em cultura de célula primária DKTC (*Dog Kidney Tissue Culture*) de cães aparentemente saudáveis. Essas alterações foram identificadas como sendo devido ao HVC-1 (SPERTZEL et al., 1965; SMITH et al., 1970). A partir destes achados, outros estudos surgiram correlacionando o HVC-1 a infecções causando problemas reprodutivos, respiratórias, oculares e morte neonatal (CARMICHAEL et al, 1969; POSTE, 1972; RONSSE et al, 2004; VERSTEGEN et al., 2008; LEDBETTER et al., 2009; KAWAKAMI et al., 2010).

Os vírions são envelopados, variando de 120 a 300nm de diâmetro e genoma total de 128 Kilobases (LUST et al., 1974). O HVC-1 contém DNA de fita dupla, dentro de um capsídeo icosaédrico e uma camada de material amorfo, o tegumento, localizado entre o envelope e o capsídeo (ROIZMANN et al., 1992).

O HVC-1, como os alphaherpesvírus, apresentam dois ciclos replicativos distintos: a infecção aguda (ciclo lítico) e a infecção latente. A replicação lítica ocorre nos locais de penetração do vírus no hospedeiro (vias oronasais e genitais) e em neurônios (MIYOSHI et al., 1999). A infecção latente ocorre principalmente em neurônios de gânglios sensoriais (principalmente trigêmio e lombossacrais) e órgãos linfóides. Nesse caso, ocorre interrupção do ciclo replicativo, não havendo a expressão gênica, produção de proteínas virais, replicação do genoma ou da progênie viral, podendo permanecer inativo no núcleo dos neurônios por toda a vida do animal (FRANCO e ROEHE, 2007).

### **1.3. Epidemiologia**

A infecção pelo HVC-1 está distribuída mundialmente em cães domésticos e canídeos selvagens. Infecções adquiridas naturalmente em cães são relatadas em todo o mundo e consideradas endêmicas em muitos países (RONSSE et al., 2004).

O HVC-1 não é estável no ambiente, por se tratar de um vírus envelopado, são rapidamente inativados por fatores físicos e/ou químicos ambientais. No entanto, podem ser mantidos na natureza pela sua persistência

em hospedeiros caninos e serem disseminados diretamente pelos animais infectados (BLUM e WEIBLEN, 2007; GREENE, 2012).

A transmissão do HVC-1 pode ocorrer pelo contato direto ou indireto dos neonatos com secreções oronasais e vaginais durante ou logo após o parto, ou ainda, pela via transplacentária no período gestacional (RONSSE et al., 2005).

Entre os cães, o HVC-1 pode ser eliminado pelas vias oronasal, genital e orogenital (RONSSE et al., 2005).

Em levantamentos de soroprevalência, a detecção de anticorpos contra HVC-1 demonstra a presença do agente de forma cosmopolita, a figura 1 indica os países onde foi detectado a presença do HVC-1 e estudos realizados de soroprevalência do agente. Em alguns países, foram observados índices elevados de animais positivos em relação à detecção de anticorpos. A tabela 1 apresenta os países em que foram realizados estudo de levantamento de soroprevalência do HVC-1 (LEDBETTER, 2013). E ainda, acrescentando aos dados da tabela 1, o levantamento realizado na Lituânia por MUSAYEVAL, et al., 2013 em que obtiveram soropositividade em 85 % em animais de canis e 15% em domiciliados, e SEO et al. (1994), que verificaram média de 37% de soroprevalência na Coreia do Sul (variando de 18 até 70% dependendo da região avaliada).

**TABELA 1** - Os países onde foram realizados os levantamentos de soroprevalência de HVC-1 e a taxa de soropositividade.

<b>País</b>	<b>Soroprevalência de HVC-1</b>
 Suécia	100%
 Reino Unido	93-94%
 Finlândia	82%
 Noruega	80%
 Turquia	39-72%
 Bélgica	46-50%
 França	43%
 Holanda	42%
 Eslováquia	36%
 Itália	28%
 Japão	22-26%
 Argentina	23%
 Irã	21%
 Suíça	19%
 <i>Estados Unidos</i>	6%

Fonte: (LEDBETTER, 2013).



**FIGURA 1** – Países onde foram detectados a presença do herpesvírus canino. Os países onde foram realizados levantamentos de soroprevalência em cães para HVC-1 (marcadores azuis) e países em que foram relatados casos de HVC-1 (marcadores vermelhos), dentre eles o Brasil (OLIVEIRA et al., 2009; ÁVILA et al., 2011); Chile (NAVARRO et al., 2005), Alemanha (SCHULZE e BAUGÄRTNER, 1998); Austrália (REUBEL et al., 2002) e Nova Zelândia (LEDBETTER, 2013). Observa-se que os estudos de soroprevalência estão concentrados nos países da Europa ocidental.

#### 1.4. Patogenia e sinais clínicos

O vírus pode ser re-excretado periodicamente pelos animais latentemente infectados, para o ambiente sendo disseminado para os animais susceptíveis (POULET *et al.*, 2001; VERSTEGEN *et al.*, 2008). A via ocular pode se tornar uma porta de ingresso do vírus, que se estabelece em gânglios sensoriais oculares, causando afecções oculares (LEDBETTER, 2013). A replicação viral pode ocorrer inicialmente em nasofaringe, trato genital, tonsilas, linfonodos retrofaríngeo e bronquial, e conjuntiva (GREENE, 2012). A viremia pode ocorrer associada à infecção de células reticuloendoteliais e disseminada de forma sistêmica em outros órgãos como fígado, rins tecidos linfáticos, pulmões e sistema nervoso central (FRANCO e ROEHE, 2007).

Em cadelas infectadas, nos estágios iniciais de gestação pode ocorrer reabsorção embrionária e infertilidade. Através da passagem transplacentária, o vírus pode causar abortamentos, mortalidade neonatal em filhotes de até 3 semanas, ou nascimento de filhotes fracos com dificuldades de desenvolvimento (DAHLBOM *et al.*, 1998).

Os neonatos acometidos podem apresentar vocalizações constantes, dores abdominais, anorexia, diarreia, dispnéia, alterações neurológicas e oculares, seguido de prostração, levando a “síndrome do filhote enfraquecido” (LÓPEZ, 2009; FRANCO e ROEHE, 2007). O período de incubação é de 6 a 10 dias. A morte por ocorrer após 1 a 3 dias do aparecimento dos sinais clínicos, podendo se prolongar de 6 a 9 dias, em infecções experimentais (CARMICHAEL *et al.*, 1965a ; PERCY *et al.*, 1968). Em cães adultos, a infecção é referida como leve ou inaparente, associada à latência viral. No entanto, infecções sistêmicas fatais têm sido relatadas em cães adultos e atribuído a condições ou tratamentos imunossupressores. Esses animais apresentaram sinais clínicos inespecíficos ou mascarados pela terapêutica (MALONE *et al.*, 2010; GADSDEN *et al.*, 2012). Em estudo com a infecção experimental, foi relatado que os animais apresentaram alterações respiratórias, descarga seronasal, pirexia e diarreia (KAWAKAMI *et al.*, 2010). Os animais infectados que debelaram infecção aguda podem apresentar seqüelas em sistema nervoso central (SNC), pulmão e rim (PERCY *et al.*,

1971). O HVC-1 também pode causar infecções no trato respiratório e apresentar quadro semelhante ou associados à parainfluenza canina, adenovírus canino tipo 2, vírus da cinomose canina ou infecções bacterianas (LÓPEZ, 2007; PATEL e HELDENS, 2009; KAWAKAMI et al., 2010 GREENE, 2012).

## 1.5. Diagnóstico

O diagnóstico pode ser realizado por meio de exames *pos-mortem*, de imunofluorescência direta realizada pela impressão de fragmentos de órgãos (como fígado, pulmão e linfonodo), achados de necropsia, exames histopatológicos e isolamento viral a partir de amostras de tecido, como pulmões e rins (FRANCO e ROEHE, 2007). As lesões características nas necropsias são: focos hemorrágicos, pontos de necrose disseminados em pulmão, fígado e rim, congestão pulmonar difusa, esplenomegalia e esplenite hemorrágica aguda, meningoencefalomielite não-supurativa focal e ganglioneurite (CARMICHAEL et al., 1965; PERCY et al., 1971).

A infecção HVC-1 também pode ser detectada através de anticorpos produzidos durante a infecção. No entanto, cães com infecção por HVC-1 desenvolvem anticorpos neutralizantes detectáveis entre 7 a 14 dias, atingindo picos de elevação até 21 dias (TAKUMI et al., 1990; POULET et al., 2001) Após este período, entram em declínio e baixos títulos podem ser detectáveis por vários meses ou até 2 anos (GREENE, 2012; LEDBETTER, 2013).

Assim, diferentes ensaios sorológicos têm sido utilizados para detectar animais infectados pelo HVC-1, entre eles o teste de soroneutralização ou vírus neutralização por anticorpos, ensaio imunoenzimático ou ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*), inibição da hemaglutinação e imunofluorescência indireta (RONSSE et al., 2002; BABAEI et al., 2010; CARMICHAEL, et al., 1965b). No teste de vírus neutralização é avaliada até qual diluição do soro é capaz de evitar o aparecimento do efeito citopático frente a uma quantidade conhecida de vírus, para um sistema de células permissivas. Esses ensaios são trabalhosos, mas têm a vantagem de grande especificidade. O ELISA é menos laborioso, sendo considerado o método de

escolha para detectar anticorpos anti-HVC-1, por ser sensível e específico (RONSSE et al., 2002; READING e FIELD, 1998). No entanto, o processo de testes e os resultados subsequentes são inteiramente dependentes da presença de um controle adequado e da padronização prévia do ensaio (READING e FIELD, 1998). Ronsse et al., 2005, observaram a necessidade de repetir testes sorológicos dos animais avaliados para confirmar a infecção, devido às rápidas alterações sorológicas de soroconversão.

Na PCR, sequências definidas dos genes de agentes infecciosos podem ser detectados a partir de pequenas quantidades de amostras. A PCR pode ser suficientemente sensível para detectar o baixo número de cópias do genoma viral e considerada útil na pesquisa do herpesvírus latente (BURR et al., 1996; DECARO et al., 2010). Os dados resultantes podem ser usados não somente para fins diagnósticos, mas também avaliar os efeitos ou intervenções geradas sobre os agentes infecciosos na população (LIMBERY e THOMPSON, 2012). Dessa forma, a PCR tem sido empregada em vários estudos no diagnóstico da infecção causada pelo herpesvírus canino (LEDBETTER, 2013; HOLST et al., 2012; GADSDEN et al., 2012).

## **1.6. Controle e Profilaxia**

Devidos às várias características patogênicas do vírus, o HVC-1 pode causar problemas reprodutivos e perdas econômicas elevadas nos canis (PRAVIEUX et al., 2007). A dificuldade de diagnóstico (exceto em neonatos que foram a óbito) e a falta de medidas preventivas e terapêuticas têm sido responsáveis pela baixa conscientização e preocupação de veterinários no controle da doença.

Tem sido disponível somente nos países europeus, a vacina de subunidade purificada da glicoproteína B do antígeno herpesvírus canino (estirpe F205). Esta vacina é utilizada somente em cadelas no período de reprodução, com o objetivo de evitar perdas das ninhadas durante a gestação pelo HVC-1 e desenvolver a imunidade protetora dos filhotes (EURICAN HERPES 205). As vacinas para herpesvírus caninos não estão disponíveis e

acessíveis no mercado brasileiro, dificultando o controle e a profilaxia da doença. POULET et al., 2001, avaliaram o efeito da vacinação em cadelas antes da prenhez, e observaram a ausência de efeitos adversos no desempenho reprodutivo, na taxa de prenhez, no número de fetos e filhotes viáveis. A vacinação resultou na soroconversão nas cadelas e altos títulos de anticorpos neutralizantes. Não houve casos de doenças pelo HVC-1 no grupo vacinado, sendo constatado também por PRAVIEUX et al. (2007).

A erradicação de HVC-1 é impossível (DAHLBOM et al., 2009; GREENE, 2012). Tendo em vista que a fonte de infecção muitas vezes não é identificada. Para minimizar os riscos de problemas reprodutivos deve-se evitar o contato de cadelas gestantes com outros cães, manutenção da higiene, limpeza do canil, e o controle vacinal das fêmeas em reprodução (RONSSE et al., 2004).

Técnicas de diagnósticos baseados na PCR e o controle vacinal podem auxiliar médicos veterinários e criadores, na prevenção de alguns dos problemas relacionados à infecção pelo HVC-1 (POULET et al., 2001). Portanto, torna-se necessário o desenvolvimento dessas técnicas, para o diagnóstico da doença nos animais infectados, cuja apresentação clínica é considerada branda, inespecífica ou mesmo subclínica.

No Brasil há poucos dados sobre a frequência da infecção pelo HVC-1 e há somente alguns relatos publicados. O diagnóstico do herpesvírus canino nesses casos descritos foi através de imunofluorescência direta (OLIVEIRA et al., 2009) e por isolamento viral (ÁVILA et al., 2011) associados a alterações anatomopatológicas, sem a identificação do agente. Por isso, o presente trabalho tem como objetivos detectar o herpesvírus canino a partir de amostras biológicas e padronizar uma técnica diagnóstica, segura e confiável, para a identificação do herpesvírus canino. Além de realizar o isolamento viral do agente, para avaliar a caracterização e comportamento *in vitro*.

## 2. Objetivos

Padronizar técnicas moleculares para a detecção e diagnóstico de herpesvírus canino, dentre elas a PCR e qPCR utilizando o gene da região de timidina quinase e glicoproteína B.

Isolar o herpesvírus canino e realizar a caracterização molecular por sequenciamento parcial do DNA viral.

Comparar 3 ensaios de titulação viral por diluição limitante.

### 3. Material e Métodos

#### 3.1. Amostras biológicas

##### 3.1.1. Localidades

As amostras coletadas foram de canis e cães domiciliados proveniente de municípios do estado de São Paulo, dentre as cidades: Araçatuba, Araçoiaba da Serra, Biritiba Mirim, Campinas, Pardinho, Piratininga e São Bernardo do Campo. O número de amostras coletadas e as respectivas a localidades estão descritas na tabela 2

**TABELA 2** – Localidades onde foi realizada as coletas das amostras

Canil	Localidade	NºAnimais	Amostras de sangue	Amostras de órgãos	Suabes genitais
1	Botucatu	35	30	5	2
2	Pardinho	6	6	0	1
3	Arealva	1	1	0	0
4	Araçoiaba da Serra	25	25	0	1
5	Campinas	4	4	0	0
6	São Bernardo do Campo	5	5	0	0
7	Araçatuba	17	12	5	1
8	Piratininga	32	30	2	0
9	Biritiba Mirim	26	26	0	0
<b>Total</b>		<b>151</b>	<b>139</b>	<b>12</b>	<b>5</b>

##### 3.1.2. Fluidos corpóreos

Foram obtidos num total de 156 amostras de fluídos corpóreos sendo 151 amostras de sangue e 5 suabes. As amostras sanguíneas foram colhidas por venopunção da jugular ou cefálica dos cães, em tubos com anticoagulante EDTA. Em animais que apresentaram alterações ou secreções genitais foram

colhidas amostras destas secreções com auxílio de suabes estéreis e em seguida mantidas em PBS com pH 7,4.

### **3.1.3. Fragmentos de órgãos**

Em casos de filhotes neonatais que vieram a óbito, foram realizadas necropsias para coleta de fragmentos de órgão e avaliação das alterações anatomopatológica macroscópicas. Assim, foram obtidos fragmentos de órgãos de 12 animais. Dentre os órgãos colhidos estão: cérebro, linfonodos, pulmão, fígado, baço, rins e intestino.

## **3.2. Extração de DNA total**

Foram utilizados 200 µL das amostras de sangue e secreção genital para realizar a extração de DNA utilizando o Kit *Illustra™ blood genomicPrep Mini Spin* (GE Healthcare), conforme instruções do fabricante. Em amostras de órgãos foram pesados 20 mg do fragmento de tecido, em seguida macerados com auxílio do mixer manual, os DNAs foram extraídos utilizando o *Kit Wizard® SV Genomic DNA Purification System* (Promega), seguindo as recomendações do fabricante. Todas as amostras de DNAs foram mantidas congeladas a -20°C, até o momento do processamento da reação de amplificação.

## **3.3. Amplificação de DNA**

Os oligonucleotídeos iniciadores ou primers empregados durante o processo de padronização estão descritos na quadro 1, para a região dos genes que codificam o fragmento de DNA do HVC-1.

**QUADRO 1** - Oligonucleotídeos para HVC-1 testados

Primer	Sequência	Posição	Produto	Região alvo e números de acesso no Genbank™	Referência
CHV-For <sup>1</sup>	ACAGAGGTTGATAGAAGAGGTATG	439-465	136 bp	<b>Glicoproteína B</b> HQ846625.; AF 361073;	Decaro et.al. , 2010.
CHV-Rev <sup>1</sup>	CTGGTGTATTAACCTTTGAAGGCTTTA	548-574			
CHV1(S) <sup>2</sup>	TGCCGCTTTTATATAGATG	283-301	494 bp	<b>Timidina quinase</b> X75765	Schulze e Baumgärtner, 1998.
CHV2 (AS) <sup>2</sup>	AAGCGTTGTAAGTTCGT	758-776			
CHV3 (S) <sup>1,3</sup>	CGTGGTGAATTAAGCCTAA	460-478	169 bp		
CHV4 (AS) <sup>1,3</sup>	ATGCTATTGGGTGTCTATC	628-610			

<sup>1</sup> Primers para quantitative PCR (qPCR); <sup>2</sup> Primers para PCR; <sup>3</sup> Primer para Nested-PCR

### 3.3.1. Amplificação do fragmento do gene que codifica a proteína da Timidina quinase através da Semnested PCR

Na reação de *seminested* PCR (snPCR) de amplificação foram utilizados os oligonucleotídeos para timidina quinase, conforme descrito por Schulze e Baumgärtner, (1998), para *nested* PCR (nPCR). No entanto foram realizadas algumas alterações na reação de amplificação e sendo adotada a snPCR, tornando a reação mais sensível e específica na detecção do agente das amostras testadas. Na reação de PCR foi realizada a combinação de um *primer* externo (CHV1) e outro interno (CHV4) resultando em um produto de 346 pb e na reação de snPCR utilizou-se os *primers* internos (CHV3 e CHV4) para um produto de 169 pb. A reação enzimática de PCR e snPCR foi preparada com 10 µL de *Gotaq*® *Green Master Mix (2x)* (Promega); 0,3 µM de cada *primer*, 2,5% de DMSO (Sigma-Aldrich® ≥99,5%); 3 µL de DNA na reação de PCR ; ou 1 µL de *amplicons* na snPCR, e água livre de nucleases q.s.p. 20 µL. Para o controle negativo da reação foi utilizado água livre de nucleases em substituição ao DNA *template*. Como não havia controle positivo de amostra biológica, foi utilizado DNA vacinal de herpesvírus canino da vacina Eurican Herpes 205 (Merial). Trata-se de uma vacina de subunidade purificada da glicoproteína B do antígeno herpesvírus canino (estirpe F205), gentilmente cedida pelo Médico Veterinário Dr. Leonardo Brandão (Merial do Brasil), para a realização desta pesquisa. Após sua reconstituição foi realizada a extração do

DNA vacinal, utilizando o kit *Illustra*<sup>®</sup> *Blood genomicPrep Mini Spin* (GE Healthcare), seguindo as instruções do fabricante. Assim, como controle positivo da reação foi utilizado o DNA vacinal diluído a  $10^{-2}$ .

As condições de reações para PCR foram de 1 ciclo de desnaturação inicial a 94°C por 3 min.; 30 ciclos para desnaturação de 94°C por 30 s, anelamento a 57°C por 30 s e extensão de 72°C por 30 s e um ciclo de 72° C por 3 min. Na reação de snPCR foi alterado somente o tempo de desnaturação inicial e extensão final para 1 minuto. Os produtos de PCR e snPCR foram aplicados em gel de agarose 1,5%, corado com *SYBR*<sup>®</sup> *Safe Stain* (Invitrogen<sup>™</sup>), sendo submetidos à eletroforese e visualizado sob luz ultravioleta (UV).

### **3.3.2. Amplificação do fragmento do gene que codifica a proteína da Timidina quinase pela qPCR**

Na reação de qPCR de amplificação foram utilizados os oligonucleotídeos para timidina quinase CHV3 e CHV4, empregados anteriormente, na reação de snPCR. Para preparar a reação de qPCR usou-se 10 µL de *Gotaq*<sup>®</sup> *qPCR Master Mix (2x)* (Promega), 0,27µM de ROX CXR (30µM), 0,3 µM de cada oligonucleotídeo a 10 pmol/µL, 2,5% de DMSO (Sigma-Aldrich<sup>®</sup> ≥99,5%) e 3µL de DNA *template* num volume final de reação de 20 µL. Como controle negativo da reação usou-se água livre de nucleases em substituição ao DNA. As reações foram realizadas no termociclador *7300 Real Time PCR System* (Applied Biosystem<sup>®</sup>), a captação e detecção da fluorescência da reação foram analisados através do programa do *Sequence Detection Software 7300 versão 1.2.3.* (Applied Biosystem<sup>®</sup>). As condições de reação para amplificação do fragmento do gene para timidina quinase do HVC-1 foram de 95°C de desnaturação inicial por 2 minutos, seguidos de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 57°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos.

### **3.3.3. Amplificação do fragmento do gene que codifica a glicoproteína B envelope viral através da qPCR**

Para a amplificação do fragmento do gene da glicoproteína B (gB) de 136pb foram utilizados os oligonucleotídeos, conforme descrito por Decaro et al, 2010, empregado na qPCR. Para preparar a reação de qPCR usou-se 10 µL de *Gota<sup>®</sup> qPCR Master Mix (2x)* (Promega) , 0,27µM de ROX CXR (30µM), 0,3 µM de cada oligonucleotídeo CHV (For) e CHV (Rev), 3 µL de DNAs extraídos das amostras e água livre de nucleases q.s.p. 20 µL. Como controle negativo da reação usou-se água livre de nucleases em substituição ao volume de DNA na reação. As reações foram realizadas no termociclador *7300 Real Time PCR System* (Applied Biosystem<sup>®</sup>), a captação e detecção da fluorescência da reação foram analisados através do programa do *Sequence Detection Software 7300 versão 1.2.3.* (Applied Biosystem<sup>®</sup>). As condições de reação para amplificação do fragmento do gene para gB do HVC-1 foram de 95°C de desnaturação inicial por 5 min , seguidos de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 45 s, anelamento e extensão a 60°C por 30 s.

