

PREVALÊNCIA DE HERPESVÍRUS BOVINO 1 E 5 NO RIO GRANDE DO SUL ESTIMADA PELA DETECÇÃO DE DNA VIRAL EM GÂNGLIOS NEURONAIS

Prevalencia de Herpesvirus bovino 1 y 5 en Rio Grande do Sul estimada por deteccion de DNA viral em ganglios nerviosos

Prevalence of Bovine herpesvirus 1 and 5 in Rio Grande do Sul estimated by detection of viral DNA in neuronal ganglia

CAMPOS, F.S.^{1,2*}; RIJSEWIJK, F.A.M.²; HÜBNER, S.O.³; OLIVEIRA, M.T.²; ESTEVES, P.A.⁴; SILVA, A.D.⁴; ROEHE, P.M.²; FRANCO, A.C.²

1- Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente/UFRGS; bolsista CNPq.

2- Equipe de Virologia - Instituto de Ciências Básicas da Saúde/UFRGS & Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor - FEPAGRO/RS.

3- Laboratório de Virologia - Departamento de Medicina Veterinária Preventiva - Faculdade de Veterinária/UFPEL.

4- Embrapa de Suínos e Aves, Concórdia - SC.

Resumo: Os Herpesvírus bovinos 1 (BoHV-1) e 5 (BoHV-5) causam diferentes quadros clínicos em bovinos, incluindo a rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) e a meningoencefalite herpética bovina. Entretanto, a prevalência de BoHV-1 e BoHV-5 em regiões endêmicas é desconhecida devido a falta de um teste capaz de diferenciá-los. O presente trabalho foca a aplicação do teste de reação em cadeia da polimerase (PCR) com oligonucleotídeos que podem amplificar ambos os tipos usando DNA de gânglios trigêmeos de bovinos, um reconhecido sítio de latência viral. Quatrocentos gânglios trigêmeos foram coletados de 200 animais submetidos ao abate em um frigorífico que recebe animais de diferentes regiões do estado do Rio Grande do Sul (Brasil). O DNA total foi extraído desses gânglios. Uma PCR foi desenhada para amplificar uma região homóloga do gene que codifica a glicoproteína C, dando um produto de, aproximadamente, 570 pares de base (pb) para ambos os vírus. O DNA viral foi detectado em 167 (83,1%), sendo 21 (10,4%) negativas e 13 (6,5%) tiveram a amplificação inibida. Mediante a alta prevalência destes herpesvírus bovinos, medidas de controle devem ser tomadas para diminuir a disseminação destes vírus na população de bovinos. Atualmente o trabalho está em progresso para diferenciar entre BoHV-1 e BoHV-5.

Palavras-chave: BoHV-1, BoHV-5, gânglio trigêmeo, latência, PCR.

Abstract: Bovine herpesvirus 1 (BoHV-1) and 5 (BoHV-5) have been associated to different clinical conditions of cattle, including infectious bovine rhinotracheitis (IBR) and meningoencephalitis. However, the prevalence of BoHV-1 and BoHV-5 in regions where both viruses are endemic are still unknown in view of the lack of a test capable of differentiating these two viruses. The present work focuses on the application of a polymerase chain reaction with primers that can amplify both types using in trigeminal ganglia of cattle, a known site for viral latency. Four hundred trigeminal ganglia were collected from 200 beef cattle in an abattoir in the state of Rio Grande do Sul (Brazil). Total DNA was extracted from these ganglia. A PCR was designed to amplify a homologous region of the gene coding for glycoprotein C (gC), giving rise to a product of about 570 base pairs (bp) for both

viruses. Viral DNA was detected in 167 cattle (83.1%), 21 cattle (10,4%) were negative and in the samples of 13 cattle (6,5%) the amplification was inhibited. Because of the high prevalence of these bovine herpesviruses, control measures have to be taken to diminish the spread of these viruses among the cattle population. At present work is in progress to differentiate between BoHV-1 e BoHV-5.

Keywords: BoHV-1, BoHV-5, trigeminal ganglion; latency, PCR.

Introdução

Os herpesvírus bovino 1 e 5 (BoHV-1; BoHV-5) pertencem à família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae* e são geneticamente e antigenicamente muito semelhantes (ROIZMAN et al., 1992).

