

## AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE HERPESVÍRUS BOVINO 1 E 5 NO SÊMEN DE BOVINOS PELA TÉCNICA DE NESTED PCR

Evaluación de la presencia de herpesvirus bovino 1 y 5 en semen bovino por la técnica de nested PCR

### Detection of bovine herpesviruses types 1 and 5 in semen by nested polymerase chain reaction

OLIVEIRA, M.T.<sup>1</sup>; CAMPOS, F.S.<sup>1\*</sup>; RIJSEWIJK, F.A.M.<sup>1</sup>; FRANCO, A.C.<sup>1</sup>; ROEHE, P.M.<sup>1</sup>

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

**Resumo:** O herpesvírus bovino 1 (BoHV-1) e 5 (BoHV-5) são importantes patógenos do trato respiratório e genital de bovinos. A presença desses vírus foi avaliada em amostras de sêmen através de reações em cadeia da polimerase (PCR), desenhada tendo como alvo uma porção do gene que codifica a região carboxi-terminal da glicoproteína C. Utilizou-se para amplificação um par de primers não específicos para os tipos virais. Para identificar resultados falsos, foi adicionado um controle interno em cada reação e controles negativos a cada quatro PCRs. O número de genomas virais de BoHV-1 ou 5 que pode ser detectado neste ensaio foi entre vinte e duzentas cópias. Foram analisadas 34 amostras de sêmen cru e 3 amostras de sêmen congelado em palheta de animais reprodutores. DNA viral foi detectado em 36 das 37 amostras. Não foi possível isolar vírus das amostras analisadas. Esses resultados indicam que mais amostras devam ser estudadas para que a importância da detecção de DNA desses vírus no sêmen possa ser determinada, assim como seu significado na transmissão de vírus infeccioso através da reprodução. É, portanto, recomendável que amostras de sêmen sejam examinadas rotineiramente para diminuir o risco de novas infecções e problemas reprodutivos potencialmente associados a BoHV-1 e 5.

**Palavras-chave:** BoHV-1, BoHV-5, PCR, prevalência, sêmen.

**Abstract:** Bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1) and type 5 (BoHV-5) are important pathogen of the respiratory and genital tract of cattle. In the present study a search was carried out to evaluate the presence of BoHV-1 and 5 in sample semen by polymerase chain reactions (PCR), designed targeting the C-terminal region of the glycoprotein C gene. Amplification using non-type specific primers derived from gC sequences. To identify false results, negative control reactions were added to each set of four PCRs and an internal control was added to each reaction. The number of viral genomes of BoHV-1 or 5 that could still be detected with this test was between two hundred copies and twenty copies. Non-specific reactions were not observed when the PCR was assessed with other viruses. The test was used to examine 34 samples of crude semen and 3 samples of frozen in paillettes semen from breeding animals. Viral DNA was detected in 36 of 37 samples. Virus

isolation was not achieved in any sample. These results suggest a high prevalence of BoHV-1 and/or BoHV-5 infections in semen and highlight the importance of screening for such viruses to reduce the risk of BoHV-1 and BoHV-5 spreading. More sample still need to be evaluated to establish the prevalence of BoHV in semen.

