

INFECÇÕES LATENTES POR HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 1 EM BÚFALOS (*BUBALUS BUBALIS*) NO BRASIL

MARCIA JORGENS¹; DAIANA MACIEL MEDEIROS²; CRISTINA MENDES
PETER²; FABRÍCIO DE SOUZA CAMPOS³; GEFERSON FISCHER⁴

¹Laboratório de Virologia e Imunologia, Faculdade de Veterinária, UFPEL –
marcia.h.jorgens@gmail.com

²Laboratório de Virologia e Imunologia, Faculdade de Veterinária, UFPEL

³Laboratório de Virologia Animal, Instituto de Ciências Básicas de Saúde, UFRGS

⁴Laboratório de Virologia e Imunologia, Faculdade de Veterinária, UFPEL –
geferson.fischer@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O herpesvírus bovino tipo 1 é responsável por causar uma variedade de quadros clínicos como rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), vulvovaginite pustular infecciosa (IPV) e balanopostite pustular infecciosa (IBP), além de falhas reprodutivas, como retorno ao cio e abortamentos (SILVA, T. et al., 2000).

O BoHV-1 pertence à família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*, gênero *Varicellovirus*, e caracteriza-se por apresentar como material genético uma fita dupla de DNA, envolto por um capsídeo icosaédrico, uma camada proteica denominada tegumento, e envelope glicoproteico (DAVISON et al., 2009). Como todos os herpesvírus, o BoHV-1 é capaz de estabelecer latência (ROIZMANN et al., 2001), podendo ser reativado por uma variedade de estímulos, dentre eles fatores estressantes.

A espécie bovina é hospedeira natural do BoHV-1. Entretanto, infecções por este vírus têm sido relatadas em outras espécies de ruminantes domésticos e selvagens (THIRY et al., 2006). Estudos sorológicos realizados em diversos países, têm sugerido que bubalinos (*Bubalus bubalis*) são suscetíveis ao BoHV-1 bem como a outros *alfaherpesvirus* geneticamente relacionados (THIRY et al., 2006; CAVIRANI et al., 1997; GALIERO et al., 2001).

As informações sobre o papel epidemiológico da espécie bubalina em infecções pelo BoHV-1 é limitada e principalmente suportada por inquéritos sorológicos. Apesar de os bovinos se infectarem naturalmente pelo BoHV-1 e estudos sorológicos indicarem que este vírus está disseminado em rebanhos bovinos de todo o país, a distribuição dessa enfermidade em búfalos não tem sido estudada. Dessa forma, é de grande interesse investigar a circulação do BoHV-1 na espécie bubalina, inferindo a respeito do possível papel epidemiológico do búfalo na disseminação desse agente para rebanhos bovinos, já que, ocasionalmente, bubalinos podem ser criados juntamente com os bovinos ou muito próximos.

Esse trabalho teve como objetivo realizar um estudo sobre a distribuição do herpesvírus bovino tipo 1 na espécie bubalina, através da detecção do DNA viral de BoHV-1 em amostras de gânglios trigêmeo coletados de animais abatidos em frigoríficos. Além disso, realizar a pesquisa de anticorpos contra o BoHV-1, BoHV-5 e BuHV-1 em amostras de soro.

2. METODOLOGIA

Amostras e extração de DNA

Foram coletados 202 gânglios trigêmeos de búfalos, provenientes de diferentes rebanhos do Estado do Rio Grande do Sul, de animais com idade entre

24 e 36 meses, não vacinados contra herpesvírus bovino, em um abatedouro localizado no município de Pelotas. No Laboratório de Virologia e Imunologia UFPEL, os gânglios trigêmeos foram congelados a uma temperatura de -70°C , para posterior utilização.

Semi-Nested PCR

As amostras de DNA extraídas foram analisadas para a presença de DNA de BoHV-1 através de uma *Semi-Nested* PCR (SN-PCR), com amplificação de um segmento do gene que codifica para a glicoproteína D (gD) do envelope de BoHV-1. A primeira reação utilizou os primers externos P3 sense (5'GCTGTGGGAAGCGGTACG3'), e P4 anti-sense (5'GTGCGACTATGGCCTTGTGTGC3') para a amplificação de 468 pb. Na segunda reação foram usados primers P4 anti-sense (5'GTGCGACTATGGCCTTGTGTGC3') e P5 sense (5'ACGGTCATATGGTACAAGGACAGCG3') para a amplificação de um produto final de 425 pb, seguindo metodologia descrita por (WIEDMANN et al. 1993).