### **3.3.4. Determinação da sensibilidade analítica**

Para determinar a sensibilidade analítica das reações padronizadas foi utilizado o DNA do tecido renal, que havia sido positivo para herpesvírus canino na snPCR e qPCR para TK, e ainda utilizado no isolamento viral. Assim, para avaliar os fatores inibitórios em DNA matriz e determinar a sensibilidade analítica, foi utilizado um pool de DNA extraídos de sangue. O pool de DNA matriz foi constituído de 9 amostras de DNAs de cães que foram negativos à qPCR para TK. Assim, a amostra de DNA de tecido renal foi diluída serialmente na razão 10 de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-7</sup> em pool de matriz de DNA seguindo as orientações OIE, 2012a. Em seguida o DNA diluído em pool de matriz foi submetido à reação de snPCR e qPCR para TK e gB, conforme descrito anteriormente no item 3.3.1, 3.3.2. e 3.3.3. respectivamente.

### 3.3.5. Avaliação da especificidade analítica

Na avaliação da especificidade analítica das técnicas testadas foram submetidos ao teste, DNAs dos seguintes agentes: herpesvírus humano tipo 4 (Epstein Barr) ; herpesvírus humano tipo 8 (Sarcoma de Kaposi); adenovírus canino tipo 2; parvovírus canino tipo 2 e de vacina Vanguard<sup>®</sup> (Pfizer), além de DNA complementar (cDNA) do vírus da cinomose canina (*Morbillivírus*), que foram gentilmente cedidas pelo laboratório de Diagnóstico Molecular e Virologia. A vacina Vanguard<sup>®</sup> aplicada ao teste é constituída por vírus vivos atenuados, dentre os agentes virais e suas respectivas concentrações estão:

- 102,5 DICT50 para cinomose
- 102,9 DICT50 para adenovírus tipo 2
- 105,0 DICT50 para o vírus da parainfluenza Canina
- 107,0 DICT50 para parvovírus
- Coronavírus (presente no diluente)

Além das bacterinas para leptospiros dos sorovares: *L. canicola*, *L. grippotyphosa*, *L. icterohaemorrhagiae* e *L. pomona*.

## 3.4. Método da Curva Padrão para Quantificação Absoluta

### 3.4.1. Clonagem do fragmento do gene da Timidina quinase

#### 3.4.1.1. Preparo das células competentes

Foi utilizada como vetor de clonagem a bactéria modificada de *Escherichia coli* (*E.coli*) cepa JM109. Para tornar as bactérias competentes foi realizado um pré-inóculo de uma colônia isolada da bactéria em 3 mL de meio líquido SOB , incubado a 37°C sob agitação constante por 220 rpm durante 16 horas. Após este período, foi coletado 1mL da cultura e adicionado ao meio de cultura líquido SOB a 37°C a 220 rpm até atingir a absorbância de 0,5 a 0,6 em comprimento de onda de 600nm ( $A_{600}$ ). E então, o meio SOB inoculado foi

mantido no gelo por 30 minutos com a adição de cloreto de magnésio ( $MgCl_2$ ). Em seguida a cultura foi centrifugada a 3000 x g por 15 min a 4°C. O *pellet* formado foi ressuspendido em solução RF1 (0,1 mol/L KCl, 50 mmol/L  $MnCl_2$ , 30 mmol/L  $KC_2H_3O_2$ , 10mmol/L  $CaCl_2$ , 15% de glicerol) filtrada e gelada, sendo mantido no gelo por 15 min e novamente centrifugado a 3000 x g por 15min a 4°C. O pellet obtido foi ressuspendido com a solução RF2 (10 mmol/L NaMOPS, 10 mmol/L KCl, 74 mmol/L  $CaCl_2$ , 15% de glicerol) gelada e filtrada (SAMBROOK e RUSSEL, 2001). E então, as bactérias foram alíquotadas em tubos de microcentrifugação, no volume de 100  $\mu$ L e colocadas no nitrogênio líquido, para o processo de congelamento rápido por 15 minutos, e em seguida armazenadas sob congelamento a -70°C.

#### **3.4.1.2. Clonagem do fragmento do gene da Timidina quinase**

O produto de PCR de 494 pb, do fragmento do gene da timidina quinase, após purificação do gel de agarose a 1,5%, foi quantificado através da comparação com o *Low Mass<sup>TM</sup> Ladder* (Invitrogen<sup>TM</sup>). O produto foi clonado no plasmídeo *pGEM-T Easy Vector* (Promega<sup>®</sup>), conforme recomendações do fabricante. Assim, foi adicionado na proporção 3:1 de inserto: vetor, o preparo da reação com o plasmídeo e o inserto foi incubado a 4°C por 16 horas. O produto da reação de ligação, foi utilizado na transformação da bactéria *E. coli* cepa JM109, após a competência, conforme descrito anteriormente (SAMBROOK e RUSSEL, 2001). Foi realizado o cultivo das bactérias em placa de petri em meio sólido LB (Luria-Bertani) contendo 100  $\mu$ g/ $\mu$ L de Ampicilina, e aplicados na superfície do meio, 100  $\mu$ L de IPTG e 20  $\mu$ L de X-gal (SAMBROOK e RUSSEL, 2001). Após 20 horas de incubação em estufa de 37°C, as colônias isoladas foram submetidas à reação de PCR para confirmação do inserto, conforme orientações do fabricante *pGEM-T Easy Vector*. Após a confirmação do inserto no vetor, as colônias positivas foram propagadas em meio líquido LB com Ampicilina 100  $\mu$ g/mL. Os DNAs plasmidiais recombinantes foram extraídos do meio de cultura de propagação

com o *kit Wizard<sup>®</sup> SV Minipreps DNA Purification System* (Promega<sup>®</sup>) , seguindo as recomendações do fabricante.

Para medir a concentração de DNA plasmidial recombinante foi utilizado o fluorímetro *Qubit<sup>®</sup> - Quantification System* (Invitrogen<sup>™</sup>), seguindo as recomendações conforme o protocolo do fabricante, fornecendo a concentração de 22,5 ng/μL. O DNA plasmidial, em seguida foi mantido sob congelamento a -20°C, até o momento do processamento da reação para realizar a construção da curva padrão absoluta.

### **3.4.2. Quantificação absoluta**

Para realizar a quantificação absoluta foi utilizado o DNA plasmidial recombinante com a região do gene da TK do HVC-1. Em seguida o DNA foi diluído serialmente na razão 10 de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-10</sup>, em água livre de nucleases. E então, foram aplicados 3 μL do DNA plasmidial diluído, em duplicatas, na reação de qPCR para TK, conforme descrito anteriormente no item 3.3.2.

## **4. Isolamento Viral**

O isolamento viral foi realizado com uma amostra de tecido renal, que havia apresentado positividade na reação snPCR para timidina quinase. O tecido renal foi preparado como inóculo, maceradas com auxílio de almofariz e pistilo. E então, constituído na concentração de 10% (p/v) com meio DMEM e tratadas com antimicrobianos na concentração de 100 UI penicilina G procaína, 100 μg/μL de Sulfato de Estreptomicina, e 2,5 μg/mL de Anfotericina (Gibco-Invitrogen<sup>®</sup>).

Foi realizada a cultura de células MDCK cultivada a 37°C com meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*-Gibco<sup>®</sup>) e suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco<sup>®</sup> BRL) por 24 horas, para ser infectada.

O inóculo foi centrifugado a 1500xg por 10 min e aplicado diretamente na monocamada de células, em seguida mantida sob agitação constante por 1 hora a 34°C, para adsorção viral. Ao término, foi adicionado o meio de cultura celular DMEM suplementado com 1% de SFB, e incubado a 34°C. Foi realizado monitoramento cada 24 horas em microscópio óptico invertido, em objetivas de 5X e 10X, para visualização do efeito citopático (ECP) durante sete dias. E então foi coletado 1 mL do sobrenadante para realizar a passagem do meio inoculado para outra garrafa de cultura de células MDCK, e assim sucessivamente a cada 7 dias, repetidos ininterruptamente até a 5ª passagem

Tanto o inóculo quanto as células infectadas, após extração de DNA, foram submetidos à PCR para adenovírus canino tipo 1 e 2 e micoplasma (VAN KUPPEVELD et al., 1992; HU et al., 2001).

#### **4.1. Preparo das células infectadas e coloração**

Foi realizada a coloração de cultura de células infectadas com corante Romanovsky tipo May-Grünwald-Giemsa, para visualização das alterações celulares. Para isso, foram cultivadas células MDCK em placa de 24 poços, sobre lamínulas no fundo do poço. Após 24 horas, com confluência de 100% da monocamada celular, o sobrenadante foi removido e aplicado 50ul de suspensão viral com 50 µL de meio, para adsorção viral às células por 1 hora. Em seguida foram adicionados 1,9 mL de meio DMEM suplementado com 1% de SFB, e incubado em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C com 80% de umidade por 7 dias. Após este período, o sobrenadante das células foi descartado e realizado 3 lavagens com 2 mL de tampão de PBS pH 7,4, por poço, para remoção dos debris celulares. E então foi colocado 1 mL de metanol em cada poço, por 5 minutos para fixação e aplicado o corante Romanovski tipo May Grünwald-Giemsa, diluído a 10% (v/v) em água ultra-filtrada Milli Q<sup>®</sup>, por 20 minutos. E então foram realizadas 3 lavagens, por poço contendo as lamínulas, com água deionizada. As lamínulas foram retiradas dos poços para secagem em temperatura ambiente. Em seguida foi realizada a montagem em lâminas de vidro para microscopia, e visualizadas no microscópio óptico em objetivas de 10x, 40x e 100x (com óleo de imersão).

## 5. Microscopia eletrônica de Isolado viral em células MDCK

As culturas de células foram infectadas para a visualização do vírus e sua replicação nas células. Assim, foi realizado o mesmo procedimento para infecção de células, em cultura celular de MDCK com meio DMEM suplementado com SFB a 1%. Após 7 dias da infecção, com 80% de efeito citopático sobre a monocamada de células, o sobrenadante foi descartado e acrescentado 3 mL do fixador Karnovsky. Em seguida a monocamada celular foi raspada e centrifugada a 6.000g por 10 minutos. O *pellet* formado foi lavado com água destilada e cetona, fixado com tetróxido de ósmio e incluído em resina de epóxi (Araldite®). Foram realizados cortes ultrafinos com Ultramicrotomo Ultracut UCT (Leica®), em seguida o corte foi colocado sobre uma grade revestida de carbono, e contrastado com acetato de uranila a 5%, conforme descrito por SESSO, SOUZA e MACHADO, 1998. A visualização do material foi realizado no microscópio eletrônico de transmissão modelo Philips CM 100.

## 6. Titulação viral por Diluição limitante

A titulação por diluição limitante foi realizada de 3 formas modificadas da técnica. Essas modificações na técnica de diluição limitante foram realizadas para verificar em qual delas haveria maior produção de efeito citopático, a relação de tempo para início do ECP e a produção de vírus. A concentração viral foi estimada através da qPCR. O inóculo utilizado foi o sobrenadante de isolamento de HVC-1 da segunda passagem, mantido congelado a -70°C. Os sobrenadantes das células infectadas na titulação foram aplicadas na reação de qPCR para TK. Os ensaios das técnicas na titulação viral foram:

- **Titulação em placas**

- Em cultura de células MDCK em Meio DMEM suplementado com SFB
- Em cultura de células MDCK em meio VP-SFM (*Virus Production-Serum Free Medium*)

- **Titulação em tubos**

- Em cultura de células MDCK com meio DMEM suplementado com SFB.

### **6.1. Titulação Viral em placas com células MDCK com Meio DMEM e Soro fetal bovino.**

As células MDCK foram cultivadas em meio DMEM com adição de 10% de SFB em garrafas de cultura celular 25cm<sup>2</sup> por 24 horas a 37°C. Após a formação da monocamada de células e confluência de 100%, foi realizada a dissociação química com tripsina EDTA 0,2 %, e adicionado 13 mL de meio DMEM e 10% de soro fetal bovino. Para titulação em placa foi utilizada uma placa de cultura celular de 96 poços e aplicados 100 µL de suspensão de células em cada poço da placa e incubado em estufa de CO<sub>2</sub> a 5% , com umidade de 80% a 34°C. Na contagem de células foi obtida uma concentração de 2,55x10<sup>5</sup> células/mL, assim foram aplicados aproximadamente 2,55x10<sup>4</sup> células por poço. Após 24 horas da incubação, foram removidos 100 µL do meio e adicionados 100 µL do isolado viral diluído da 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-10</sup>, para adsorção viral as células, por 1 hora. Após este período foram acrescentados 100 µL de meio DMEM com 1% de SFB em cada poço. As duas últimas colunas de 8 poços com células cultivadas, foram utilizadas como controles negativos, com adição somente de meio DMEM e soro fetal bovino. Em seguida a placa foi novamente incubada em estufa de CO<sub>2</sub>, a 34°C com 80% de umidade, por 7 dias, e monitorada o efeito citopático com microscópio invertido em objetivas de 5X e 10X, a cada 24 horas.

### **6.2. Titulação Viral em placas com células MDCK com Meio VP-SFM (livre de soro fetal bovino)**

Para realizar a titulação viral em placas com células MDCK com meio VP-SFM, foi necessário a adaptação celular ao meio VP-SFM (LIU et al., 2009; VAN WIELINK et al., 2011). Tendo em vista que, a linhagem de células MDCK utilizada era cultivada com meio DMEM e soro fetal a 10% em estufa a 37°C. Para isso, as células MDCK foram adaptadas com redução gradativa da adição do SFB ao meio de cultivo, utilizando 3 mL de inibidor de tripsina *Soybean*

*Inhibitor Trypsin* (Gibco®) preparada a 0,0125% e adicionado às células após a tripsinização ou dissociação. O inibidor de tripsina tem a finalidade de neutralizar o efeito da tripsina sobre as células, que se for mantido após o processo de dissociação pode se tornar prejudicial e levar a morte celular. Assim, as células foram consideradas adaptadas após a 9ª passagem, no processo de adaptação. As células adaptadas ao meio VP-SFM foram cultivadas em garrafas de cultura celular de 25cm<sup>2</sup> e incubadas a 37°C com dez mililitros de meio VP-SFM, a monocamada celular foi dissociada com tripsina EDTA a 0,2% e adicionado 3 mL inibidor de tripsina 0.0125% e 10 mL de meio VP-SPM. Na contagem de células foi obtida uma concentração de 6,675x10<sup>5</sup> células /mL. Foram aplicados 100 µL de células em cada poço em placa de cultura celular de 96 poços e incubado em estufa de CO<sub>2</sub> a 5% com 80% de umidade a 34°C por 24 horas. Após a formação da monocamada celular com confluência de 100%, foram inoculados 100 µL do isolado viral diluído serialmente em razão constante 10 de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-10</sup>, incubado em estufa de CO<sub>2</sub> a 5% e 34°C, por 7 dias. O monitoramento do efeito citopático foi realizado a cada 24 horas, com microscópio invertido, em objetivas de 5X e 10x.

### **6.3. Titulação viral de HVC-1 em tubos**

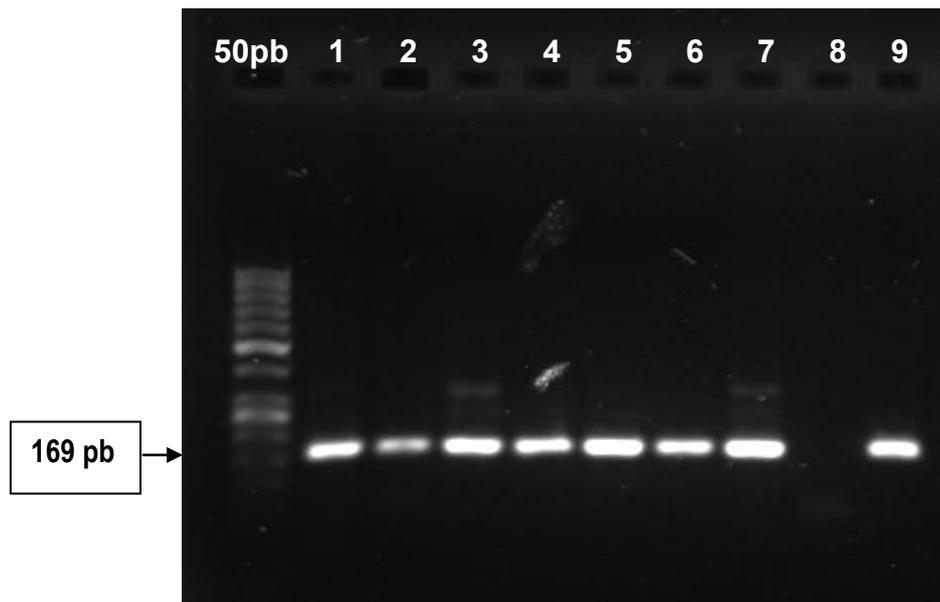
Para titulação viral em tubos as células MDCK do HVC-1 (SPERTZEL et al., 1965; NAVARRO, et al, 2005). Foram cultivadas com meio DMEM e adição de soro fetal bovino a 10% em estufa a 37°C. As células foram dissociadas com tripsina-EDTA 0,2%, em seguida foram adicionados o meio DMEM e SFB. Foram utilizados tubos de cultivo celular de 20cm<sup>2</sup>, e aplicados cinco mililitros de suspensão celular em cada tubo, sem seguida colocados no *roller* sob baixa rotação, por 48 horas. Antes de infectar as células, um dos tubos foi tripsinizado e realizado a contagem de células em câmara de Neubauer. Assim, foi obtida uma concentração de 4,0x10<sup>5</sup> células/mL, e em cada tubo continha aproximadamente 2,0x10<sup>6</sup> células, no momento da infecção. O isolado viral foi diluído com meio DMEM em diluições seriadas de razão 10 de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-8</sup>, com 5 replicatas por diluição. Em cada tubo, foi aplicado 1 mL de inóculo diluído

para adsorção viral, por 1 hora no *roller* a trinta e quatro graus Celsius, sob baixa rotação. Em seguida, foram adicionados quatro mililitros de meio DMEM suplementado com 1% de SFB em cada tubo de célula infectadas. Após a inoculação, os tubos foram colocados no *roller* e incubados a 34°C. O monitoramento dos efeitos citopáticos nos tubos foi realizado a cada 24 horas, em microscópio invertido em objetivas de 5X e 10X.

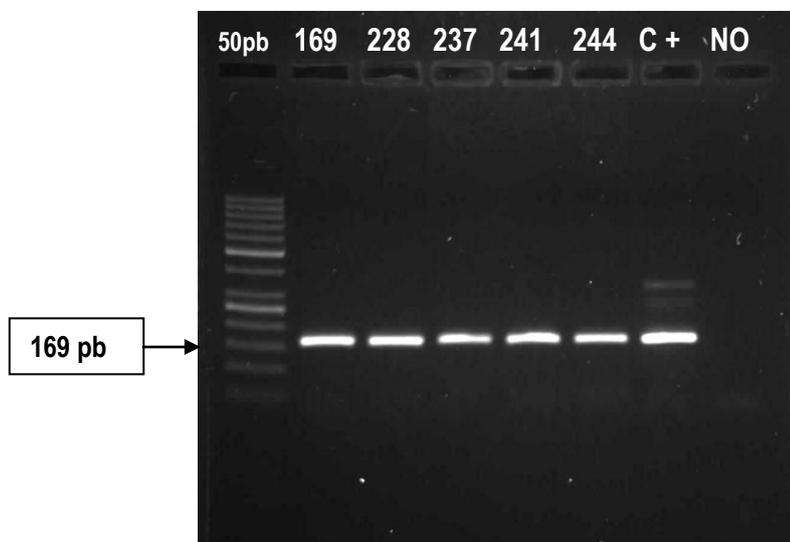
## 7. Resultados e Discussão

### 7.1. Amplificação da snPCR para HVC-1

Na snPCR, foram obtidos produtos de amplificação em amostras de fragmentos de órgãos e sangue, apresentando bandas com tamanho esperado na *seminested* (SN) de 169 pb. Conforme apresentado na figura 2, em amostras fragmentos de órgãos, mostrando bandas positivas intensas e de forte fluorescência. Devido à alta concentração de DNA foram produzidas amplificações já na reação de PCR, e assim verifica-se a presença de bandas de arrasto na SN. Nas colunas em que não produziram bandas na PCR, observa-se que na SN essas bandas de arrasto não se formaram. Os controles negativos não apresentaram amplificações indicando que não houve contaminação na reação ou inespecificidade. A snPCR também foi sensível na detecção de HVC-1 em amostras de sangue, conforme mostrado na figura 3, apresentando banda única de amplificação na reação. As amostras de sangue positivas também foram quantificadas na qPCR para TK, conforme apresentando logo adiante no item 7.4.1, no quadro 3.



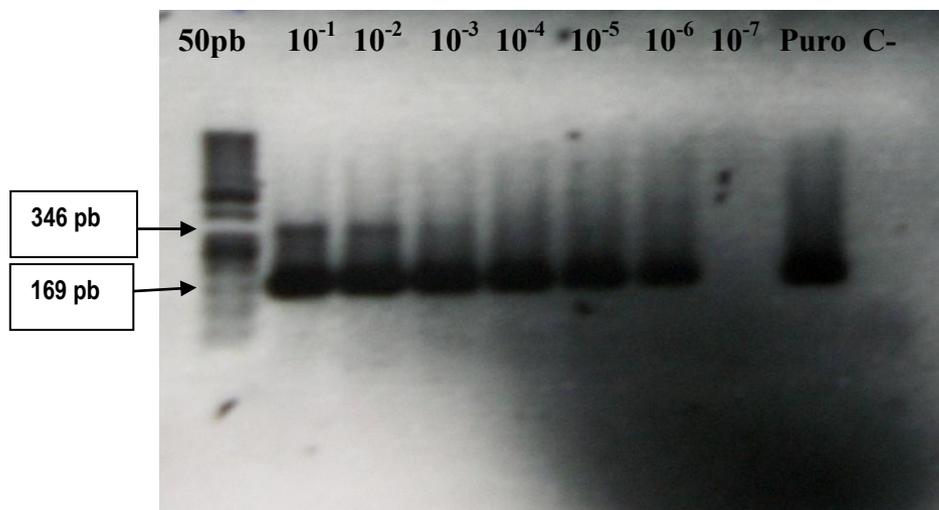
**FIGURA 2** - Produtos de amplificação de snPCR de fragmentos de órgãos submetidos à eletroforese. Coluna 1: cérebro; coluna 2: linfonodo submandibular; coluna 3: pulmão; coluna 4: baço; coluna 5: fígado; coluna 6: rim; coluna 7: intestino delgado; coluna 8: controle negativo; coluna 9: controle positivo vacinal diluído a  $10^{-2}$ . Reação de SN com amplificação de produtos de 169pb em todos os tecidos, com presença de produtos da PCR e arrasto na coluna 1; 3 e 7, devido à alta concentração de DNA viral. Foi utilizado marcador molecular de 50 pb na PCR e SN.