**Keywords:** BoHV-1, BoHV-5, PCR, prevalence, semen.

## Introdução

Herpesvírus bovinos (BoHV) são patógenos de grande importância veterinária, responsável por grandes perdas econômicas (WEIBLEN et al.1992; SILVA et al. 2000). O herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) provoca mais freqüentemente doenças respiratórias e genitais em bovinos, ao passo que o estreitamente relacionado BoHV-5 é a principal causa de meningoencefalite herpética em bovinos, mas pode também infectar o trato genital. Ambos têm sido associados a falhas reprodutivas, como a retorno ao cio e abortos, o que provavelmente representam as mais significativas perdas ligadas aos herpesvírus bovinos. BoHV-1 e BoHV-5 provocam um alto índice de reações cruzadas em métodos sorológicos padrões, devido ao seu elevado grau de semelhança antigênica e molecular; por conseguinte, a prevalência tipo específico ainda não foi determinada (TEIXEIRA et al. 1998). Como quase todos os estudos sorológicos realizados até hoje empregaram o BoHV-1 como fonte de antígeno ou vírus de desafio, apenas a prevalência de BoHV-1 foi avaliada. Por outro lado, a prevalência de infecções BoHV-5 permanece desconhecida, assim como permanece desconhecido o quanto da prevalência estimada como sendo por BoHV-1 é realmente devido a BoHV-5 ou a co-infecções. Tal como outros alfaherpesvirus, o BoHV-1 e o BoHV-5 pode causar infecções latentes nos gânglios trigêmeos e para-vertebrais, de onde eles podem, eventualmente, ser reativado. Durante episódios de reativação, a replicação viral pode disseminar os vírus nos locais de primo-infecção, assim, a reativação de infecções genitais pode levar a infecção do sêmen, tornando-o uma fonte potencial de insucesso reprodutivo (VAN ENGELENBURG et al. 1993;). Tendo isto em perspectiva, o presente trabalho tem como objetivo fazer uma análise molecular, através de uma reação em cadeia da polimerase (PCR), da presença de BoHV-1 e 5 para avaliar a prevalência de cada infecção em amostras de sêmen de touros reprodutores do estado do Rio Grande do Sul, Brasil.

## Material e Métodos

**Amostras.** Foram obtidas 34 amostras de sêmen *in natura* de uma fazenda de Rio Pardo (Rio Grande do Sul, Brasil) e três amostras de sêmen em palheta de um centro de inseminação artificial. Todas foram armazenadas a -20°C. Histórico sorológico dos doadores não estava disponível.

**Extração de DNA.** Para cada amostra, cinquenta microlitros de sêmen foram centrifugados (14000 x g durante 10 min). Todo o sobrenadante foi misturado com um volume de TE (10 mM Tris, pH 7,5, 1mM EDTA) q.s.p. 200µl. Então, adicionou-se 22µl de dodecil sulfato de sódio (SDS 10%), 0,5µl tRNA (10,3

mg/ml), 1µl proteinase K (20mg/ml) e 2µl de controle interno (CI) e incubou-se a 37°C durante 1h. Posteriormente, foi adicionado um volume de fenol saturado (pH 8,0) e 0,3M de NaCl. A mistura ficou à temperatura ambiente durante 30 min sob leve agitação, seguida de centrifugação (14000 x g durante 12 min). Após, 2,5 volumes de etanol absoluto foram adicionados. Depois de incubação a -20°C durante 30 min e de centrifugação (20 minutos a 14000 x g), o DNA obtido foi suspenso em 20µl TE.

**Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).** 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 PCR foi realizada em um volume de 25µl, contendo 1mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,3µM de cada primer, 10% de DMSO (Acros orgânicos), 0,6mM de desoxinucleosídeos trifosfatos (ABgene), 1x tampão Rxn PCR (Invitrogen) e 1U de Taq polimerase (Invitrogen) por reação, além de uma quantidade fixa de moléculas de controle interno (CI): o produto alvo da primeira PCR deletado, produzindo um fragmento menor, que co-amplifica com o mesmo par de *primers* do fragmento alvo da reação, mas distinguível por eletroforese. Para identificar contaminações, controles brancos foram adicionados a cada 4 reações. As reações realizadas (termociclador Mastercycler Eppendorf) obedeceram às seguintes condições: 1 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 60°C e 1 min a 72°C; 5 min a 72°C.

Os produtos foram analisados por eletroforese em gel TAE-agarose 1,5% (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA), corados com brometo de etídio (0,5µg/mL) e comparados na primeira reação com pUC19x*Hinfl*, como marcador de peso molecular, e com pUC19x*Ddel* na segunda.