A primeira reação da SN-PCR foi realizada em uma solução contendo 1,5 μL de DNA e 7,5 μL de PCR-MIX constituído por 10 pmol de cada primer (P3/P4), 1,5 mM de dNTP (Ludwig®), 2,5 unidades de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen®), e água ultra pura autoclavada para o volume final de 25 μL . O processo de amplificação foi realizado em termociclador (*Biocycler*®) com as seguintes condições: uma etapa de 4 min a 94°C ; 30 ciclos de 1 min a 94°C , 1 min a 60°C e 1 min a 72°C , seguida de uma etapa de extensão final de 7 min a 72°C . Do produto da primeira amplificação foram utilizados 3 μL para a segunda reação da SN-PCR (primer P4/P5), nas mesmas condições de tempo e temperatura.

Sequenciamento genômico

Para a avaliação da similaridade molecular entre as amostras positivas e os isolados de referência de BoHV-1, 14 produtos da SN-PCR positivos, após terem sido verificados pela presença de banda em gel de agarose (1,5%) foram purificados e sequenciados utilizando um sequenciador de DNA Cycle Sequencing BigDye Terminator Kit v3.1 ABI 3130 (Applied Biosystems, Califórnia, EUA). As sequências obtidas foram analisadas utilizando BioEdit Sequence Alignment Editor (North Carolina State University, Raleigh, NC), e alinhado com Clustal W (THOMPSON et al., 1994).

Soroneutralização

Foram coletadas 242 amostras de soro para exame individual frente a diferentes amostras de herpesvírus: BoHV-1 (cepa Los Angeles), BoHV-5 (cepa Riopel - RP), e BuHV (cepa B6). As amostras foram dispostas e diluídas (1:2 até 1:256) em placas de 96 orifícios, e cada vírus padrão colocado na concentração de 100 DICC_{50} (doses infectantes para 50% dos cultivos celulares). Após incubação soro-vírus por 1 hora à 37°C , uma suspensão de células da linhagem *Madin Darby Bovine Kidney* (MDBK), cultivadas em meio mínimo essencial de Eagle (EMEM) (Sigma®), suplementadas com 10% de soro fetal bovino (Gibco®) e antibiótico, foi adicionada. Posteriormente as placas foram incubadas a 37°C , em atmosfera a 5% de CO_2 . A leitura final do teste de soroneutralização foi realizada após 72 horas, pela observação da presença ou ausência de efeito citopático (ECP) característico.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos testes da SN-PCR utilizadas neste estudo para a detecção de DNA de BoHV-1 demonstraram que dos 202 gânglios trigêmeos testados, 61 (30,1%) foram positivos. Na análise de similaridade molecular entre as amostras positivas na Semi-nested PCR e isolados de referência de BoHV-1, comprovou-se alto grau de correlação.

Diversos trabalhos previamente publicados tiveram por objetivo a aplicação de PCR para identificar e diferenciar o BoHV-1 e BoHV-5 em tecidos ou amostras clínicas (ALEGRE et al., 2001; CLAUS et al., 2005). A PCR utilizada, que teve como alvo um fragmento do gene gC, identificou 16 amostras de BoHV-1 e 24 de BoHV-5 isoladas de diferentes amostras clínicas.

A análise de similaridade pelo BLASTn demonstrou elevado grau de similaridade molecular das amostras positivas com as sequências da gD de isolados de referência de BoHV-1 disponíveis no GenBank. Este dado reforça a ideia de que o vírus circula entre os rebanhos bubalinos do país, tornando estes animais potencialmente disseminadores do vírus.

Os resultados dos testes de soroneutralização (SN) mostraram que das 242 amostras de soro analisadas, 67 apresentaram anticorpos neutralizantes contra, pelo menos, um dos vírus testados. Assim, 56 amostras (23,14%) dos soros neutralizaram a amostra LA (BoHV-1), 50 (20,66%) amostras a B6 (BuHV), enquanto que 54 amostras (22,31%) neutralizaram a amostra RP (BoHV-5). Os títulos, em todos os casos, variaram entre 2 e 32. Também, 48 amostras (19,8%) neutralizaram os 3 vírus.

Segundo Rocha et al., (2001), testes sorológicos têm demonstrado a presença da infecção por BoHV-1 em rebanhos bovinos de diversos Estados brasileiros, e os percentuais de animais soropositivos variam de 27,1% a 85,7%. Com estes índices observados, a avaliação sorológica de rebanhos bubalinos torna-se importante também para a identificação de animais que possam estar eliminando o vírus, e que provavelmente estejam atuando como um reservatório dos herpesvírus bovino, tanto para rebanhos bovinos como para outros bubalinos.