**FIGURA 3** - Gel de agarose da reação de *seminested* (produto de 169 pb). Algumas amostras de sangue que apresentaram positividade ao teste. Foi utilizado o marcador molecular 50pb.

## 7.2. Avaliação e desempenho da sensibilidade da snPCR

Na reação com o DNA de tecido renal, a amplificação ocorreu somente até a diluição  $10^{-6}$ . Nas colunas onde estavam as menores diluições também se formaram bandas de arrastos, que pode ser devido à alta concentração da amostra de DNA. Na figura 4, verifica-se a presença de banda no tamanho de 346pb, que sugerem ser produtos da PCR na *seminested*. No entanto o produto esperado da SN de 169 pb apresentou bandas mais fortes e intensas, em todas as diluições em que foi detectado.



**FIGURA 4** – Gel de agarose de produto da *Seminested* PCR de DNA de fragmento de rim diluído em pool de matriz. Na primeira coluna foi utilizado marcador 50bp, na segunda coluna foi aplicado produto da snPCR do isolado viral diluído a  $10^{-1}$  nas colunas subsequentes estão as diluições até a  $10^{-7}$ . Na penúltima coluna está o produto de snPCR do fragmento de rim puro, na última coluna o controle negativo sem amplificação. Nas colunas de diluição  $10^{-1}$  a  $10^{-4}$  presença de bandas de arrasto, devido alta concentração de DNA.

## 7.3. Avaliação e desempenho da sensibilidade da qPCR

As reações de qPCR, das regiões alvo para gB e TK, para determinar a sensibilidade analítica em *pool* de DNA matriz foram praticamente iguais, em relação ao desempenho, especificidade e sensibilidade conforme apresentado

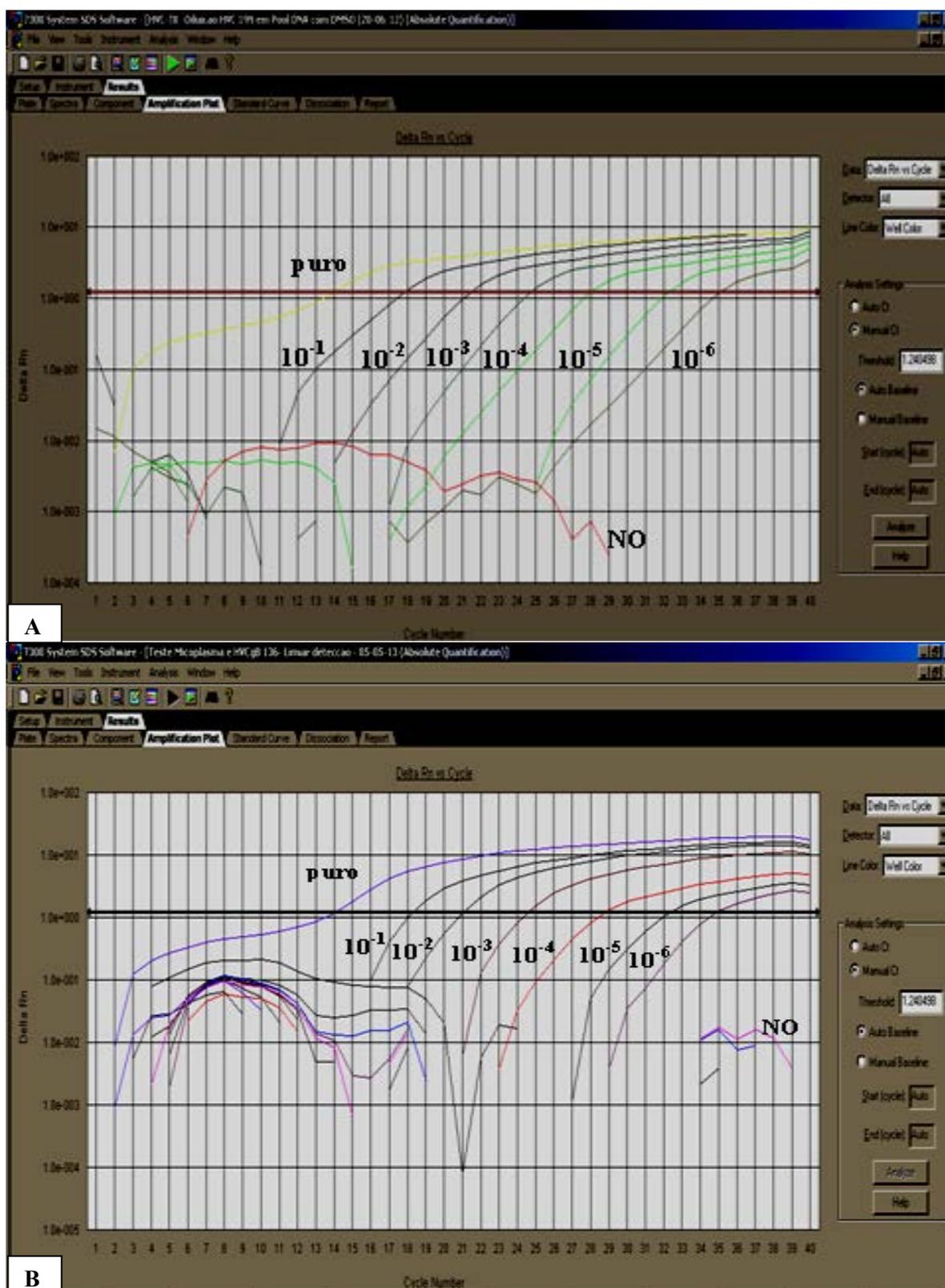
na figura 5 e 6. Para fins comparação foi ajustado o valor do *threshold* nas duas reações a 1.240498. No gráfico da curva padrão relativa foi observado os mesmos valores nas variáveis da curva, conforme apresentado os dados no quadro 2. A temperatura de *melting* da reação de TK e gB variaram em média 1,5°C, dentro do esperado.

Na construção da curva padrão relativa observa-se que o ajuste da reação pelo R2 foram semelhantes (figura 7). O *slope*, a variável que avalia a eficiência da reação também foram quase os mesmos como o valor de *intercept*. Nessa avaliação e sob essas condições, o desempenho da sensibilidade analítica das duas reações foram praticamente os mesmos.

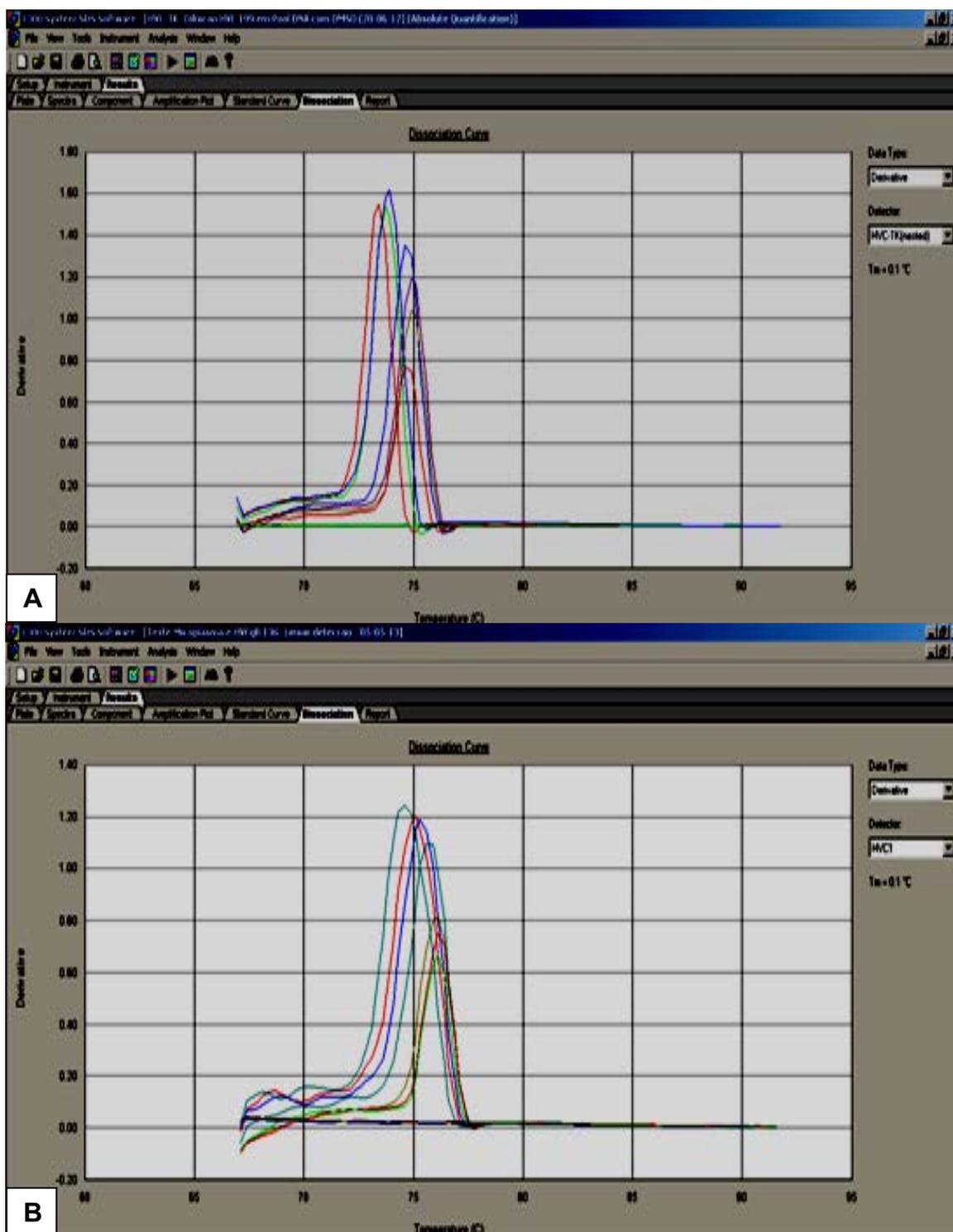
Tanto na snPCR e qPCR foram observadas a sensibilidade analítica até a diluição  $10^{-6}$ , indicando que os três testes se equipararam nestas condições de reação.

**QUADRO 2** - Comparação entre a sensibilidade analítica da qPCR para TK e gB.

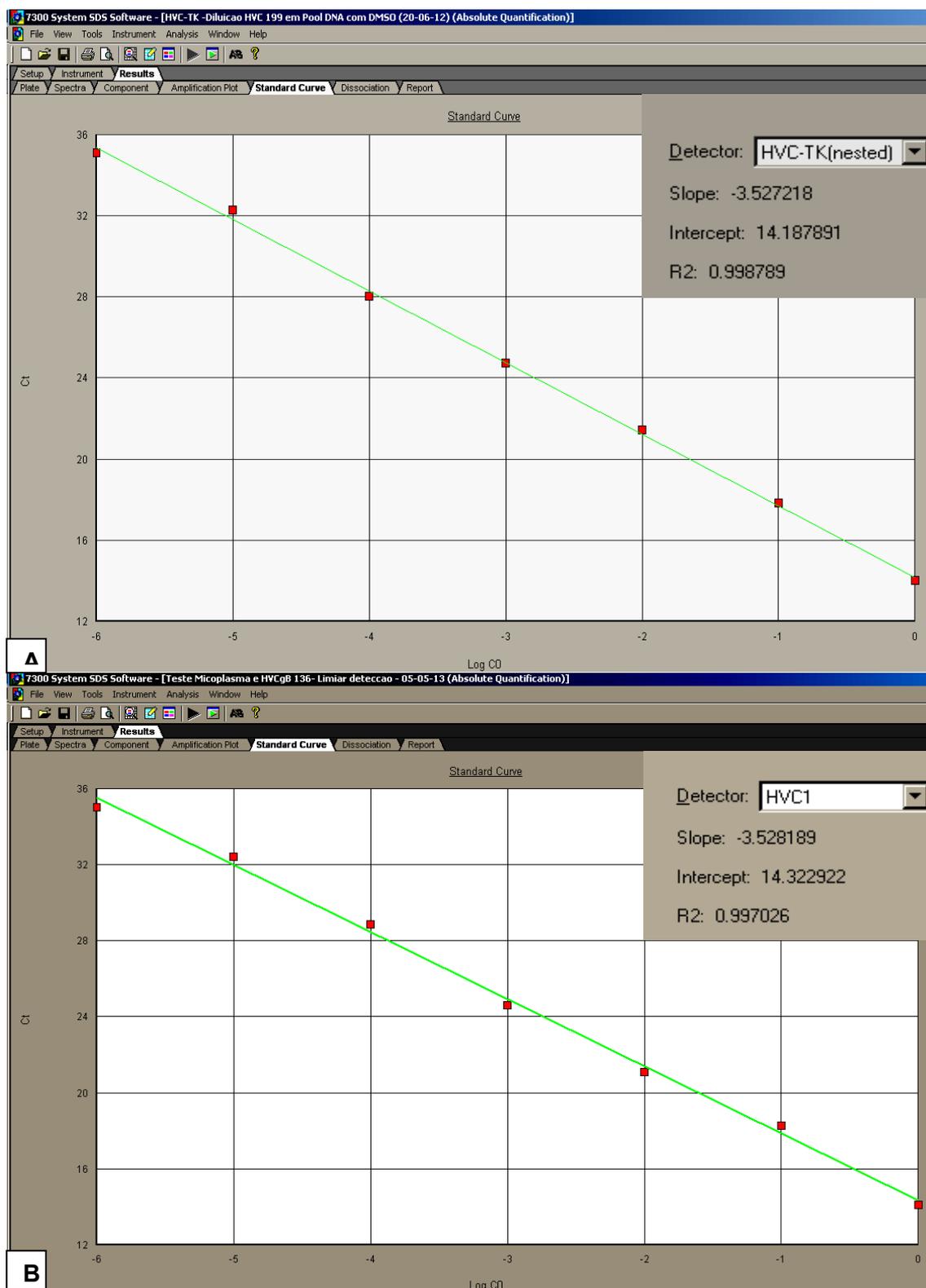
<b>Curva de amplificação</b>		
<b>Diluição</b>	<b>Ct - TK</b>	<b>Ct - gB</b>
Puro	14.62	14.31
$10^{-1}$	18.44	18.43
$10^{-2}$	21.99	21.23
$10^{-3}$	25.28	24.79
$10^{-4}$	28.59	29.13
$10^{-5}$	32.80	32.69
$10^{-6}$	35.73	35.30
<b>Curva padrão relativa</b>		
<b>Variáveis da equação</b>	<b>TK</b>	<b>gB</b>
<i>Slope</i>	- 3.527218	-3.5288189
R2	0.998789	0.997026
<i>Intercept</i>	14,187891	14, 322922



**FIGURA 5** - Curvas de amplificação do teste de sensibilidade analítica para TK e gB do HVC-1. **A** - curva de amplificação na qPCR para TK ; **B** - curva de amplificação na qPCR para gB. As duas reações apresentaram amplificações dos produtos em suas respectivas diluições semelhantes. Não houve amplificação dos controles negativos.



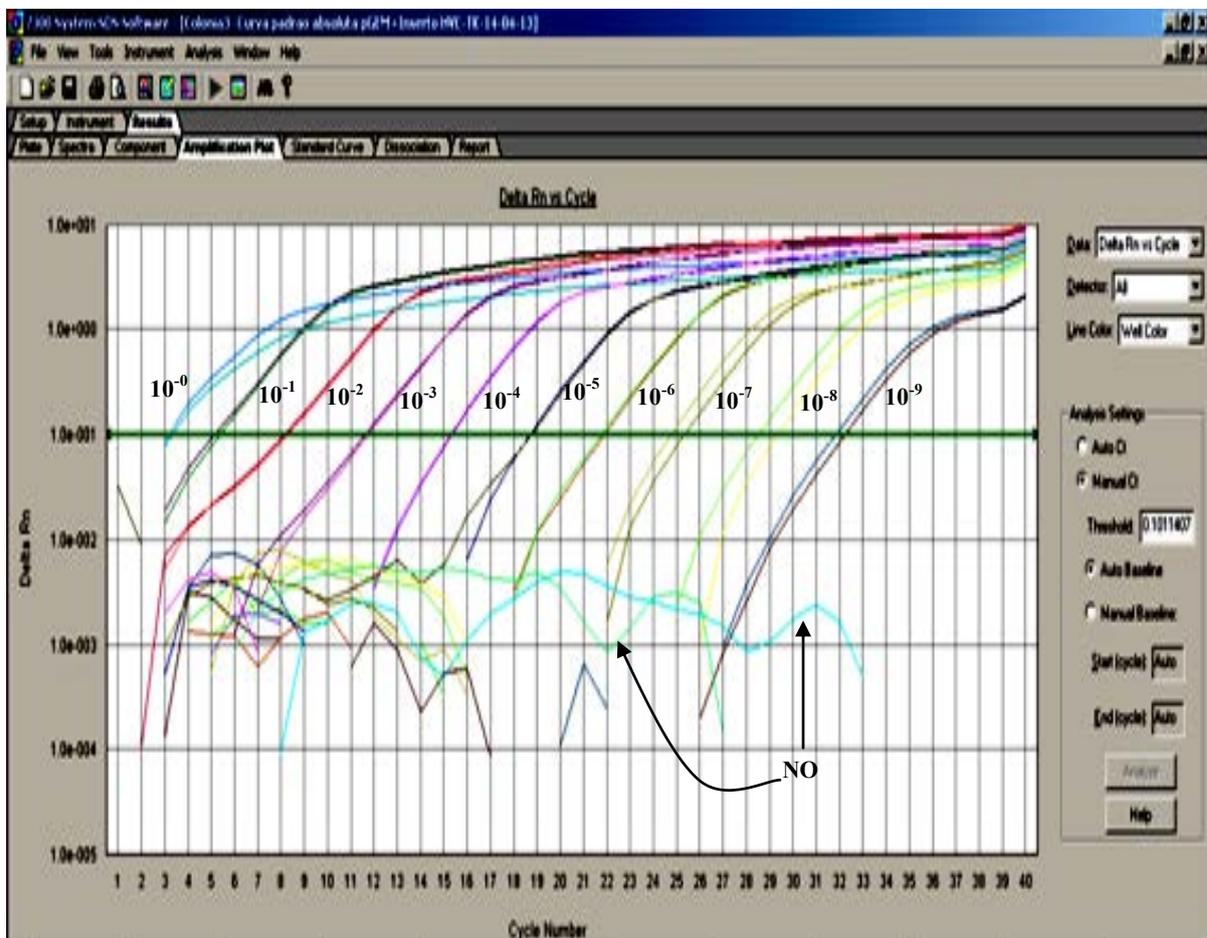
**FIGURA 6** – Curva da dissociação com base na temperatura de *melting* ( $T_m$ ) resultante do teste de sensibilidade analítica. **A** – Curva de dissociação da qPCR para TK ; **B** - Curva de dissociação da qPCR para gB. Na curva de dissociação as  $T_m$  das duas reações produziram picos únicos, indicando a especificidade e ausência de *primer-dimer*.



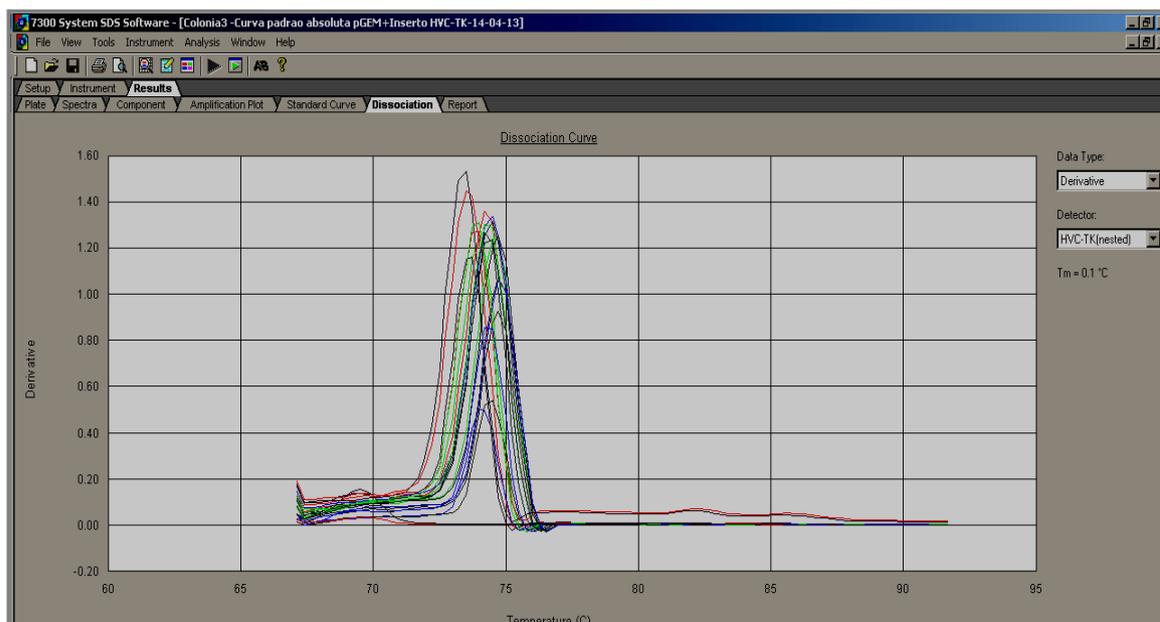
**Figura 7-** Gráfico da curva padrão das reações de sensibilidade analítica. A - Gráfico da curva padrão relativa da qPCR para TK; B - Curva padrão relativa da qPCR para gB. Na curva padrão relativa há semelhanças no alinhamento da reta, associado com os valores de *slope*, R2 indicando eficiência da reação.