## Resultados e Discussão

Está bem estabelecido que o vírus presente no sêmen está na fração fluido celular, uma vez que o vírus replica-se nas células epiteliais de prepúcio, do pênis e provavelmente na uretra distal, contaminando o sêmen durante a ejaculação (VAN ENGELENBURG 1993). Assim, antes da digestão das amostras, foi realizada uma centrifugação para evitar todo o rico conteúdo do sêmen, conhecido por inibir reações.

A PCR foi concebida com base nas diferenças de cada tipo viral do gene da glicoproteína C, uma das três grandes proteínas de ligação do BoHV-1 e 5. Concentramos inicialmente nossos esforços no controle de resultados falsos. Para evitar resultados falso-negativos, moléculas de CI foram adicionadas ao PCR de cada amostra. Esse controle é um fragmento que co-amplifica na reação com o mesmo par de primers utilizados para a amplificação do produto alvo. Se nenhuma banda era vista, a reação era repetida, alterando a quantidade de amostra acrescentada. Se apenas a banda controle era visível, o resultado era considerado negativo. Agora, se somente a seqüência alvo podia ser vista, o resultado ainda era considerado positivo. Embora este CI compita na reação com a amostra, isso não representa um problema na prática, uma vez que o CI co-amplifica com praticamente a mesma eficiência que a seqüência viral e que podemos controlar o número de cópias de CI adicionadas. A fim de evitar reações

falso-positivas, os primers foram testados com outros herpes bovinos e reações não-específicas não foram observadas. Para evitar problemas de contaminações, todos os reagentes PCR foram preparados em uma sala separada de onde a extração de DNA e a PCR foram realizadas. Também a extração de DNA foi realizada em uma área diferente de onde os produtos de PCR foram analisados. Por último, para cada conjunto de 4 reações, nós realizamos uma reação negativa ou sem amostra (Fig. 1 e 2).

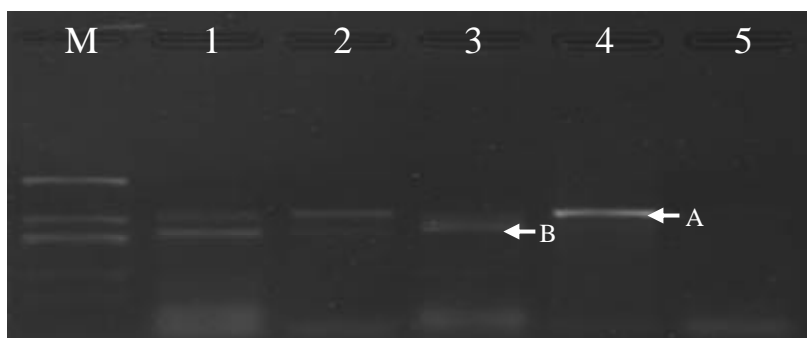


Figura 1: Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio da PCR com primers flanqueadores. Seta “A”: seqüência alvo com aproximadamente 570 pb; Seta “b”: controle interno (440 bp) em uma amostra negativa; M : marcador de peso molecular pUC19xHinfI; colunas 1, 2 e 4: amostras positivas para BoHV-1 ou 5; colunas 3 e 5: controles negativos

Com este PCR, o número de genomas virais de BoHV-1 ou 5 que ainda pode ser detectado foi entre 20-200 cópias. Nesta análise, DNA viral foi detectado em 36 das 37 amostras. Uma amostra não pôde ser avaliada, devido a uma constante de inibição da PCR. Esses resultados sugerem que as amostras de sêmen aqui examinadas são de touros que foram provavelmente infectados com ambos os tipos virais. Tão elevado número de amostras positivas para BoHV foi alarmante. Isto pode ser explicado parcialmente devido à maior parte das amostras de sêmen examinadas advir de uma mesma propriedade. A prevalência de infecções em bovinos por BoHV está atualmente em revisão, tanto através de métodos sorológicos, quanto moleculares, em nosso laboratório. Contudo, a fim de se estabelecer uma prevalência de infecção viral no sêmen, um número significativo de amostras ainda precisa ser examinado.