A presença de DNA viral nos gânglios trigêmeos de búfalos comprova que estes animais podem ser naturalmente infectados com BoHV-1, e abrigar o vírus de forma latente, já que todos os animais, após a infecção, tornam-se portadores do vírus. Nestes portadores, em situações de estresse como transporte, por exemplo, pode haver a reativação viral, tornando-os fonte de infecção para o rebanho. Embora ainda não se conheça o papel da biologia de BoHV-1 em búfalos, a investigação do impacto sanitário dessa infecção torna-se extremamente relevante, especialmente devido a parâmetros reprodutivos que podem ser afetados.

Com os dados obtidos, a avaliação sorológica dos rebanhos bubalinos torna-se importante também para a identificação de animais que possam estar eliminando o vírus, e que provavelmente estejam agindo como reservatório dos herpes vírus bovino, tanto para rebanhos bovinos, como também para outros rebanhos bubalinos.

4. CONCLUSÕES

Os resultados comprovam que o BoHV-1 circula em rebanhos bubalinos provenientes da região sul do Brasil. Este é o primeiro estudo que utiliza testes moleculares para a detecção de infecções latentes por BoHV-1 na espécie bubalina no Brasil.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEGRE, M.; NANNI, M.; FONDEVILA, N.. Development of a multiplex polymerase chain reaction for the differentiation of bovine herpesvirus-1 and -5. **J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health, Germany**, v.48, n.8, p.613-21. 2001.

CAVIRANI, S.; CONSALVO, F.; D'ONOFRIO, G.; CAPPUCCI, L.; CABASSI, C. S.; ALLEGRI, G.; BIGLIARDI, E.; CIVARDI, A. & FLAMMINI, C. F. A serological survey of different bovine herpesviruses (BHV1, BHV2, BHV4) in dairy buffaloes of southern and northern Italy. **Proceedings of the 5th World Buffalo Congress**. Caserta, Italy, p.626-630, 1997.

CLAUS, M. P.; ALFIERI, A. F.; FOLGUERAS-FLATSCHART, A. V.; WOSIACKI, S. R.; MEDICI, K. C.; ALFIERI, A. A.. Rapid detection and differentiation of bovine herpesvirus 1 and 5 glycoprotein C gene in clinical specimens by multiplex-PCR. **J. Virol. Methods, Netherlands**, v.128, n.1-2, p.183-188. 2005.

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

GALIERO, G.; GIORDANELLI, M. P. & FRAULO, P. Infectious bovine rhinotracheitis (IBR) - *note 1*: serum epidemiological survey in buffalo herds of Southern Italy. **Bubalus Bubalis**. p.69-74, 2001.

ROCHA, M.A.; GOUVEIA, A.M.G.; LOBATO, Z.I.P.; LEITE, R.C.. Pesquisa de anticorpos para IBR em amostragem de demanda no Estado de Minas Gerais, 1990-1999. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.53, n.6, p. 645-647. 2001.

ROIZMAN, B.. **Field's virology**. USA, 4th Ed. Lippincott Williams & Wilkins, v.1, p.2381-2510. 2001.

SILVA, T.C., OLIVEIRA, E.A.S., MELO, S.V., SPILKI, F.R., ESTEVES, P.A., SCHMIDT, C.S.R., MOOJEN, V., ESMERALDINO, A.M. & ROEHE, P.M.. Molecular and antigenic characterization of bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) isolated from semen. **Virus Ver. Res.** 5(2):116. 2000.

THIRY J., KEUSER V., MUYLKENS B., MEURENS F., GOGEV S., VANDERPLASSCHEN A. & THIRY E. Ruminant alphaherpesvirus related to bovine herpesvirus 1. **Veterinary Research**. 37:169-190. 2006.

THOMPSON, J.D., HIGGINS, D.G., GIBSON, T.J., CLUSTAL W: improving the sensitivity of 301 progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific 302 gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res.** 22, 4673–4680. 1994.

WIEDMANN, M.; BRANDON, R.; WAGNER, P.; DUBOVI, E. J.; BATT, C. A. Detection of bovine herpesvirus-1 in bovine semen by a nested PCR assay. **Journal of Virological Methods, Amsterdam**, v.44, p.129- 140, 1993.