### 7.3. Curva Padrão Absoluta

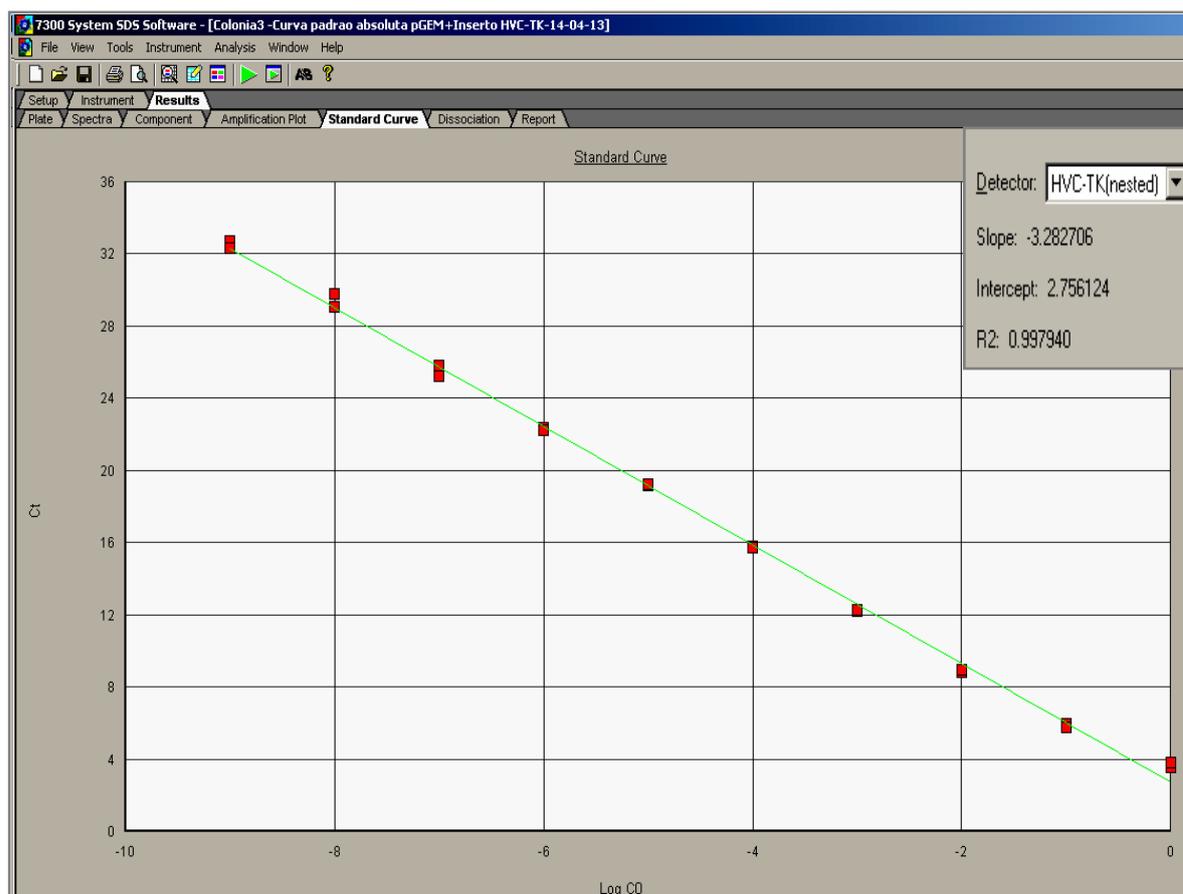
Na curva de amplificação foi detectada a amplificação do DNA plasmidial recombinante na qPCR para TK das diluições de  $10^0$  a  $10^{-9}$ , conforme em figura 8. Não foram verificadas a presença de reações inespecíficas ou *primer dimer* na reação e as temperaturas de *melting*, observado no gráfico da dissociação figura 9, com picos únicos e apresentando pouca variação, ou seja,  $1,2^\circ\text{C}$  entre  $73,5$  (diluição  $10^{-1}$ ) a  $74,7^\circ\text{C}$  (diluição  $10^{-4}$ ). Na construção da curva padrão absoluta, foi obtido um valor de *slope* de 3,28; *intercept* de 2,756124 e  $R_2$  de 0,997940, com 9 pontos de intersecção na reta, em duplicata, apresentados na figura 10.



**Figura 8** – Curva de amplificação com DNA plasmidial recombinante. Foi verificada amplificação dos produtos até a diluição  $10^{-9}$ . Não houve amplificação do controle negativo (NO). Os dados da reação mostram que a média de Ct para cada diluição variou de 2,03 (entre  $10^0$  e  $10^{-1}$ ) até 3,86 ( $10^{-7}$  a  $10^{-8}$ ).



**FIGURA 9** - Avaliação da curva de dissociação em relação a  $T_m$ . Apesar da variação entre os picos de temperatura de *melting* entre as diluições, a variação média foi de  $1,2^\circ\text{C}$ , com picos únicos sem a presença de *primer dimer* ou inespecificidade.



**FIGURA 10** – Gráfico da Curva padrão absoluta com DNA do plasmídeo recombinante. A construção do gráfico apresenta 9 pontos, em duplicatas, de intersecção na reta de regressão linear, com *slope* de 3,282726; *intercept* de 2,756124 e *R2* de 0, 997940.

Para se obter uma eficiência de 100% de amplificação na reação, o valor de *slope* seja de - 3,32 e para R<sup>2</sup>, o valor 1 indica um ajuste perfeito entre a regressão linear e os dados individuais. Considerando que o ensaio realizado apresentou o valor de *slope* de 3,28 e R<sup>2</sup> 0,997940, sendo alcançados 9 pontos no gráfico da reta e em duplicatas, o desempenho da reação foi considerado eficiente, de acordo com os dados gerados na construção da curva padrão absoluta.

A quantificação absoluta é empregada para determinar o número de cópias de DNA das amostras. Assim, foi utilizado o método da curva padrão absoluta que se baseia na comparação de dados obtidos em uma diluição padrão com as amostras desconhecidas, no caso, as amostras coletadas de sangue e órgãos, para determinar a carga viral. Conforme avaliação dos dados obtidos nessa reação foi adotada sob essas condições, a implementação da curva padrão absoluta. Com base no DNA plasmidial recombinante, como padrão e referência, foi determinado o número de cópias das amostras testadas. DECARO et al., 2010, na construção da curva padrão para a região de glicoproteína B do HVC-1, obteve de *slope* de 3,165, sendo considerado eficiente para mensuração.

#### **7.4. Amostras**

Das 139 amostras de sangue colhidas foi obtida positividade em 9 amostras. Nos fragmentos de órgãos de 12 animais, somente 1 animal necropsiado (neonato), os órgãos foram positivos, sendo que o rim do respectivo animal foi utilizado no isolamento viral. As amostras dos animais que foram realizados testes em secreções genitais foram todas negativas, como nas amostras de sangue. A localização e o número de amostras estão apresentados na tabela 3.

**TABELA 3** - Dados das amostras coletadas e o número de amostras positivas

Localidade	Amostras de sangues	Amostras de órgãos	Sangues Positivos	Órgão Positivo
Botucatu	30	5	0	0
Pardinho	6	0	0	0
Arealva	1	0	0	0
Araçoiaba da Serra	25	0	1	0
Campinas	4	0	0	0
São Bernardo do Campo	5	0	0	0
Araçatuba	12	5	0	0
Piratininga	30	2	2	1
Biritiba Mirim	26	0	6	0
<b>Total</b>	<b>139</b>	<b>12</b>	<b>9</b>	<b>1</b>

Os dados dos animais como raça, sexo, idade e a local de procedência, cujas amostras de sangue foram positivas aos testes estão inseridos na Tabela 4.

**TABELA 4** - Dados e procedência dos animais cujas amostras foram positivas

Amostras positivas	Idade	Sexo	Raça	Local
Hvc169 <sup>‡</sup>	1 ano e 6 meses	Fêmea	mestiço Pug	Araçoiaba da Serra
Hvc 199*	21 dias	Fêmea	Bulldogue Inglês	Piratininga
Hvc 201 <sup>‡</sup>	4 anos	Fêmea	Bulldogue Inglês	Piratininga
Hvc 202 <sup>‡</sup>	5 anos	Fêmea	Bulldogue Inglês	Piratininga
Hvc 228 <sup>‡</sup>	3 anos e 7 meses	Fêmea	Boxer	Biritiba Mirim
Hvc 237 <sup>‡</sup>	7 meses	Macho	Boxer	Biritiba Mirim
Hvc 241 <sup>‡</sup>	5 meses	Fêmea	Boxer	Biritiba Mirim
Hvc 242 <sup>‡</sup>	4 meses	Fêmea	Boxer	Biritiba Mirim
Hvc 243 <sup>‡</sup>	4 meses	Fêmea	Basset hound	Biritiba Mirim
Hvc 244 <sup>‡</sup>	3 meses	Macho	Basset hound	Biritiba Mirim

<sup>‡</sup>Amostras de sangue; \* amostras de fragmento de órgãos.

As amostras positivas são de animais provenientes de canis, onde há maior concentração de determinada raça e pertencendo a mesma localidade. Das amostras de sangue colhidas e testadas 68,8% eram de cadelas. Isso se deve ao sistema de criação em canis em que se mantêm poucos machos como reprodutores ou implementam a inseminação artificial. Assim, o predomínio de cadelas que apresentaram positividade em amostras de sangue era esperado.

### 7.4.1. Determinação da carga viral das amostras positivas

Com a construção da curva padrão absoluta foi possível determinar a quantificação da carga viral das amostras positivas, conforme apresentado no quadro 3.

**QUADRO 3-**Quantificação da carga viral das amostras positivas

Amostra		Quantificação qPCR Timidina quinase	qPCR glicoproteína B	snPCR Timidina quinase
Hvc-199	Cérebro	1.15 *	+	+
	Linfonodo submandibular	7,55x10 <sup>2</sup> *	<b>Neg</b>	+
	Pulmão	5,01x10 <sup>3</sup> *	+	+
	Fígado	3,52x10 <sup>2</sup> *	+	+
	Baço	2,41x10 <sup>4</sup> *	+	+
	Rim	5,74x10 <sup>3</sup> *	+	+
	Intestino	1,10x10 <sup>5</sup> *	+	+
Hvc169	2,48x10 <sup>5</sup> ‡	+	+	
Hvc 201	5,35x10 <sup>4</sup> ‡	<b>Neg</b>	+	
Hvc 202	2,91x10 <sup>5</sup> ‡	+	+	
Hvc 228	7,52x10 <sup>2</sup> ‡	+	+	
Hvc 237	1,66x10 <sup>5</sup> ‡	+	+	
Hvc 241	15,35 ‡	+	+	
Hvc 242	155,46 ‡	+	+	
Hvc 243	82,15 ‡	+	+	
Hvc 244	6,72x10 <sup>3</sup> ‡	<b>Neg</b>	+	

\* cópias/μg; ‡ cópias/μL de sangue; **Neg**: negativo.

A quantificação realizada por DECARO et al., 2010, com fragmento de órgãos em cães naturalmente infectados, foi realizada na concentração de DNA contido em 10 μL, aplicada em uma reação de 25 μL, e no presente trabalho foi utilizado 3 μL de DNA em 20 μL de reação. Dessa forma, o número de alvo seria em uma proporção quase 3 vezes maior. No entanto, a quantificação obtida foi próxima, diferindo apenas uma razão de 10 a menos no número de cópias.

Na amostra de sangue do animal HVC241, foi possível detectar DNA do HVC-1 com baixa carga viral, com 15,35 cópias/μL em amostras de sangue e 1,15 cópias/μg em tecido de cérebro. Estes resultados indicam que é possível a implementar a PCR como técnica diagnóstica para HVC-1. Entretanto, Burr e colaboradores (1998) em seu estudo sugerem que o HVC-1 não foi detectado em amostras de sangue de animais com infecção latente por HVC-1, devido à

rara presença de células infectadas (menos de 1 cópia do genoma para cada 2000 células mononucleares), sendo necessário  $5 \times 10^5$  células mononucleares de sangue periférico. Entretanto, para a detecção da infecção latente, deve-se considerar o tempo e a carga viral da infecção. Do período em que ocorreu a infecção lítica e o período de latência, pode ocorrer que as células infectadas não estejam mais circulantes ou vírus estar latente em células nervosas ou em outros sítios. A técnica empregada para detecção do HVC-1 neste trabalho visa a detecção do HVC-1 em infecção ativa em amostras de sangue e não a infecção latente.

#### **7.4.2. Sequenciamento das amostras positivas**

As sequências analisadas das amostras de sangue, tecidos de órgãos e isolamento viral, todas apresentaram identidade de 100% e 99% com HVC-1 para o gene da timidina quinase do *GenBank*<sup>TM</sup> com número de acesso X75765 e AF361075 respectivamente, confirmando a identificação do agente e especificidade dos ensaios utilizados.

#### **7.5. Isolamento viral de tecido renal**

Após 24 horas da inoculação foram observados efeitos citopáticos focais compatíveis com herpesvírus canino, como agrupamento celular em forma de “cachos”, células arredondadas e refringentes, elevação e desprendimento das células da monocamada celular, conforme visualização na figura 10.

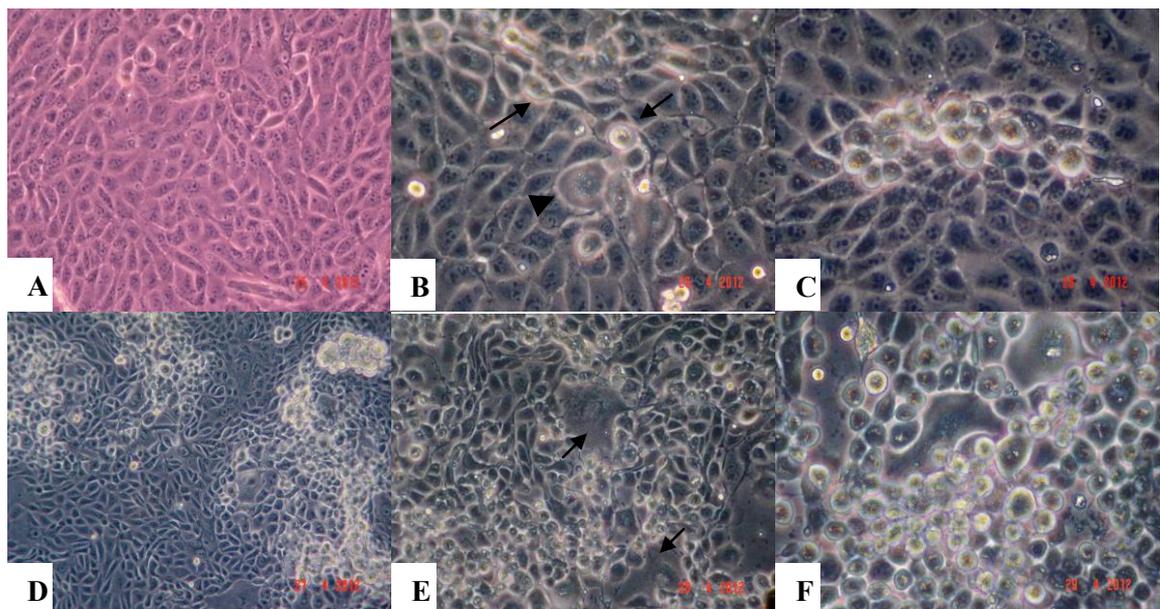
A partir do terceiro dia foram observadas aderências na parede da garrafa da cultura inoculada, nas áreas onde havia os focos de efeito citopático. No quarto dia foi observado células em necrose e presença de suspensão de células mortas. Já no quinto dia pós-inoculação verificou-se o comprometimento de 85% da monocamada de células.

Os efeitos citopáticos observados foram compatíveis aos descritos na literatura e encontrado em outros trabalhos (LUST, 1974; FRANCO e ROEHE,

2007; NAVARRO et al., 2003). O arredondamento celular ocorre devido às alterações na estrutura e função das fibras do citoesqueleto, que podem levar ao desprendimento das células da monocamada celular e em estágios avançados da patologia celular (FLORES, 2007). Algumas células apresentaram tumefação antecedendo a necrose e morte celular pela infecção viral.

Assim, foi possível a observação da característica citolítica e os efeitos citopáticos causados do HVC-1 em cultivos celulares.

O isolamento viral foi confirmado através da qPCR e snPCR para detecção do DNA viral para TK, sendo negativos a PCR para adenovírus canino tipo 1 e 2, e micoplasma. Os produtos da PCR foram purificados e então sequenciamento utilizando a plataforma ABI 3500 (Applied Biosystems) e o kit Big Dye 3.0.

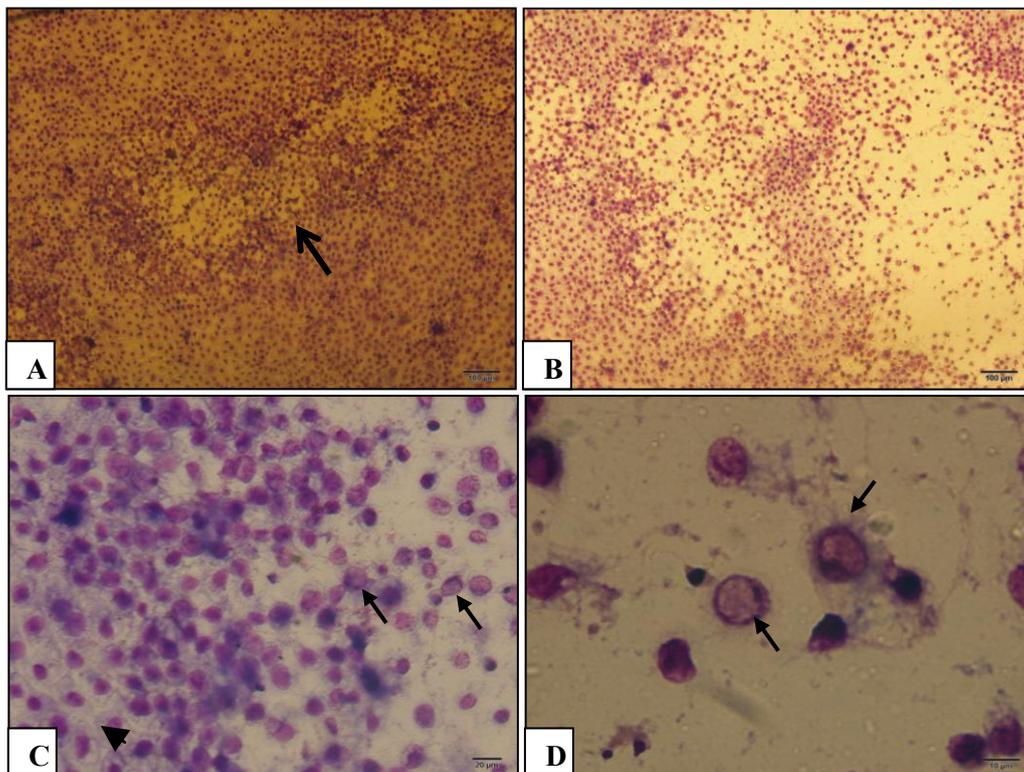


**FIGURA 11** - Cultura de células infectadas com HVC-1 com efeitos citopáticos

**A** - monocamada de células MDCK no dia da inoculação; **B** - 24 horas pós-inoculação com início de ECP com células refringentes e arredondamento (seta), célula em tumefação (cabeça de seta); **C** - foco de ECP característico de HVC-1, com agrupamento das células com aspecto de “cacho de uva” se desprendendo da monocamada celular **D** - 48 horas pós-inoculação, com vários focos de ECP com aspecto de grumos e disseminação do HVC-1 nas células; **E** - com 72 horas pós inoculação com a infecção difusa da monocamada e áreas de destacamento celular (seta); **F** - após 96 horas várias células já em necrose e em suspensão.

Na visualização das células infectadas e coradas com Romanovski May-Grünwald – Giemsa foram observados focos do efeito citopático, semelhante

ao observado no microscópio óptico invertido, em cultura celular infectada em garrafas de 25cm<sup>2</sup>. Devido à degeneração celular e necrose, as células apresentaram arredondamento na morfologia celular, citólise e destacamento de células da monocamada. As células infectadas apresentaram desorganização e marginalização da cromatina para região da membrana perinuclear e o centro do núcleo com aspecto mais claro e pálido, indicando a presença da inclusão viral. A redução da quantidade da cromatina pode ser devido a fatores de inibição ou pela atividade viral intranuclear que utiliza a cromatina na produção da progênie viral (SEBLA et al., 2009; KNIPE et al., 2013). As alterações celulares e efeitos citopáticos são visualizados na figura 12.



**FIGURA 12** – Cultura de células MDCK infectadas HVC-1 corada com Romanovski tipo May-Grunwald-Giemsa. **A-** objetiva de 10X- foco de efeito citopático (seta aberta); **B-** objetiva de 10X, centro de efeito citopático com área de destacamento de células arredondadas; **C-** Objetiva 40 X - visualização de células com inclusão viral (setas) ; células se soltando da monocamada celular e células ainda íntegras na monocamada de células (cabeça de seta) ; **D-** objetiva 100X (com óleo de imersão) - visualização de células com marginalização da cromatina para região perinuclear, núcleo da célula pálido e claro, indicando a presença de inclusão viral na célula (seta).

Na PCR, não foram obtidas positividade nas amostras de célula e no inóculo, para micoplasma e adenovírus tipo 1 e 2. Tendo em vista, que estes

agentes são considerados contaminantes de cultura celular (SPERTZEL et al., 1965; KUPPEVELD, et al., 1994). Além disso, o adenovírus canino pode produzir efeitos citopáticos em culturas de células MDCK, e causar a morte em filhotes caninos (ALMES, 2010).

As lesões renais são encontradas com frequência em cães infectados, que podem estar relacionadas à maior susceptibilidade renal a infecção por HVC-1, em relação aos outros órgãos (PERCY, 1971).