O BoHV-1 tem ampla distribuição mundial, sendo associado a quadros como a inotraqueíte infecciosa bovina (IBR), vulvovaginite pustular infecciosa (IPV), balanopostite, conjuntivite, encefalite, aborto e outros problemas reprodutivos (TIKOO et al., 1995). Já o BoHV-5 tem sido associado à encefalite herpética bovina, um quadro caracterizado por uma meningoencefalite não supurativa usualmente afetando animais jovens. As encefalites por BoHV-5 são raras no hemisfério norte (ASHBAUGH et al., 1997). Entretanto, são bastante comuns no hemisfério Sul, particularmente no Brasil, na Argentina e no Uruguai, onde estes vírus têm sido mais estudados (SILVA et al., 2007).

Na verdade, até o presente é desconhecida a prevalência de infecções por BoHV-5, o quê não pode ainda ser determinada em função de, essencialmente, dois fatores: o alto nível de semelhança entre BoHV-1 e BoHV-5 e, em segundo lugar, a indução de anticorpos que apresentam uma reatividade cruzada muito intensa. Testes de soroneutralização e ensaios do tipo ELISA para anticorpos anti-BoHV-1, ou apresentam a reatividade cruzada, ou não foram testados com amostras de animais soropositivos para BoHV-5 (TEIXEIRA et al., 1998).

Membros da subfamília *Alphaherpesvirinae* podem estabelecer infecções latentes em gânglios nervosos, principalmente nos gânglios trigêmeos (THIRY et al., 2006). Esta forma de perpetuação do vírus permite que o animal se torne e permaneça um reservatório natural durante toda a vida.

Com base nisso, o presente trabalho visa o uso da PCR no estudo da prevalência de infecções latentes por Herpesvírus bovinos 1 e 5 em bovinos através da análise de gânglios trigêmeos obtidos de animais aparentemente sadios destinados ao abate em um frigorífico que recebe animais de diferentes regiões do estado do Rio Grande do Sul (Brasil).

Material e Métodos

Células. Células de rim de bovino (MDBK) foram cultivadas, para multiplicação e titulação viral, em meio essencial mínimo de Eagle suplementado com soro fetal bovino, antibiótico e antifúngico a cada 48 horas segundo métodos usuais.

Vírus. Foram utilizadas amostras de BoHV-1 e 5 pertencentes ao estoque do Centro de Pesquisa Veterinária Desidério Finamor (CPVDF) para padronização dos testes *in vitro*.

Amostras de tecido. Amostras de sangue e gânglios trigêmeos foram coletadas de animais submetidos ao abate em um frigorífico localizado no estado do Rio Grande do Sul. Animais, machos e fêmeas, com idade média de 4 anos, oriundos de 40 municípios localizados na sua maioria na metade sul do estado rio-grandense.

Soroneutralização. Os soros foram testados no ensaio de soroneutralização (SN) como previamente descrito por Teixeira et al (1998) para determinar o status sorológico dos animais coletados.

Extração de DNA Viral. O DNA viral das amostras cultivadas e o DNA dos tecidos bovinos foram extraídos como descrito por Van Engelenburg et al. (1993).

Reação em Cadeia da Polimerase. A PCR foi desenhada para amplificar uma região homóloga do gene que codifica a glicoproteína C de BoHV-1 e 5 dando como produto um amplificado de 574pb para BoHV-1 e 571pb para BoHV-5, como descrito por Esteves (2008). A fim de se identificar contaminações, controles negativos e brancos foram adicionados a cada 4 reações.

Controle Interno. O controle interno (CI) foi construído deletando uma região alvo da PCR. Esta construção foi clonada em um plasmídeo dando um produto menor. Com isto, o amplificado, por apresentar tamanho diferente, foi facilmente distinguível após a eletroforese.

Um numero fixo de moléculas do CI foi adicionado a todas reações de PCR a fim de evitar a ocorrência de resultados falso-negativos. Indicando que a falta de amplificação do fragmento alvo não foi devida a algum problema na reação, mas sim, a real ausência de suficiente DNA viral na amostra para ser detectado por esta PCR.

O CI também foi utilizado para determinar a sensibilidade da PCR através de diluições decimais do plasmídeo e para estimar, de uma maneira semi-quantitativa, o número de moléculas de BoHV-1 ou 5 presentes nos gânglios (Van Engelenburg et al., 1993).

Resultados e Discussão

A amplificação da região alvo da porção do gene que codifica a região carboxi-terminal da gC a partir do DNA total extraído dos gânglios trigêmeos de cada animal resultou num amplificado de 574pb para BoHV-1 e 571pb para BoHV-5.