Corpúsculos de inclusões virais de adenovírus canino tipo 1 e morbilivírus canino, foram detectados em tecidos renais de cães com alterações neste órgão à necropsia (INKELMANN et al., 2012). Isso pode estar relacionado à permissividade desses tipos celulares a esses agentes virais (WEHNER e SMITH, 1983). Essas considerações corroboram com os resultados encontrados, em que foram detectados mais DNA viral em tecidos renais, também demonstrado por DECARO et al. (2010). Dessa forma, favorecendo o isolamento viral a partir deste órgão em células de cultivo de linhagem renal de cão (MDCK). Tendo em vista, que outras tentativas de isolamento do HVC-1 haviam sido realizadas em outros estudos, no entanto, sem sucesso (HASHIMOTO e HIRAI, 1984; ÁVILA et al., 2009; GADSDEN, et al., 2013).

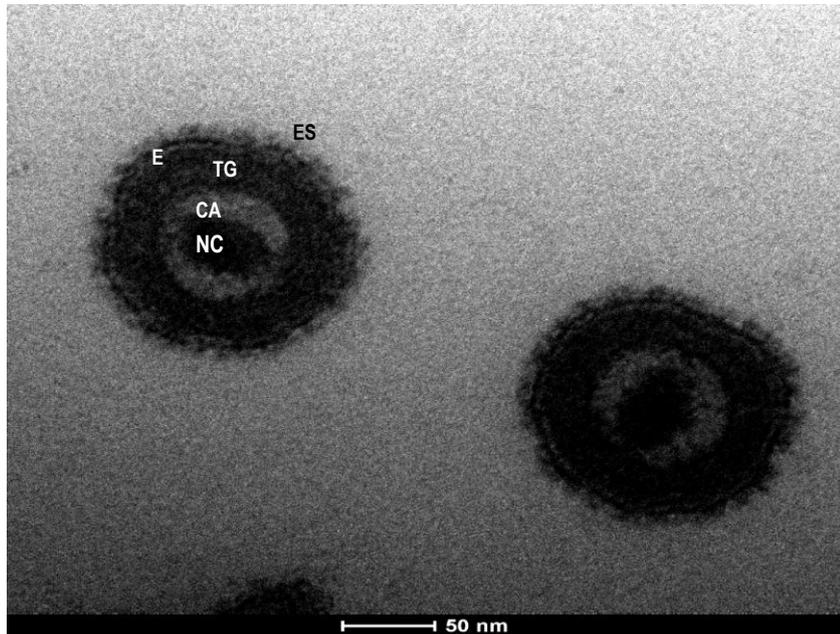
## **7.6. Microscopia Eletrônica de Transmissão**

As partículas do HVC-1 observadas pela microscopia eletrônica de transmissão apresentaram nucleocapsídeo denso contidos pelo tegumento, e envolto pela membrana do envelope com glicoproteínas virais em sua superfície, com aproximadamente 150nm (figura 13), semelhante ao encontrado por outros autores (STRANDBERG e CARMICHAEL, 1965; SPERTZEL et al., 1965; SMITH et al., 1968). No entanto, o tamanho dos alfa herpesvírus estimado pela contrastação negativa varia de 120 a 300nm. Isso se deve a variabilidade da espessura do tegumento e também pode ser atribuída a integridade do envelope, que os tornam impermeáveis e mantêm a forma semi-esférica. Vírions com envelopes danificados são permeáveis a

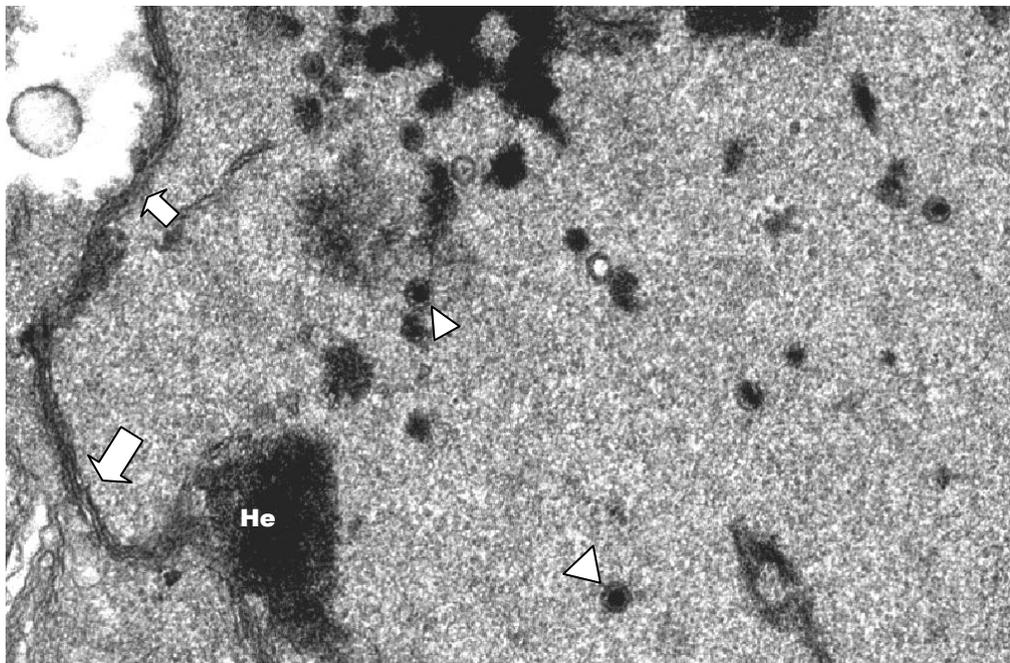
contrastação e apresentam aspecto de “ovo frito” (*sunny-side up*) com forma irregular e diâmetro geralmente maior que um vírion íntegro (ROIZMAN e FURLONG, 1974). Em algumas células observou-se a presença de vírus nu, somente com o capsídeo na região intranuclear (figura 14). Isso se deve a síntese de DNAs virais e montagem dos capsídeos que ocorrem somente no núcleo, mas alguns herpesvírus podem ser de-envelopado e re-envelopado enquanto transitam através do citoplasma (ROIZMAN e BAINES, 1991).

Como na microscopia óptica, também foram visualizados os núcleos celulares mais claros, com pouca presença da cromatina e migração para região perinuclear, alguns focos de heterocromatina são descritos como “coagulação” da cromatina. As alterações da cromatina podem ser atribuídas à atividade de replicação viral (KNIPE et al., 2013), visualizado na figura 15-A. Em algumas células infectadas, verificou-se a reduplicação da membrana nuclear, com regiões de invaginações e cariorrexe, também encontrado por Strandberg e Aurelian (1969), conforme mostrado em figura 15-B. O citoplasma apresentou sinais de degeneração e numerosas vesículas de vários tamanhos. As mitocôndrias apresentaram aumentadas e alterações nas membranas.

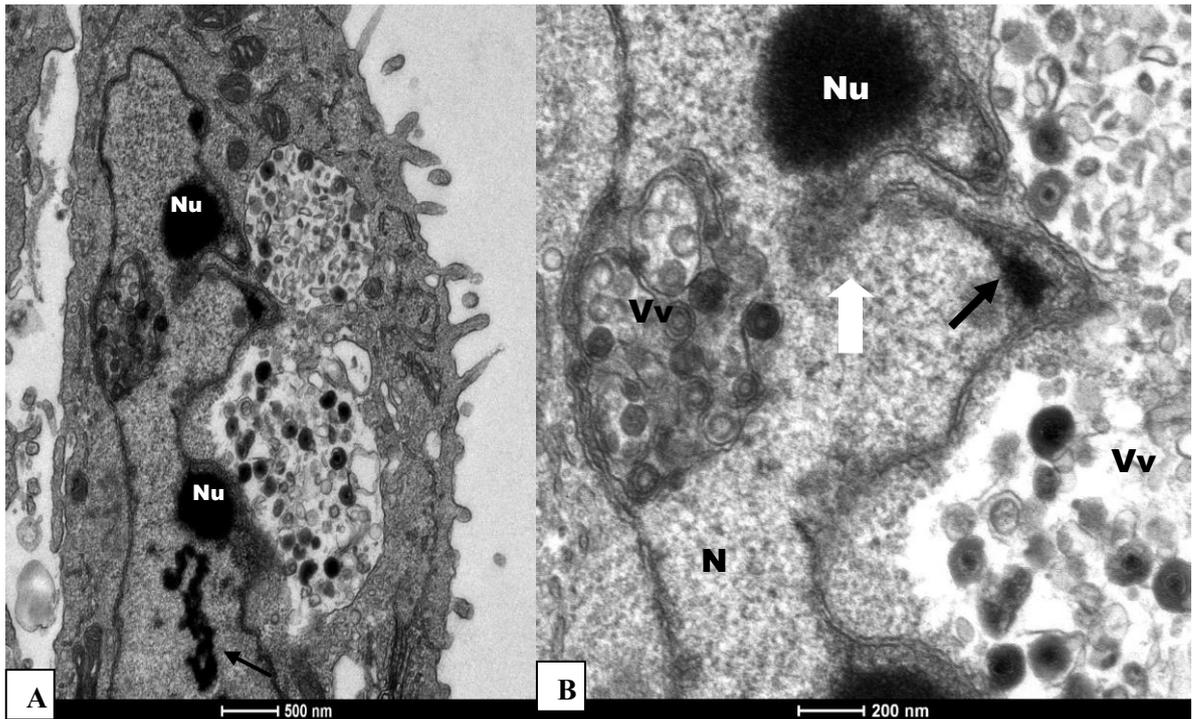
Os capsídeos cheios ou vazios são notados pela diferença de densidades indicando presença do genoma e /ou polipetídeos virais, observados também por Schrag et al. (1989). Na figura 16, observa-se alguns vírions contidos em vesícula, tanto intranuclear como no citoplasma, e livres no citoplasma, também visualizado por Johnson et al., 1970. Na figura 17, observa-se vírions deixando a célula hospedeira em região periférica do citoplasma e vesículas margeando a membrana.



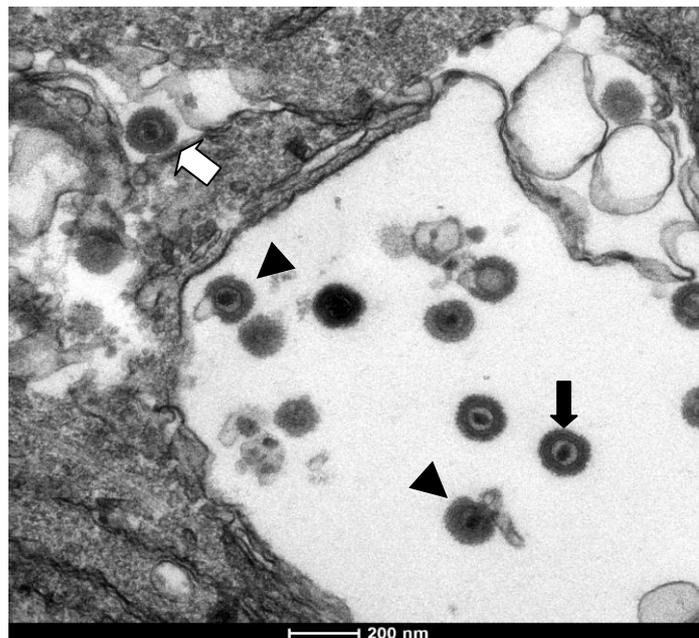
**FIGURA 13** – Víriões do HVC-1 visualizando as estruturas virais na microscopia eletrônica de transmissão. **NC** - nucleocapsídeo; **CA** - capsídeo; **TG** - tegumento; **E** - envelope; **ES**- Espículas de glicoproteínas da superfície do envelope.



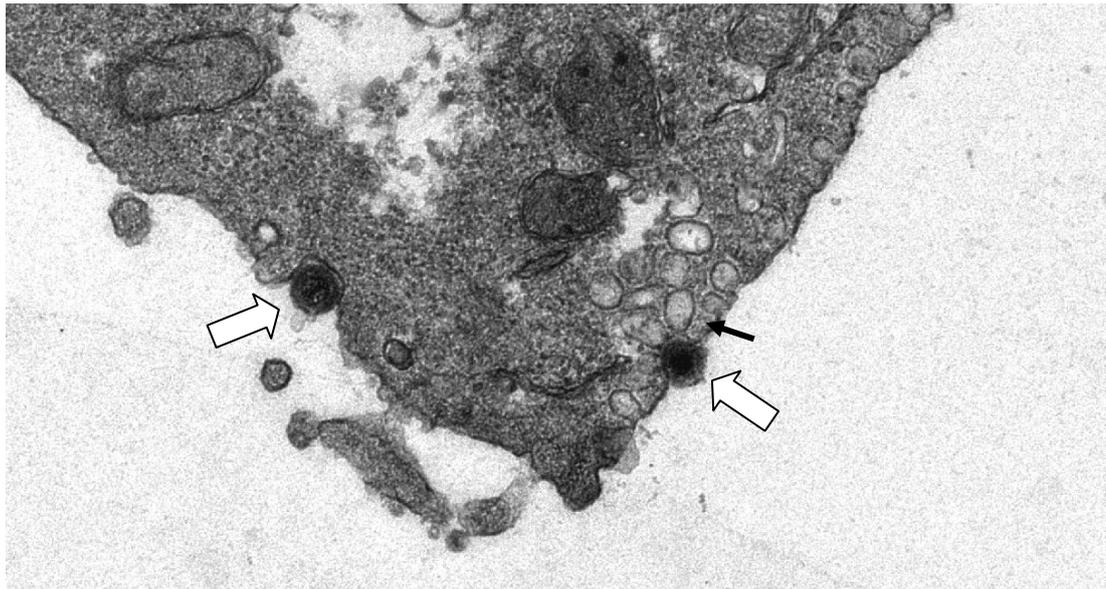
**FIGURA 14** - Nucleocapsídeos em nucleoplasma celular. Núcleo celular claro devido à marginalização da heterocromatina (He) para região perinuclear, membrana nuclear reduplicada (seta) branca, presença dos nucleocapsídeos (cabeça de seta branca) no núcleo da célula hospedeira.



**FIGURA 15** – Presença de vesículas contendo partículas virais intranuclear e citoplasmática. **A** – vesículas virais (Vv) núcleo claro e pálido devido a pouca quantidade de cromatina, também se apresenta com aspecto coagulada (seta), nucléolos localizados na periferia do núcleo celular (Nu) e mitocôndria aumentadas (seta); **B** – Núcleo celular anisocariótico (N) e Nucléolo (Nu), presença de invaginação da membrana nuclear (seta branca), marginalização da cromatina (seta preta) e vírion margeando a membrana contido em vesícula (cabeça de seta) e Vv – vesículas virais.



**FIGURA 16** - Vírions em vesículas, com nucleocapsídeo denso com conteúdo genômico viral (seta preta) e vírions se rompendo (cabeça de seta) e vírion livre no citoplasma (seta branca).



**FIGURA 17** – Vírions invaginados na membrana citoplasmática (seta branca), presença de várias vesículas (seta) margeando a membrana celular na face intracelular.

Alterações celulares observadas na microscopia óptica foram semelhantes às observadas em outros trabalhos (CARMICHAEL et al., 1965, AURELIAN e STRANDBERG, 1969; SMITH et al., 1970; POST, 1972), e correspondem com alterações descritas também por outros herpesvírus. A MET confirmou e evidenciou algumas alterações celulares observadas na MO, como ausência de eucromatina, além da redução e marginalização da heterocromatina para região perinuclear, resultante da atividade e replicação viral. Essas alterações nas estruturas celulares induzidas pela infecção e atividade viral foram descritas, por alguns autores, como corpúsculo de inclusão viral (CARMICHAEL et al., 1965; JOHNSON et al., 1969; JOHNSON et al., 1970).

## 7.7. Titulação Viral

A titulação viral por diluição limitante, nas três técnicas empregadas, produziu resultados semelhantes. A  $DICT_{50}$  refere-se à quantidade de um agente patogênico que irá produzir alteração patológica em 50% das culturas de células inoculadas. Para realizar o cálculo da  $DICT_{50}$  foi utilizando o método

proposto por REED e MUNCH, 1938. Na cultura de placa com meio VP-SFM a  $DICT_{50}$  obtida foi de  $10^{4,49}$  /mL. Na cultura de células em placa com meio DMEM suplementado com SFB a 1% a  $DICT_{50}$  foi de  $10^{4,566}$ /mL, e na cultura de célula em tubo foi  $10^{4,5995}$ /mL.

A titulação viral com meio VP-SFM, os sobrenadantes das diluições, submetidos a qPCR apresentaram baixo número de cópias e foi detectado somente até a diluição  $10^{-2}$ . Nas diluições até  $10^{-3}$ , havia efeito citopáticos evidentes, em todas as réplicas. A titulação em placa com soro, foi se obteve maior número de cópias de DNA viral pela qPCR. Nas três técnicas, o efeito citopático foi observado até a diluição na  $10^{-3}$ , conforme apresentado no tabela 5. Após a diluição  $10^{-3}$ , não houve amplificação e detecção na qPCR, nas técnicas que continham soro. As titulações realizadas com soro apresentaram concordância, entre o efeito citopático e a quantificação da carga viral pela qPCR.

**TABELA 5** - A carga viral das diluições nas três técnicas de titulação pela qPCR.

Diluição do Inóculo	Tubos DMEM	Placa DMEM	Placa VP-SFM
$10^{-1}$	$1,01 \times 10^6$	$3,75 \times 10^6$	$9,33 \times 10^4$
$10^{-2}$	$2,96 \times 10^5$	$3,34 \times 10^5$	$1,04 \times 10^2$
$10^{-3}$	$5,73 \times 10^3$	$1,75 \times 10^4$	-

Dessa forma, para se obter a quantidade viral necessária, na técnica em tubos para a  $DICT_{50}$  de  $10^{4,5666}$  seria de 5.733,38 cópias/ $\mu$ L, e em placa para  $DICT_{50}$  de  $10^{4,555}$  de  $1,75 \times 10^4$  cópias / $\mu$ L. .

Os baixos valores de titulação viral obtidos nas técnicas avaliadas podem ser atribuídos à característica de alguns herpesvírus com relação á baixa replicação (ROIZMANN et al., 1992). Percy et al. (1971) em isolamento viral de fragmento de órgãos (fígado, rim, pulmão e baço) de cães infectados experimentalmente, obteve infectividade somente até a diluição  $10^{-1}$ .

## 8. Conclusões

As técnicas moleculares empregadas para o diagnóstico do HVC-1 foram padronizadas. A snPCR e a qPCR apresentaram especificidade e sensibilidade, suficientemente capazes de detectar o agente, com baixo número de cópias de DNA viral contida na amostra. Ambas as técnicas permitiram implementar o diagnóstico da infecção. No teste de sensibilidade analítica tanto na qPCR como na snPCR foi detectado o HVC-1 até a diluição  $10^{-6}$  em amostras biológicas ou 15,35 cópias do DNA viral por  $\mu\text{L}$  de sangue e 1,15 cópias/ $\mu\text{g}$  de fragmento de cérebro. Entretanto, a qPCR apresenta a vantagem de ser uma técnica mais prática e segura, que permite quantificar e determinar a carga viral das amostras testadas.

O isolamento viral do HVC-1 foi realizado com sucesso permitindo a visualização dos efeitos citopáticos característico, das estruturas virais e das alterações intracelulares nas células hospedeiras.

Na análise das sequências do DNA, observa-se que o agente apresentou 100% de identidade com sequência do HVC-1 já publicada.

As três modificações realizadas na titulação viral por diluição limitante apresentaram resultados semelhantes. No entanto, a técnica em placa com meio DMEM suplementado SFB apresentou a maior produção viral, além de ser a técnica mais prática. Houve diminuição na produção de partículas virais quando se utilizou o meio livre de soro fetal bovino.

O presente trabalho verificou que foi possível detectar o HVC-1 no estado de São Paulo.

## 9. Referências Bibliográficas

ACAR, A.; GUR, S.; DOGAN, I.; AKCA, Y. A serologic investigation of Canine Herpesvirus Type 1 in Kangal dogs. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, v.8, n.7, p.1377-1380, 2009.

AVILA, V.P.F.; RODRIGUES, N.C.; CESARO, C.; ESMERALDINO, A.T.; FALLAVENA, L.C.B.; BRAGA, A.C.; CERVA, C. Herpesvirus canino em filhotes da raça Golden Retriever - relato de caso. *Clínica Veterinária*, Ano 16, n.92, p.52-56, 2011

ALMES, M.K.; JANARDHAN, K.S.; ANDERSON, J.; HESSE, R.A.; PATTON, K.M. Fatal canine adenovirus Pneumonia in two litters of bulldog. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 22; p.780-784, 2010.

BRUM, M.C. e WEIBLEN R. Detecção, Identificação e Quantificação de Vírus In: FLORES, E.F. *Virologia Veterinária*, Editora UFSM, Santa Maria, p.80, 2007.

BURR, P.D.; CAMPBELL, M.E.M.; NICOLSON, L.; ONIONS, D.E. Detection of canine herpesvirus 1 in a wide range of tissue using the polymerase chain reaction. *Veterinary Microbiology*, v.53, p.227-237, 1996.

CARMICHAEL, L.E.; SQUIRE, R.A.; KROOK, L. Clinical and pathological features of a fatal disease of newborn pups. *American Journal of Veterinary Research*, v.26, p.803-814, 1965a.

CARMICHAEL, L.E.; STRANDBERG, J.D.; BARNES F.D. Identification of a cithopatogenic agent infectious for puppies as canine herpesvirus. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, v. 120, p. 644-650, 1965b.

CARMICHAEL, L.E. Herpesvirus canis: aspects of pathogenesis and immune response. *Journal American Veterinary Medicine*, v. 156, p.1714-1721, 1970.

CONNOLLY, S.A.; JACKSON, J.O.; JARDTZKY, T.S.; LONGNECKER, R. Fusing structure and function: a structural view of the herpesvirus entry machinery. *Nature*, v. 9, p.369-381, 2011.

DAHLBOM, M.; JOHNSON, M.; MYLLYS, V.; TAPONEN, J.; ANDERSSON, M. Seroprevalence of Canine Herpesvirus-1 and *Brucella canis* in Finnish Breeding Kennels with and without Reproductive Problems. *Reproduction in Domestic Animal*, v.44, p. 128-131, 2009.

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

DECARO, N.; AMORISCO, F.; DESARIO, C.; LORUSSO, E.; CAMERO, M.; BELLACICCO, A.L.; SCIARETTA, R.; LUCENTE, M.S.; MARTELLA, V.; BUONAVOGLIA, C. Development and validation of a real-time PCR assay for specific and sensitive detection of canid herpesvirus 1. *Journal of Virology Methods*, n. 169, p.176-180, 2010.

INKELMANN, M.A.; KOMMERS, G.D. TROST, M.E.; BARROS, C.S.L.; FIGHERA, R.A.; IRIGOYEN, L.F.; SILVEIRA, I.P. Lesões do sistema urinário em 1063 cães. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.32, n.8, p.761-771, 2012.

OIE - capítulo 1.1.1-Collection and shipment of diagnostic specimens. Site: The World Organisation for Animal Health (OIE). Disponível em: [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/1.01.05\\_VALIDATION.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.05_VALIDATION.pdf) . Acessado em: 20 ago.2012.

OIE - capítulo 1.15-Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases do manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Disponível no site: The World Organisation for Animal Health (OIE).Disponível em: [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/1.01.05\\_VALIDATION.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.05_VALIDATION.pdf). Acessado em: 01 out. 2012.

FLORES, E.F. Patogenia das infecções víricas. In: \_\_\_\_\_. *Virologia Veterinária*, Santa Maria: UFSM, 2007, cap. 8, p.191-235.

DE PALMA, V.E.; AYALA, M.A.; GOBELLO, C.; ECHEVERRIA, M.G.; GALOSI, C.M. An atypical clinical presentation for the first isolation of Canid herpesvirus 1 in Argentina. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.62, n.5, p.1267-1270, 2010.

EURICAN HERPES 205, Lyon France: Merial. bula.

FRANCO, A.C.; ROEHE, P.M. Herpesviridae. In: FLORES, E.F. *Virologia Veterinária*, Santa Maria: UFSM, 2007, cap.17, p.435-480.

GADSDEN, B.J.; MAES, R.K.; WISE, A.G.; KIUPEL, M.; LAGOHR, I.M. Fatal *Canid herpesvirus 1* infection in a adult dog. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.24, n.4, p.604-607, 2012.

GREENE, C.E. Canine herpesvirus infection. In: \_\_\_\_\_. *Infectious Disease of the Dog and Cat*. 4. ed. Missouri: Elsevier, 2012, chap. 5, p. 48-54,

HASHIMOTO, A.; HIRAI, K.; OKADA, K.; FUJIMOTO, Y. Pathology of the placenta and newborn pups with suspected intrauterine infection of canine herpesvirus. *American Journal of Veterinary Research*.v.40, n.9, p. 1236-1240, 1979.

HASHIMOTO, A.; KATSUYA H. Pathological Finding in a surviving pup transplacentally infected with canine herpesvirus. *Research Bulletin of Faculty of Agriculture of Gifu University*, v. 49, p.391-399, 1984.

HÖLST, B.S.; GUSTAVSSON, M.H.; GRAPPERON-MATHIS, M.; LILIEHÖÖK, I.; JOHAMISSON, A.; ISAKSSON, M.; LINDLE, A.; AXNER, E. Canine herpesvirus during pregnancy and non-pregnant luteal phase. *Reproduction in Domestic Animals*, v.47, p.362-365, 2012.

HONESS, R.W.; WATSON, D.H. Unit and Diversity in the herpesvirus. *Journal of General Virology*, v.37, p.15-37, 1977.

HU, R.L.; HUANG, G.; QIU, W.; ZHONG, Z.F.; XIA, X.Z.; YIN, Z.; Detection and differentiation of CAV-1 and CAV-2 by polymerization Chain Reaction. *Veterinary Research Communication*, v.25, p.77-84, 2001.

International Committee on Taxonomy of Viruses - Virus Taxonomy: 2012 release current. Disponível em : <http://www.ictvonline.org/virus-taxonomy>. Acessado em: 20/05/2013.

JOHNSON, G.R.; KOESTNER, A.; KINDIG, O.; SHADDUCK, J.A. Effects of a pathogenic canine herpesvirus on established thyroid adenocarcinoma cell culture. *Veterinary Pathology*, v.6, p.289-309, 1969.

JOHNSON, G.R.; KOESTNER, A.; KINDIG, O.; LONG, J.F. Effects of a pathogenic canine herpesvirus on canine brain cell culture and cerebellar explants. *Acta Neuropathology*, v.15, p.97-113, 1970.

KARLIN, S.; MOCARSKI, E.S.; SCHCHTEL, G.A. Molecular evolution of herpesviruses: Genomic and Protein Sequence Comparisons. *Journal of Virology*, v.68, n.3, p.1886-1902, 1994.

KAWAKAMI, K.; OGAWA, H.; MAEDA, K.; IMAI, A.; OHASHI, E.; MATSUNAGA, S.; TOHYA, Y.; OHSHIMA, T.; MOCHIZUKI, M. Nosocomial outbreak of serious canine herpesvirus infectious tracheobronchitis (Kennel cough) caused by canine herpesvirus infection, *Journal of Clinical Microbiology*, v. 48, n.4, p. 1176-1181. 2010.

KING, A.M.; ADAMS, M.J.; CARSTENS, E.B.; LEFKOWITZ, E.J. Virus Taxonomy – Ninth Report of the International Committee of Taxonomy of Viruses, *Elsevier*, Estados Unidos da America, v.61, np. 114, 2012.

KROGENÆS, A.; ROOTWELT, V.; S. LARSEN, S.; SJØBERG, E.K.; AKSELSEN, B.; SKÅR, T.M.; MYHRE, S.S.; RENSTRÖM, L.H.M.; KLINGEBORN, B.; LUND, A. A serologic study of canine herpes virus-1 infection in the Norwegian adult dog population, v.78, p.153-158, 2012.

LELAND, D.; LANDRY, M.L. Virus isolation. In: JEROME, K.R. Lennette's Laboratory Diagnosis of viral infections. 4. ed. New York: Informa Healthcare, 2010. chap.7, p.98-112.

LEDBETTER, E.C.; KIM, S.G.; DUBOVI, E.J.; BICALHO, R.C. Experimental reactivation of latent canine herpesvirus -1 and induction of recurrent ocular disease in adult dogs. *Veterinary Microbiology*, v. 138, p.98-105, 2009.

LEDBETTER, E.C. Canine Herpesvirus-1 ocular diseases of mature dogs. *New Zealand Veterinary Journal*. E-pub ahead of print, p.1-9, 2013.

LIEBERMAN, P.M. Chromatin regulation of virus infection. *Trends in Microbiology*, v.14, n.3, p.132-139, 2006.

LIMBERY, A.J.; THOMPSON, R.C.A. The molecular epidemiology of parasite infections: toll and applications. *Molecular e Biochimecal Parasitology*, v.181, p.102-116, 2012.

LIU, J.; SHI, X.; SCHWARTZ, R.; KEMBLE, G. Use of MDCK cells for production live attenuated influenza vaccine. *Vaccine*, v. 27, p.6460-6463., 2009.

LOPEZ, A. Sistema Respiratório. In: McGAVIN, M.D. e ZACHARY, J.F. Bases da Patologia em Veterinária. 4 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007, cap.5, p.466-558.

LUST, G. CARMICHAEL, L. Properties of canine herpesvirus DNA. Abstract. *Experimental Biology and Medicine*, v.46, n.1, p.213-217, 1971.

MANNING, A; BUCHAN, G.R.B.; SKINNER, G.R.B.; DURHAM, J.; THOMPSON, H. The immunological relationship between canine herpesvirus and four other herpesvirus, *Journal of General Virology*, v.69, p.1601-1608.1988.

METTENLEITER, T.C.; KLUPP, B.G.; GRANZOW, H. Herpesvirus assembly: An update. *Virus research*, v. 143, p.222-232, 2009.

MUSAYEVAL, K.; ŠENGAUT, J.; PETKEVIČIUS, S.; MALAKAUSKAS, A.; GERULLIS, G.; ŠALOMSKAS, A. Seroprevalencia of canine herpesvirus in Lithuanian dog population. *Veterinarija ir zootechinka*, v. 61, n.83, p.48-52, 2013.

NAVARRO, C.; CELEDÓN, M.; PIZARRO, A. Detección de virus herpes canino tipo 1 no Chile. *Archivos de Medicina Veterinaria*, v.35, n.2, 2003

NAVARRO, C.; CELEDÓN, M.; PIZARRO, J.; GAGGERO, A. Virus herpes canino en Chile: propiedades biológicas. *Archivos de Medicina Veterinaria*, v.37, n.2, 2005.

OLIVEIRA E. C.; SONNE, L.; BEZERRA JÚNIOR, P.S.; TEIXEIRA, E.M.; DEZENGRINI, R.; PAVARINI, S. P.; FLORES, E.F.; DRIEMEIER, D. Achados clínicos e patológicos em cães infectados naturalmente por

herpesvírus canino1. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, n. 29, p. 637-642, 2009.

PATEL, J.R.; HELDENS, J.G.M. Review of companion animal viral disease and immunoprophylaxis. *Vaccine*, v.27, p.491-504, 2009

PERCY, D.H.; OLANDE, J.; CARMICHAEL, L.E. Encephalitis in the Newborn pup due to a canine hepesvirus. *Pathology Veterinary*, v.5, p.135-145, 1968.

PERCY, D.H.; CARMICHAEL, L.E.; ALBERT, D.M.; KING, J.M. Lesions in puppies surviving infection with canine herpesvirus. *Veterinary Pathology* v.8; p.37-53, 1971.

POSTE, G.; LECATSAS, G.; APOSTOLOV, K. Electron microscope study of the morphogenesis of a new canine herpesvirus in dog kidney cells. *Archiv Für Die Gesamte Virusforschung*, v.39, p.317-329, 1972.

POSTE, G. Characterization of a New Canine Herpes Virus. *Archiv für die gesamte Virusforschung*, v. 36, p.147-157, 1972.

READING, M.J.; FIELD, H.J. Detection of high levels of canine herpes virus-1 neutralising antibody in kennel dogs using a novel serum neutralisation test. *Research in Veterinary Science*. v. 66, n. 3, p. 273–275, 1999.

REED, L.J.; MÜNCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *The American Journal of Hygiene*, v.27 n.3, p.493- 497, 1938.

REUBEL, G.H.; PEKIN, J.; WEBB-WAGG K.; HARDY, C.M. Nucleotide sequence of glycoprotein genes B,C,D, G, H and I the thymidine kinase and protein kinase genes and gene homologue ul24 of Australian isolate of canine herpesvirus. *Virus Gene*, v.25, p. 195-200, 2002

RIJSEWIJK, F.A.M.; LUITEN, E.J.; DAUS, F.J.; HEIJDEN, R.W.V.D.; OIRSCHOT, J. T.V. Prevalence of antibodies against canine herpesvirus 1 in dogs in The Netherlands in 1997–1998. *Veterinary Microbiology*, v.65, n.23, p.1–7, 1999.

ROIZMAN B., FURLONG, D. The replication of herpesvirus. In: FRAENKEL-CONRAT H, WAGNER, R.R. *Comprehensive virology*, v. 3, p. 229-403, 1974.

ROIZMAN, B.; BAINES, J. The diversity and unit of *Hespeviridae*. *Compendium of Immunology and Microbiology of Infectious Disease*, v. 14, n.2, p. 63-17, 1991.

ROIZMANN, B.; DESCROSIERS, R.C.; FLECKENSTEIN, B.; LOPEZ, C.; MINSON, A.C.; STUDDERT, M.J., The family Herpesviridae: an update. *Archive of Virology*, v.123, p.425-449, 1992.

ROIZMAN, B. The Family Herpesviridae. In: ROIZMAN, B.; WHITLEY, R.J. LOPEZ, C. *The Human Herpesviruses*. New York: Raven Press, 1993. chap. 1, p.1-9.

RON SSE, V.; VERSTEGEN, J.; ONCLIN, K.; GUIOT, A.L.; NAUWYNCK, H.J.; POULET, H. Seroprevalence of canine herpesvirus-1 in the Belgian dog population in 2000. *Reproduction in Domestic Animals*, v.37, n.5, p.299-304., 2002.

RON SSE, V.; VERSTEGEN, J.; THIRY, E.; ONCLIN, K.; AEBERLE, C.; BRUNET, S.; POULET, H. Canine herpesvirus-1 (CHV-1): clinical, serological and virological patterns in breeding colonies. *Theriogenology*, v. 64, p. 61-74, 2005.

SAMBROOK, J; RUSSELL, W. D. In vitro amplification of DNA by the polymerase chain reaction. In:\_\_\_\_. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. p. 8.1-8.126.

SCHRAG, J.D.; PRASAD, B.V.V.; RIXON, F.J.; CHIU, W. Three dimensional structure of the HSV-1 nucleocapsid. *Cell*, v.56, p. 651-660.

SEO, I.B.; SEONG, W.W.; LIM, C.H. Survey on the seroepidemiology of canine herpesvirus infection in Korea. *Korean Journal of Veterinary Research*, v. 34, p.647-652, 1994.

SESSO, A., Fixação de sistemas biológicos. In:\_\_\_\_.Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às Ciências Biológicas, Souza, W. Sociedade Brasileira de Microscopia,p.14-15, 1998.

SMITH, R.F.; YAMASHIROYA, H.M.; MAGIS, J.M. Recovery of a canine herpesvirus from primary kidney culture derived from a closed dog colony. *Applied Microbiology*, v.20, n.3, p.523-526.

SOUZA, W.; MACHADO, R.D.; Desidratação, Inclusão, Ultramicrotomia e Contratação. In:\_\_\_\_. Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às Ciências Biológicas, Souza, W. Sociedade Brasileira de Microscopia, p.22-27, 1998.

SPEAR, P.; LONGNECKER, R. Herpesvirus entry: an Update. *Journal of Virology*, v.77, n.9, p.10179-10185.

SPERTZEL, R.O.; HUXSOLL, D.L.; McCONNEL, S.J.; BINN, L.N.; YAGER, R.H. Recovery and characterization of a Herpes-like from dog kidney cell culture. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. V. 120, p. 651-655, 1965.

STRANDBERG, D. J.; AURELIAN, L. Replication of canine herpesvirus- II Virus development and Release in infected dog kidney cells. *Journal of Virology*, v.4, n.4, p.480-489, 1969.

SCHULZE, C; BAUMGÄRTNER, W. Nested Polymerase Chain Reaction and In Situ Hybridization for Diagnosis of Canine Herpesvirus Infection in Puppies. *Veterinary Pathology*, n.35, p. 209-217, 1998

VAN KUPPEVELD, F.J.M.; LOGT, J.T.M.; ANGULO, A.F.;QUINT, W.G.; NIESTER, H.G.; GALAMA, J.M.; MELCHER, W.J. Genus and species identification of micoplasma by 16S RNA amplification. *Applied Environmental Microbiology*, v.58, n.8, p.2606-2615, 1992.

VAN KUPPEVELD, F.J.M.; JOHANSSON, K. GALAMA, J.M.D.; KISSING, J.; BOLSKE, G.; VAN DER LOGT, J.T.M.; MELCHER, W.J.G. Detection of mycoplasma contamination in cell by mycoplasma group-specific. *Applied Environmental Microbiology*, v.60, n.1, p.149-152, 1994.

VAN WIELINK, R.; KANT-EENBERGEN, H.C.M.; HARMSEN,M.M.; MARTENS, D.E.; WIJFFELS, R.H.; COCO-MARTIN, J.M. Adaptation of a Madin-Darby canine kidney cell line to suspension growth in serum-free media and comparison of its ability to produce avian influenza virus to Veto and BHK21 cell lines. *Journal of Virological Methods*, v.171, p.53-66, 2011.

VERSTEGEN, J.; DHALIWAL, G.; K. VERSTEGEN-ONCLIN, K. Canine and feline pregnancy loss due to viral and non-infectious causes: A review. *Theriogenology*, v. 70, 304-319, 2008.

VRIONI,G.; KALOGEOPOULOS, C.; GARTZONIKA,C.; PRIAVALU, E.; LEVIDIOTOUS, S. Usefulness of Herpes Consensus PCR methodology to routine diagnostic testing for herpesviruses infections in clinical specimens, *Virology Journal*, v.4, n.59, 2007.

WEHNER, R.W.; SMITH, R.D. Progressive cytomegalovirus glomerulonephritis - an experimental model. *American Journal of Pathology*, v.112, n.8, p.313-325, 1983.

ZANELLA, J. R. C; FLORES, E.F. Vacinas com marcadores antigênicos contra o vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina e o vírus da doença de Aujeszky. *Ciência Rural* , v.25, n.2, 1995.

**10. Trabalho para ser enviado à revista *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science***

**Isolamento viral e identificação molecular do herpesvírus canino**

***Viral isolation and molecular identification of canine herpesvirus***

Jacqueline Kazue Kurissio<sup>1‡</sup>, João Pessoa Araújo Júnior<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu-SP, Brasil.

\* Correspondência para o autor: João Pessoa Araújo Jr., Laboratório de Virologia e Diagnóstico Molecular, Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Distrito de Rubião Jr. S/Nº, caixa postal 510, CEP 18618-970, Botucatu-SP, Brasil; fone 55 14 3880-0422, FAX 55 14 3815-3744; e-mail: [jpessoa@ibb.unesp.br](mailto:jpessoa@ibb.unesp.br)

‡ Contato via e-mail : [jkkurissio@yahoo.com.br](mailto:jkkurissio@yahoo.com.br)

**Resumo**

O herpesvírus canino tipo 1 (HVC-1) causa uma enfermidade infecto-contagiosa que acomete cães em todo o mundo. É considerado o responsável por causar problemas reprodutivos, infecções respiratórias, oculares, neurológicas e até morte em neonatos e adultos imunossuprimidos. Este trabalho tem como objetivo isolar o HVC-1, utilizar técnicas moleculares para auxiliar a determinação do título do HVC-1 em células MDCK. Para isso, foi utilizado fragmento de rim de um filhote neonato que veio a óbito com suspeita de HVC-1. As amostras de tecidos do animal foram submetidas a snPCR (*seminested* PCR) apresentando positividade ao teste. No isolamento viral foi

---

possível observar efeitos citopáticos característicos do agente. Na microscopia óptica (MO), foram identificadas alterações na morfologia celular, causado pela infecção e replicação viral na célula. As estruturas virais e as alterações intracelulares, características das infecções por herpesvírus.

**Palavras chaves:** herpesvírus canino, herpesvírus, isolamento viral, diagnóstico, vírus.

## **Abstract**

The canine herpesvirus type 1 (CHV-1) causes an infectious disease that affects dogs worldwide. It is considered to be responsible to cause reproductive problems, respiratory infections, ocular, neurological and even death in newborns and immunocompromised adults. This study aims to isolate CHV-1 using molecular techniques as support in determining the title of CHV-1 in MDCK cells. For this, we used a fragment of kidney from a newborn that died with suspected HCV-1. Were accomplished snPCR (seminested PCR) in animal tissue samples showed positivity. In the viral isolation was possible to observe cytopathic effects characteristic of the agent. In optic microscopy, we identified changes in cell morphology caused by viral infection and replication in the cell. The viral structures and intracellular changes, characteristics of herpesvirus infections were observed in the electron microscope. The gene sequence of the viral thymidine kinase showed 100% identity with the HCV-1 already

**Keywords:** canine herpesvirus; herpesvirus; viral isolation, diagnosis

## **Introdução**

O herpesvírus canino pertence à família *Herpesviridae*, da subfamília *Alphaherpesvirus*, e gênero *Varicellovirus*, sendo canídeo específico, ou seja, cães, raposas e coiotes podem ser infectados por HVC-1 (Strive et al., 2007). Os vírions são envelopados, variando de 120 a 300nm de diâmetro e genoma total de 128 Kilobases (Lust et al., 1974). O HVC-1 contém DNA de fita dupla, dentro de um capsídeo icosaédrico e uma camada de material amorfo, o tegumento, localizado entre o envelope

e o capsídeo (Roizmann et al., 1992). Em levantamentos de soroprevalência a detecção de anticorpo contra HVC-1 demonstra a presença do agente de forma cosmopolita e em alguns países com elevado índices de animais soropositivos (Ledbetter, 2013). A infecção pelo HVC-1 pode levar à problemas reprodutivos respiratórios, oculares, neurológicos e até, morte em neonatos e adultos imunossuprimidos (Kawakami et al., 2010; Ledbetter et al., 2009; Percy et al., 1968 ).

O HVC-1 foi primeiramente isolado em cultura de célula primária, cultivada de filhotes neonatais com infecção aguda que apresentaram alterações hemorrágicas e fatais (Carmichael et al., 1965a). Em outros relatos, foram observadas alterações citopatogênicas de forma espontânea em cultura de célula primária DKTC (*Dog Kidney Tissue Culture*), de cães aparentemente saudáveis. Essas alterações foram compatíveis e identificados como HVC-1 (Spertzel et al., 1965; Smith et al., 1970). Atualmente no Brasil, foram descritos apenas dois relatos do agente. E somente em um foi realizado isolamento viral do herpesvírus canino, a identificação foi realizada por meio dos efeitos citopáticos associados com alterações anátomopatológicas (Oliveira et al., 2009; Ávila et al., 2011)

O advento da PCR (Reação em Cadeia pela Polimerase) possibilitou a detecção dos agentes, de forma rápida e sensível de amostras clínicas. Principalmente em relação ao tempo e custo, e em se tratando de alguns agentes, em que o seu isolamento é fastidioso e depende de vários fatores para o seu crescimento, em meios de culturas celulares. Mesmo que o isolamento ocorra com sucesso pode depender de técnicas moleculares para confirmar a sua identificação. Dessa forma, o presente trabalho tem por objetivo a detecção do HVC-1 em isolamento viral associado técnicas moleculares para confirmação e identificação do agente.

## Material e Métodos

### Amostra

Foi coletado fragmentos de órgãos (cérebro, linfonodo submandibular, pulmão, fígado e rim) de um neonato canino de 21 dias que foi a óbito, em que apresentava vocalização constante, dor e distensão abdominal, diarreia e episódios de vômitos. O fragmento de rim foi utilizado para o isolamento viral e preparado como inóculo, sendo macerado com auxílio de almofariz e pistilo. E então, constituído na concentração de 10% (p/v) com meio DMEM e tratado com antimicrobianos na concentração de 100 UI penicilina G procaína, 100 µg/ µL de Sulfato de Estreptomicina, e 2,5 µg/mL de Anfotericina (Gibco®).