Através da utilização da seqüência de controle interno foi possível determinar a sensibilidade da PCR, e as quantidades das moléculas virais encontradas nos gânglios.

O percentual de animais soropositivos baseado no ensaio de SN foi de 34%. Em enquetes sorológicas, se procura detectar o agente de uma maneira indireta, ou seja, pela presença de anticorpos, o que indica que o animal teve contato com o agente.

Quatrocentas amostras de gânglios, correspondente a 200 animais, foram amplificadas e a presença do DNA viral foi detectada em 167 animais (83,1%), sendo 21 (10,4%) negativos e 13 (6,5%) tiveram a amplificação inibida na PCR. Estes dados demonstram que o percentual de animais contendo o DNA viral latente foi muito superior ao apontado pela sorologia. A PCR é um teste molecular que detecta o agente de uma maneira direta e demonstrou ser mais sensível que a SN.

Conclusões

A PCR utilizada no presente estudo demonstrou ser adequada para a identificação de bovinos infectados com BoHV-1 e BoHV-5 e assim pode ser utilizada na rotina de diagnóstico laboratorial.

Mediante a alta prevalência destes agentes apontadas pelos resultados, medidas de controle devem ser tomadas, utilizando testes mais específicos e sensíveis, a fim de diminuir a disseminação destes vírus na população de bovinos.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, a Universidade Federal de Pelotas, a Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor por propiciarem o desenvolvimento deste estudo.

Referências

ASHBAUGH, S.E.; THOMPSON, K.E.; BELKNAP, E.B.; SCHULTHEISS, P.C.; CHOWDHURY, S.; COLLINS, J.K. Specific detection of shedding and latency of bovine herpesvirus 1 and 5 using a nested polymerase chain reaction. **J. Vet. Diag. Invest.** v.4, p.387-394, 1997.

ESTEVES, P.A.; DELLAGOSTIN, O.A.; PINTO, L.S.; SILVA, A.D.; SPILKI, F.R.; CIACCI-ZANELLA, J.R.; HÜBNER, S.O.; PUENTES, R.; MAISONNAVE, J.; FRANCO, A.C.; RIJSEWIJK, F.A.M.; BATISTA, H.B.C.R.; TEIXEIRA, T.F.; DEZEN, D.; OLIVEIRA, A.P.; DAVID, C.; ARNS, C.W.; ROEHE, P.M. Phylogenetic comparison of the carboxy-terminal region of glycoprotein C (gC) of bovine herpesviruses (BoHV) 1.1, 1.2 and 5 from South America (SA). **Virus Research**, v.131, p.16-22, 2008.

ROIZMAN, B. The family Herpesviridae: an update. **Archives of Virology**, v.123, n.3-4, p.432-445, 1992.

SILVA, M.S.; BRUM, M.C.S.; WEIBLEN, R.; FLORES, E.F. Identificação e diferenciação de herpesvírus bovino tipos 1 e 5 isolados de amostras clínicas no Centro-Sul do Brasil, Argentina e Uruguai (1987-2006). **Pesq. Vet. Bras.** v.27, n.10, p.403-408, 2007.

TEIXEIRA, M.B.; ESTEVES, P.A.; COELHO, C.S.S.; SILVA, T.C.; OLIVEIRA, L.G.; ROEHE, P.M. Diferenças em níveis de anticorpos neutralizantes contra herpesvírus bovinos tipos 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5) por testes de soroneutralização. **Pesq. Vet. Bras.**, v.4, n.1, p.61-65, 1998.

THIRY, J.; KEUSER, V.; MUYLKENS, B.; MEURENS, F.; GOGEV, S.; VANDERPLASSCHEN, A.; THIRY, E. Ruminant alphaherpesviruses related to bovine herpesvirus 1. **Vet. Res.** v.37, p.169–190, 2006.

TIKOO, S. K.; CAMPOS, M.; BABIUK, L. A. Bovine herpesvirus 1 (BHV-1): biology, pathogenesis, and control. **Adv. V. Res.**, v. 45, p.191-223, 1995.

VAN ENGELENBURG, F.A.C.; MAES, R.K.; VAN OIRSCHOT, J.T.; RIJSEWIJK, F.A.M. Development of a Rapid and Sensitive Polymerase Chain Reaction Assay for Detection of Bovine Herpesvirus Type 1 in Bovine Semen. **Journal of Clinical Microbiology**. v.31, n. 12, p.3129-3135. 1993.