### Isolamento Viral

Foi realizada a cultura de células MDCK com meio 10 mL de DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium* - Gibco®) suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB), cultivado em estufa a 37°C por 24 horas. Após este período, cultura de células apresentou 100% de confluência da monocamada celular, e então o sobrenadante foi removido. O inóculo foi filtrado com membrana de filtração de 0,45 µm e aplicado 1 mL do filtrado sobre a monocamada de células. Em seguida, a garrafa com as células inoculadas foi colocada no agitador orbital sob baixa agitação, por 1 hora a 34°C, para adsorção viral. E então foram adicionados 9 mL de meio DMEM suplementado com 1% de SFB à cultura de célula inoculada e incubada a 34°C. Foi realizado o monitoramento dos efeitos citopáticos, a cada 24 horas, com microscópio óptico invertido em objetivas de 5X e 10X.

## Microscopia eletrônica de Transmissão

A monocamada de cultura de células MDCK foi infectada com sobrenadante do isolado viral da segunda passagem. No 7º dia pós-infecção, com 80% de efeito citopático na monocamada de células, foi removido o sobrenadante de células, e realizado 3 lavagens com PBS com pH 7,4. Em seguida foi adicionado o fixador Karnovsky sobre a monocamada celular e então raspada. Em seguida a monocamada celular foi raspada e centrifugada a 6.000 x g por 10 minutos. O *pellet* de células formado foi lavado com água destilada e cetona, fixado com tetróxido de ósmio e incluído em resina de epóxi (Araldite®). Foram realizados cortes ultrafinos com Ultramicrotomo Ultracut UCT (Leica®), em seguida o corte foi colocado sobre grade revestida de carbono, e contrastado com acetato de uranila a 5% , conforme descrito por Sesso; Souza e Machado, 1998. A visualização do material foi realizado no microscópio eletrônico de transmissão modelo Philips CM 100.

Também foi realizada a coloração de cultura de células infectadas com corante Romanovsky tipo May-Grünwald-Giemsa, para visualização das alterações celulares em microscópio óptico.

## Extração de DNA

Foram colhidas alíquotas dos sobrenadantes da cultura celular antes e durante o período de infecção viral nas células. O DNA foi extraído utilizando utilizando o *Illustra™ blood genomicPrep Mini Spin Kit* (GE Healthcare), conforme instruções do fabricante. Foram pesados 20 mg dos fragmentos de órgãos, em seguida macerados com auxílio do mixer manual, o DNAs foram extraídos utilizando *Wizard™ SV genomic DNA purification system* (Promega), seguindo as recomendações do fabricante. Todas as amostras de DNAs foram mantidas sob congelamento a -20°C, até o momento do processamento da reação de amplificação.

### ***Seminested* da Reação em Cadeira pela Polimerase (snPCR)**

Na reação de snPCR de amplificação foram utilizados os oligonucleotídeos para Timidina quinase, conforme descrito por Schulze e Baumgartner, 1998, para nPCR (*nested* PCR). No entanto foram realizadas algumas alterações na reação de amplificação e sendo utilizada a *seminested* PCR (snPCR), com objetivo de se obter mais sensibilidade e especificidade na detecção do agente das amostras testadas. Na reação de PCR foram empregados um *primer* externo (CHV1) e um interno (CHV4) para um produto de 346 pb e na reação de snPCR utilizou-se os *primers* internos (CHV3 e CHV4) para um produto de 169 pb. A reação enzimática de PCR foi preparada com 10 µL de *Gotaq® Green Master Mix* (2x) (Promega); 0,3µM de cada *primer*, 2,5% de DMSO (≥99,5%, Sigma-Aldrich), 3µl de DNA na reação de PCR e 1 µl de amplicons na snPCR, e água livre de nucleases q.s.p. 20 µl. Para controle negativo da reação foram utilizados água livre de nucleases. As condições de reações para PCR foram de 1 ciclo de desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos; 30 ciclos para desnaturação de 94°C por 30 segundos, anelamento a 57°C por 30 segundos e extensão de 72°C por 30 segundos e um ciclo de 72° C por 3 minutos. Na reação de snPCR foi alterado somente o tempo de desnaturação inicial e extensão final para 1 minuto. Os produtos de PCR e snPCR foram aplicados em gel de agarose 1,5%, corado com *SYBR® Safe Stain* (Invitrogen™), sendo submetidos a eletroforese e visualizado sob luz ultravioleta (UV). Os produtos da reação aplicados no gel de agarose foram purificados, utilizando o kit *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE HealthCare) seguindo as orientações do fabricante. E então, sequenciados na plataforma ABI 3500 e o kit BigDye 3.0 (Applied Biosystems®).

Foram realizados a PCR do inóculo e da cultura de célula para micoplasma e adenovírus canino tipo 1 e 2, para verificar a presença de contaminantes, conforme descrito por Van Kuppeveld et al. (1992) e Hu et al. (2001).

### **Titulação Viral**

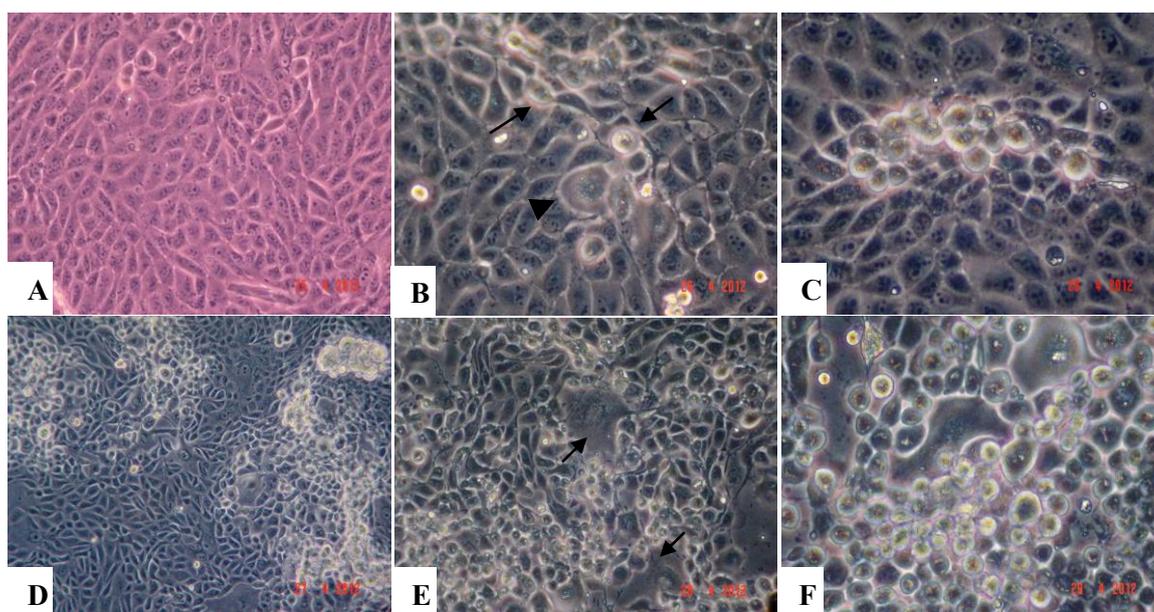
Foi realizada titulação viral por diluição limitante, com sobrenadante do isolado viral da segunda passagem. Foi cultivadas células MDCK em placas de 96 poços e realizada a diluição viral seriada na razão 10 de  $10^{-1}$  a  $10^{-10}$ , utilizando como diluente

meio DMEM. A placa com as células inoculadas foi incubada a 34°C em estufa de CO<sub>2</sub>, com umidade de 80%, durante 7 dias. O cálculo da DICT<sub>50</sub> (Dose Infectante de Cultura de Tecido em 50% das culturas de células inoculadas) foi realizado pelo método proposto por Reed e Munch (1938).

## Resultados

### Isolamento e Titulação Viral

Após 24 horas da inoculação foram observados efeitos citopáticos focais compatíveis com herpesvírus canino, como agrupamento celular em forma de “cachos”, células arredondadas e refringentes, elevação e desprendimento das células da monocamada celular, conforme visualização na figura 1. No terceiro dia foi observadas aderências na parede do frasco da cultura inoculada, nas áreas onde havia os focos de efeito citopático, a partir do quinto dia notou-se a presença de 85 % células em citólise e em suspensão.



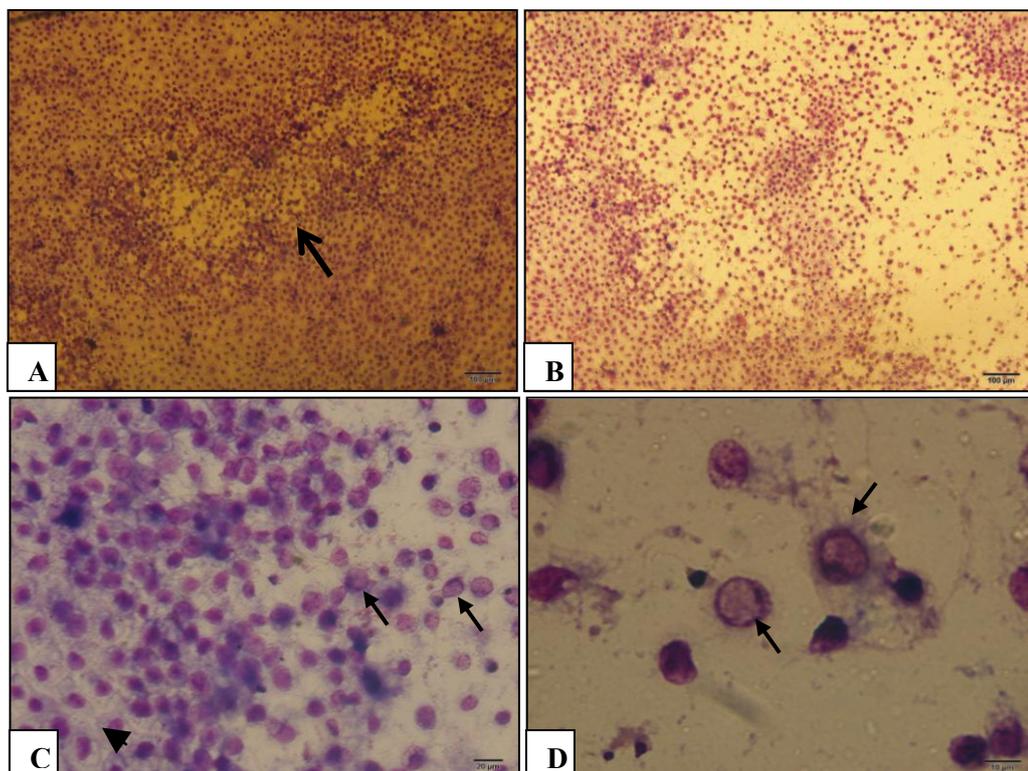
**FIGURA 1** - Cultura de células infectadas com HVC-1 com efeitos citopáticos

**A** - monocamada de células MDCK no dia da inoculação; **B** - 24 horas pós-inoculação com início de ECP com células refringentes e arredondamento (seta), célula em tumefação (cabeça de seta) **C** - foco de ECP característico de HVC-1, com agrupamento das células com aspecto

de “cacho de uva” se desprendendo da monocamada celular **D** - 48 horas pós-inoculação, com vários focos de ECP com aspecto de grumos e disseminação do HVC-1 nas células **E**- com 72 horas pós inoculação com a infecção difusa da monocamada e áreas de destacamento celular (seta); **F** - após 96 horas várias células já em necrose e em suspensão.

Na visualização das células infectadas e coradas com Romanovski tipo May-Grünwald – Giemsa foram observados focos de efeitos citopáticos, semelhante ao observado em microscópio óptico invertido. Estão presentes, áreas com foco do efeito citopático e destacamento de células da monocamada, devido a degeneração celular e citólise, as células apresentaram arredondamento e diminuídas. As células infectadas apresentaram desorganização e marginalização da cromatina para região da membrana perinuclear e o centro do núcleo com aspecto mais claro e pálido, indicando a presença da inclusão viral. As alterações celulares e efeitos citopáticos são visualizados na figura 2.

A titulação viral por diluição limitante obtida foi de  $10^{4,49}$  /mL.



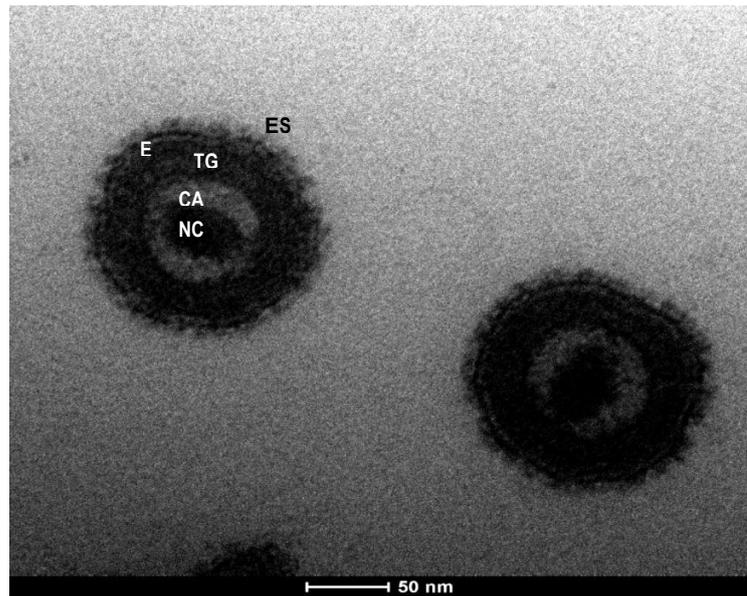
**FIGURA 2** – Cultura de células MDCK infectadas HVC-1 corada com os corantes de Romanovski tipo May-Grunwald -Giemsa. **A** - objetiva de 10X- foco de efeito citopático (seta aberta); **B** - objetiva de 10X, centro de efeito citopático com área de destacamento de células arredondadas; **C** - Objetiva 40 X -visualização de células com inclusão viral (setas) ; células se soltando da monocamada celular e células ainda íntegras na monocamada de células (cabeça de seta) ; **D** - objetiva 100X com óleo de imersão - visualização de células com marginalização da cromatina para região perinuclear, indicando presença de inclusão viral na célula (seta).

## Microscopia Eletrônica de Transmissão

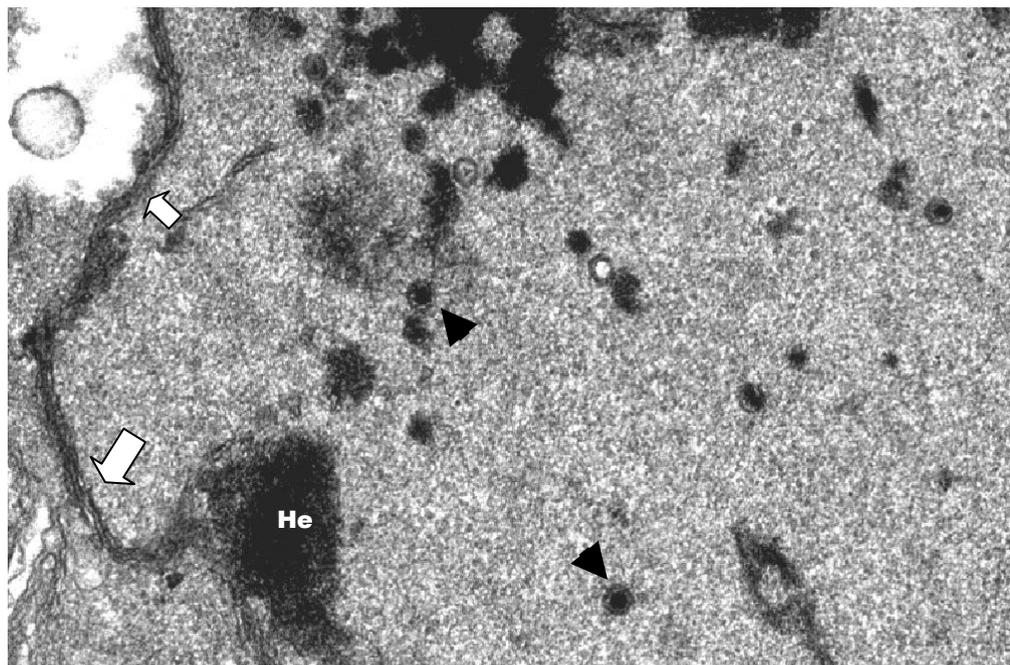
As partículas do HVC-1 observadas pela microscopia eletrônica de transmissão apresentaram nucleocapsídeo denso contidos pelo tegumento, e envolto pela membrana do envelope com glicoproteínas virais em sua superfície, com aproximadamente 150nm (figura 3), semelhante ao encontrado por outros autores (Strandberg e Carmichael, 1965; Spertzel et al., 1965; Smith et al., 1968). No entanto, o tamanho dos alfa herpesvírus estimados pela contrastação negativa variam de 120 a 300nm. Isso se deve a variabilidade da espessura do tegumento e também pode ser atribuída a integridade do envelope, que os tornam impermeáveis e mantêm a forma semi-esférica. Vírions com envelopes danificados são permeáveis a contrastação e apresentam aspecto de “ovo frito” (*sunny-side up*) com forma irregular e diâmetro geralmente maior que um vírion íntegro (Roizman e Furlong, 1974). Em algumas células observou-se a presença de vírus nu, somente com o capsídeo na região intranuclear (figura 4). Isso se deve a síntese de DNAs virais e montagem dos capsídeos que ocorrem somente no núcleo, mas alguns herpesvírus podem ser de-envelopado e re-envelopado enquanto transitam através do citoplasma (Roizman e Baines, 1991), conforme visualizado em figura 6.

Como na microscopia óptica, também foram visualizados os núcleos celulares mais claros, com pouca presença da cromatina e migração para região perinuclear, alguns focos de heterocromatina são descritos como “coagulação” da cromatina. As alterações da cromatina podem ser atribuídas à atividade de replicação viral (Knipe et al., 2013). Em algumas células infectadas, verificou-se a reduplicação da membrana nuclear, com regiões de invaginações e cariorrexe, também encontrado por Strandberg e Aurelian (1969), conforme mostrado em figura 5-A. O citoplasma apresentou sinais de degeneração e numerosas vesículas de vários tamanhos. As mitocôndrias apresentaram aumentadas e alterações nas membranas.

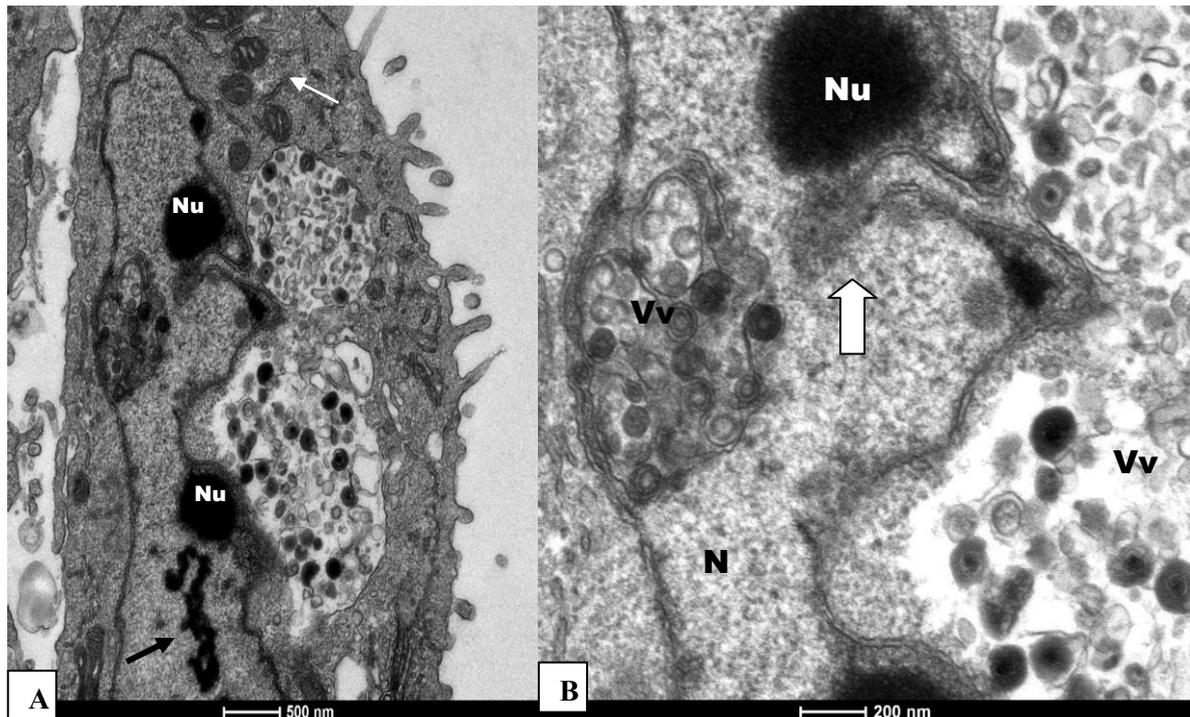
Os capsídeos cheios ou vazios são notados pela diferença de densidades indicando presença do genoma e /ou polipetídeos virais, observados também por Schrag et al. (1989). Na figura 5-B, observa-se alguns vírions contidos em vesícula, tanto intranuclear como citoplasma, e livres no citoplasma, também visualizado por Johnson et al., 1970. Na figura 7, observa-se vírions deixando a célula hospedeira em região periférica do citoplasma e vesículas margeando a membrana.



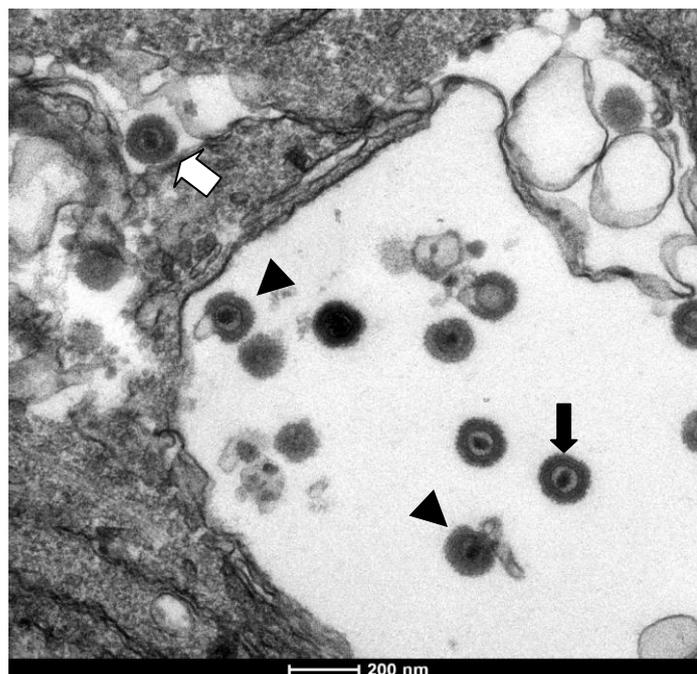
**FIGURA 3** - Vírion do HVC-1 visualizando as estruturas virais na microscopia eletrônica de transmissão. NC - nucleocapsídeo; CA - capsídeo; TG - tegumento; E - envelope; ES - Espículas de glicoproteínas da superfície do envelope.



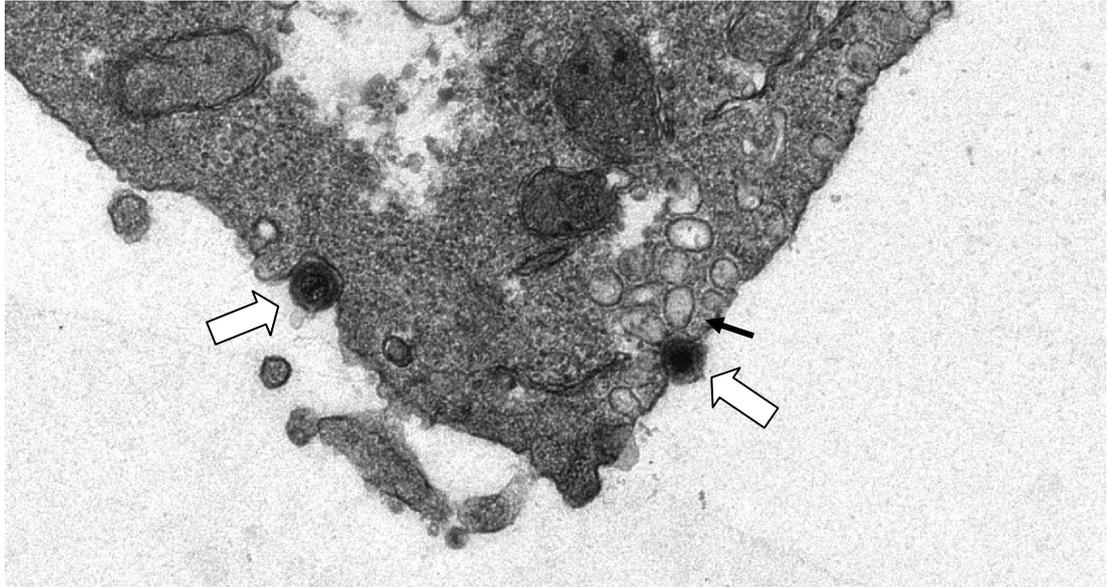
**FIGURA 4** - Nucleocapsídeos em nucleoplasma celular. Núcleo celular claro devido à marginalização da heterocromatina (He) para região perinuclear, membrana nuclear reduplicada (seta branca), presença dos nucleocapsídeos (cabeça de seta) no núcleo da célula hospedeira.



**FIGURA 5** – Presença de vesículas contendo partículas virais intranuclear e citoplasmática (A e B). **A** – vesículas virais (Vv) núcleo claro e pálido devido a pouca quantidade de cromatina, também se apresenta com aspecto coagulada (seta), nucléolos localizados na periferia do núcleo celular (Nu) e mitocôndria aumentadas (seta branca) **B** – Núcleo celular anisocariótico (N) e Nucléolo (Nu), presença de invaginação da membrana nuclear (seta branca), marginalização da cromatina (seta preta) e vírion margeando a membrana contido em vesícula (cabeça de seta) e Vv – vesículas virais



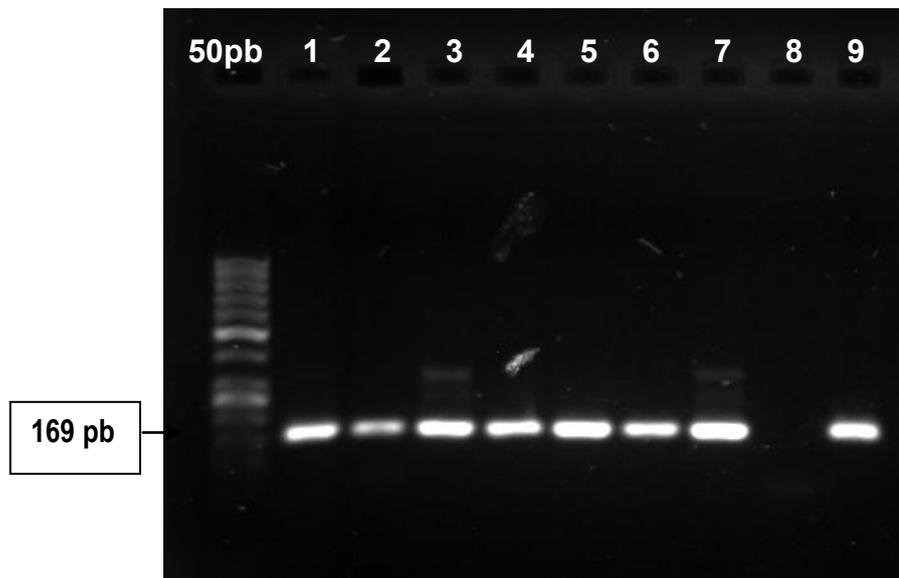
**FIGURA 6** - Vírions em vesículas, com nucleocapsídeo denso com conteúdo genômico viral (seta preta) e vírions se rompendo (cabeça de seta) e vírion livre no citoplasma (seta branca).



**FIGURA 7** – Vírions egressando da célula para o meio extracelular. Vírions invaginados na membrana citoplasmática (seta branca), presença de várias vesículas (seta) margeando a membrana celular na face intracelular.

### ***Reação de seminested PCR (snPCR)***

Na snPCR, foram obtidos produtos do tamanho esperado para PCR de 346 pb e na SN 169 pb, conforme apresentado na figura 8, mostrando bandas intensas e forte fluorescência, das bandas positivas. Devido à alta concentração de DNA foram produzidas ampliações já na reação de PCR, e assim verifica-se a presença de bandas de arrasto na snPCR. Nas colunas em que não foram produzidas bandas na PCR, observa-se que na snPCR essas bandas de arrasto não se formaram. Os controles negativos não apresentaram ampliações indicando que não houve contaminação na reação.



**FIGURA 8** - Produtos de amplificação de snPCR de fragmentos de órgãos submetidos à eletroforese. Coluna 1: cérebro; coluna 2: linfonodo submandibular; coluna 3: pulmão; coluna 4: baço; coluna 5: fígado; coluna 6: rim; coluna 7: intestino delgado; coluna 8: controle negativo; coluna 9: controle positivo vacinal diluído a  $10^{-2}$ . Reação de snPCR com amplificação de produtos de 169 pb em todos os tecidos, com presença de produtos da PCR e arrasto na coluna 1; 3 e 7, devido à alta concentração de DNA viral. Foi utilizado marcador molecular de 50 pb.

Na PCR, não foram obtidas positividade nas amostras de cultura de célula MDCK e no inóculo, para micoplasma e adenovírus tipo 1 e 2.

As seqüências analisadas de tecidos de órgãos e isolamento viral, todas apresentaram identidade de 100% e 99% com HVC-1 para o gene da timidina quinase do *GenBank*<sup>TM</sup> com número de acesso X75765 e AF361075 respectivamente, confirmando a identificação do agente.

## Discussão

No isolamento viral foram observados efeitos citopáticos característicos do herpesvirus canino, como observado por Carmichael et al.(1965a); Poste (1972), Navarro et al.(2003). Também foi observada a rápida disseminação em cultura celular pós-inoculação (menos que 24 horas) e destruição das células infectadas, como característica descrita dos herpesvírus (Roizmann et al., 1992).

As lesões renais são encontradas com frequência em cães infectados, que podem estar relacionadas à maior susceptibilidade renal a infecção por HVC-1, em relação aos outros órgãos (Percy, 1971). Corpúsculos de inclusões virais, de adenovirus canino tipo 1 e morbilivírus canino, foram detectados em tecidos renais de cães com alterações neste órgão à necropsia (Inkelmann et al.; 2012). Isso pode estar relacionado à permissividade desses tipos celulares a esses agentes virais (Wehner e Smith, 1983). Dessa forma, pode ter contribuído para o isolamento viral a partir deste órgão em células renais de cão (MDCK). Tendo em vista, que outras tentativas de isolamento do HVC-1 foram realizadas em outros estudos, mas sem sucesso (Hashimoto e Hirai, 1984; Ávila et al., 2009; Gadsden, et al., 2013).

Na visualização das células infectadas e coradas com Romanovski tipo May-Grünwald – Giemsa foram observados focos do efeito citopático, semelhante ao observado em microscópio invertido em garrafas de cultura infectadas.

Na MET foi possível estimar o tamanho da partícula viral em 150nm, semelhante ao encontrado por outros autores (Spertzel et al., 1965; Strandberg e Carmichael, 1965; Smith et al., 1968). No entanto, o tamanho dos alfa-herpesvírus estimados pela contrastação negativa variou de 120 a 300nm. Isso se deve variabilidade da espessura do tegumento e também pode ser atribuída a integridade do envelope, que os tornam impermeáveis e mantêm a forma semi-esférica. Vírions com envelopes danificados são permeáveis a contrastação e apresentam aspecto de “ovo frito” (*sunny-side up*) com forma irregular e diâmetro geralmente maior que um vírion íntegro (Roizmann e Furlong, 1974). Além disso, foram avaliadas as estruturas virais e visualizadas as alterações na morfologia celular, em decorrência da infecção viral, tanto no núcleo como sítio de replicação do vírus, como no citoplasma presente em vesículas ou livre.

A MET confirmou e evidenciou algumas alterações celulares observadas na MO, como ausência de eucromatina, além da redução e marginalização da heterocromatina para região perinuclear, resultante da atividade e replicação viral. Essas alterações sobre as estruturas celulares induzidas pela infecção e atividade viral foram descritas, por alguns autores, como corpúsculo de inclusão viral (Carmichael et al., 1965b; Johnson et al., 1969; Johnson et al., 1970).

O baixo valor da DICT50 pode ser devido à baixa produção viral. De acordo com Percy et al. (1971), em isolamento viral de fragmento de órgãos (fígado, rim, pulmão e baço) de cães infectado experimentalmente, obteve baixa infectividade das células inoculadas e somente até a diluição  $10^{-1}$ . Isso pode indicar uma característica de alguns herpesvírus com relação à baixa replicação (Roizmann et al., 1992).

A negatividade à PCR para micoplasma e adenovírus canino tipo 1 e 2, descarta a possibilidade de contaminação do órgão inoculado e da cultura de célula infectada, por estes agentes. Tendo em vista que são considerados contaminantes de cultura celular (Spertzel et al., 1965; Kuppeveld, et al., 1994). Além disso, o adenovírus canino pode produzir efeitos citopáticos em células MDCK, e pode causar a morte em filhotes caninos (Almes, 2010).

A snPCR que amplifica o fragmento do gene da timidina quinase mostrou-se específica e eficiente, nas amostras submetidas ao teste. Em seguida, foi confirmada pelo sequenciamento do produto da snPCR obtido, demonstrando identidade com as seqüências do HVC-1. Dessa forma, comprovando a identificação do vírus isolado em cultura celular e a presença do agente no animal infectado.

## **Conclusões**

O trabalho apresentado demonstra que o isolamento viral do HVC-1 foi realizado com sucesso permitindo a visualização dos efeitos citopáticos característico, das estruturas virais e das alterações intracelulares nas células hospedeiras. Nas sequencias do DNA, observa-se que o agente apresentou 100% de identidade com a sequencia já publicada. O uso de técnicas moleculares pode auxiliar na detecção e identificação do agente em animais infectados, como foi utilizado neste caso. Dessa forma, pode auxiliar no controle e prevenção das doenças entre os animais susceptíveis. Há poucas informações respeito do agente no Brasil, por isso há necessidade de mais estudos para compreender a epidemiologia da infecção do HVC-1, na população canina.

## Referências

AVILA, V.P.F.; RODRIGUES, N.C.; CESARO, C.; ESMERALDINO, A.T.; FALLAVENA, L.C.B.; BRAGA, A.C.; CERVA, C. Herpesvirus canino em filhotes da raça Golden Retriever - relato de caso. **Clínica Veterinária**, Ano 16, n.92, p.52-56, 2011.

ALMES, M.K.; JANARDHAN, K.S.; ANDERSON, J.; HESSE, R.A.; PATTON, K.M. Fatal canine adenovirus Pneumonia in two litters of bulldog. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 22; p.780-784, 2010.

BRUM, M.C. e WEIBLEN R. Detecção, Identificação e Quantificação de Vírus In: FLORES, E.F. **Virologia Veterinária**,. Editora UFSM, Santa Maria, p.80, 2007.

CARMICHAEL, L.E.; SQUIRE, R.A.; KROOK, L. Clinical and pathological features of a fatal disease of newborn pups. **American Journal of Veterinary Research**, v.26, p.803-814, 1965a.

CARMICHAEL, L.E.; STRANDBERG, J.D.; BARNES F.D. Identification of a cithopatogenic agent infectious for puppies as canine herpesvirus. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 120, p. 644-650, 1965b.

CARMICHAEL, L.E. Herpesvirus canis: aspects of pathogenesis and immune response. **Journal American Veterinary Medicine**, v. 156, p.1714-1721, 1970.

DECARO, N.; AMORISCO, F.; DESARIO, C.; LORUSSO, E.; CAMERO, M.; BELLACICCO, A.L.; SCIARRETTA, R.; LUCENTE, M.S.; MARTELLA, V.; BUONAVOGLIA, C. Development and validation of a real-time PCR assay for specific and sensitive detection of canid herpesvirus 1. **Journal of Virological Methods**, v. 169, p.176-180, 2010.

DE PALMA, V.E.; AYALA, M.A.; GOBELLO, C.; ECHEVERRIA, M.G.; GALOSI, C.M. An atypical clinical presentation for the first isolation of Canid

herpesvirus 1 in Argentina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, n.5, p.1267-1270, 2010.

GADSDEN, B.J.; MAES, R.K.; WISE, A.G.; KIUPEL, M.; LAGOHR, I.M. Fatal *Canid herpesvirus 1* infection in an adult dog. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.24, n.4, p.604-607, 2012.

HASHIMOTO, A.; HIRAI, K.; OKADA, K.; FUJIMOTO, Y. Pathology of the placenta and newborn pups with suspected intrauterine infection of canine herpesvirus. **American Journal of Veterinary Research**.v.40, n.9, p. 1236-1240, 1979.

HASHIMOTO, A.; KATSUYA H. Pathological Finding in a surviving pup transplacentally infected with canine herpesvirus. **Research Bulletin of Faculty of Agriculture of Gifu University**, v. 49, p.391-399, 1984.

HONESS, R.W.; WATSON, D.H. Unit and Diversity in the herpesvirus. *Journal of General Virology* , v.37, p.15-37, 1977.

HU, R.L.; HUANG, G.; QIU, W.;ZHONG, Z.F.; XIA, X.Z.; YIN, Z.; Detection and differentiation of CAV-1 and CAV-2 by polymerization Chain Reaction. **Veterinary Research Communication**, v.25, p.77-84, 2001.

INKELMANN, M.A.; KOMMERS, G.D. TROST, M.E.; BARROS, C.S.L.; FIGHERA, R.A.; IRIGOYEN, L.F.; SILVEIRA, I.P. Lesões do sistema urinário em 1063 cães. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, n.8, p.761-771, 2012

JOHNSON, G.R.; KOESTNER, A.; KINDIG, O.; SHADDUCK, J.A. Effects of a pathogenic canine herpesvirus on established thyroid adenocarcinoma cell culture. *Veterinary Pathology*, v.6, p.289-309, 1969.

JOHNSON, G.R.; KOESTNER, A.; KINDIG, O.; LONG, J.F. Effects of a pathogenic canine herpesvirus on canine brain cell culture and cerebellar explants. **Acta Neuropathology**, v.15, p.97-113, 1970.

KAWAKAMI, K.; OGAWA, H.; MAEDA, K.; IMAI, A.; OHASHI, E.; MATSUNAGA, S.; TOHYA, Y.; OHSHIMA, T.; MOCHIZUKI, M. Nosocomial outbreak of serious canine herpesvirus infectious tracheobronchitis (Kennel cough) caused by canine herpesvirus infection, **Journal of Clinical Microbiology** , v. 48, n.4, p. 1176-1181. 2010.

LEDBETTER, E.C.; KIM, S.G.; DUBOVI, E.J.; BICALHO, R.C. Experimental reactivation of latent canine herpesvirus-1 and induction of recurrent ocular disease in adult dogs, **Veterinary Microbiology** v. 138, p.98-105, 2009.

LEDBETTER. E.C. Canine Herpesvirus-1 ocular diseases of mature dogs. **New Zealand Veterinary Journal**. E-pub ahead of print, p.1-9, 2013.

LIEBERMAN, P.M. Chromatin regulation of virus infection. **Trends in Microbiology**, n.3, v.14, p.132-139, 2006.

LUST, G. CARMICHAEL, L. Properties of canine herpesvirus DNA. Abstract. **Experimental Biology and Medicine**, v.46, n.1, p.213-217.

NAVARRO, C.; CELEDÓN, M.; PIZARRO, A. Detección de virus herpes canino tipo 1 no Chile. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v.35, n.2, 2003

NAVARRO, C.; CELEDÓN, M.; PIZARRO, J.; GAGGERO, A. Virus herpes canino en Chile: propiedades biológicas. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v.37, n.2, 2005.

PATEL, J.R.; HELDENS, J.G.M. Review of companion animal viral disease and immunoprophylaxis. **Vaccine**, v.27, p.491-504, 2009

PERCY, D.H.; OLANDE, J.; CARMICHAEL, L.E. Encephalitis in the Newborn pup due to a canine herpesvirus. **Pathology Veterinary**, v.5, p.135-145, 1968.

PERCY, D.H.; CARMICHAEL, L.E.; ALBERT, D.M.; KING, J.M. Lesions in puppies surviving infection with canine herpesvirus. **Veterinary Pathology** v.8; p.37-53, 1971.

POSTE, G.; LECATSAS, G.; APOSTOLOV, K. Electron microscope study of the morphogenesis of a new canine herpesvirus in dog kidney cells. **Archiv Für Die Gesamte Virusforschung**, v.39, p.317-329, 1972.

POSTE, G. Characterization of a New Canine Herpes Virus. *Archiv für die gesamte Virusforschung*, v. 36, p.147-157, 1972.

REED, L.J.; MÜNCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. **The American Journal of Hygiene**, v.27 n.3, p.493-497, 1938.

ROIZMAN B., FURLONG, D. The replication of herpesvirus. In: FRAENKEL-CONRAT H, WAGNER, R.R. **Comprehensive virology**, v. 3, p. 229-403, 1974.

ROIZMANN, B.; DESCROSIERS, R.C.; FLECKENSTEIN, B.; LOPEZ, C.; MINSON, A.C.; STUDDERT, M.J., The family Herpesviridae: an update. **Archive of Virology**, v.123, p.425-449, 1992.

SESSO, A., Fixação de sistemas biológicos. In Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às Ciências Biológicas, Souza, W. **Sociedade Brasileira de Microscopia**, p.14-15, 1998.

SMITH, R.F.; YAMASHIROYA, H.M.; MAGIS, J.M. Recovery of a canine herpesvirus from primary kidney culture derived from a closed dog colony. **Applied Microbiology**, v.20, n.3, p.523-526.

SOUZA, W.; MACHADO, R.D.; Desidratação, Inclusão, Ultramicrotomia e Contratação. In: Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às Ciências Biológicas, Souza, W. **Sociedade Brasileira de Microscopia**, p.14-15, 1998.

SPEAR, P.; LONGNECKER, R. Herpesvirus entry: an Update. **Journal of Virology**, v.77, n.9, p.10179-10185.

SPERTZEL, R.O.; HUXSOLL, D.L.; McCONNEL, S.J.; BINN, L.N.; YAGER, R.H. Recovery and characterization of a Herpes-like from dog kidney cell culture. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**. V. 120, p. 651-655, 1965.

STRANDBERG, D. J.; AURELIAN, L. Replication of canine herpesvirus- II Virus development and Release in infected dog kidney cells. **Journal of Virology**, v.4, n.4, p.480-489, 1969.

STRIVE, T.; HARDY, C.M.; WRIGHT, J.; REUBEL, G.H. A virus vector based on canine herpesvirus of vaccine applications in canids. **Veterinary Microbiology**, v. 119, p.173-183, 2007.

SCHULZE, C; BAUMGÄRTNER, W. Nested Polymerase Chain Reaction and In Situ Hybridization for Diagnosis of Canine Herpesvirus Infection in Puppies. **Veterinary Pathology**, n.35, p. 209-217, 1998.

VAN KUPPEVELD, F.J.M.; LOGT, J.T.M.; ANGULO, A.F.;QUINT, W.G.; NIESTER, H.G.; GALAMA, J.M.; MELCHER, W.J. Genus and species identification of micoplasma by 16S RNA amplification. **Applied Environmental Microbiology**, v.58, n.8, p.2606-2615, 1992.

VAN KUPPEVELD, F.J.M.; JOHANSSON, K. GALAMA, J.M.D.; KISSING, J.; BOLSKE, G.; VAN DER LOGT, J.T.M.; MELCHER, W.J.G. Detection of mycoplasma contamination in cell by mycoplasma group-specific. **Applied Environmental Microbiology**, v.60, n.1, p.149-152, 1994.

VERSTEGEN, J.; DHALIWAL, G.; K. VERSTEGEN-ONCLIN, K. Canine and feline pregnancy loss due to viral and non-infectious causes: A review. **Theriogenology**, v. 70, 304-319, 2008.