Detecção de BoHV por PCR em amostras clínicas, tais como o sêmen e esfregaço nasal, tem provado ser um pouco mais sensíveis e mais rápidas que o isolamento viral. Além disso, o sêmen pode ser citotóxico para a cultura celular e o isolamento viral exige um armazenamento adequado de amostras, o que pode ser difícil de se concretizar na área (VAN ENGELENBURG 1993).

Muitos países têm tomado medidas de controle para impedir a propagação da infecção. Alguns países europeus como a Dinamarca e a Finlândia conseguiram erradicar a infecção, tendo obtido esta condição por meio da identificação e eliminação dos bovinos soropositivos. Outros países, como a Alemanha e a Suíça, puseram em prática programas para a erradicação da BoHV-1 através da vacinação obrigatória de todos os animais, identificação e eliminar progressiva dos portadores. Além disso, estes países implementaram barreiras na venda de sêmen ou de terneiros aos seus criadores, exigindo produtos livres BoHV (ALEGRE et al., 2001). O controle destas infecções no

Brasil é difícil, pois, se por um lado os rebanhos são muito grandes para a eliminação, por outro, não há vacina disponível contra o BoHV-5, e é controversa se a vacina contra BoHV-1 daria proteção cruzada contra BoHV-5 (SPILKI et al. 2004).

### **Conclusões**

Aqui apresentamos um método sensível para detectar BoHV-1 e/ou BoHV-5 em amostras de sêmen.

Mais amostras ainda precisam ser analisadas para se determinar uma prevalência das infecções por BoHV-1 e 5 em sêmen.

Devido a todos os problemas reprodutivos que ambos os vírus podem causar e à elevada prevalência de infecção que encontramos nas amostras, sugerimos que uma análise das amostras de sêmen deve ser realizada rotineiramente para diminuir o risco de novas infecções por BoHV-1 e/ou 5.

### **Referências**

ALEGRE, M., Nanni, M. & Fondevila, N. 2001. Development of a multiplex polymerase chain reaction for the detection of bovine herpesvirus-1 and 5. *J Vet Med B* 48:613-621.

ASHBAUGH, S. E., Thompson, K. E., Belknap, E.B., Schultheiss, P.C., Chowdhury, S. & Collins, J.K. 1997. Specific detection of shedding and latency of bovine herpesvirus 1 and 5 using a nested polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest* 9:387-394.

CLAUS, M.P., Alfieri, A.F., Folgueras-Flatschart, A.V., Wosiacki, S.R., Médici, K.C. & Alfieri, A.A. 2005. Rapid detection and differentiation of bovine herpesvirus 1 and 5 glycoprotein C gene in clinical specimens by multiplex-PCR. *J Virol Met* 128(1-2):183-8.

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.

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. 2000. Molecular and antigenic characterization of bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) isolated from semen. *Virus Res* 5(2):116.

SPILKI F.R., Silva A.D., Hübner S., Esteves P.A., Franco A.C., Driemeier D. & Roehe P.M. 2004. Partial protection induced by a BoHV-1 recombinant vaccine against challenge with BoHV-5. *Ann N Y Acad Sci*. 1026:247-50.

TEIXEIRA, M.B., Esteves, P.A., Coelho, C.S.S., Silva, T.C., Oliveira, L.G. & Roehe, P.M. 1998. Diferenças em níveis de anticorpos neutralizantes contra herpesvírus bovinos tipos 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5) por testes de soroneutralização. Pesquisa Veterinária Gaúcha 4(1):61-65.

VAN ENGELENBURG, F. A. C., Maes, R. K., Van Oirschot, J. T. & Rijsewijk, F. A. M. 1993. Development of a Rapid and Sensitive Polymerase Chain Reaction Assay for Detection of Bovine Herpesvirus Type 1 in Bovine Semen. J. Clin Microbiol 31(12):3129-3135

WEIBLEN, R., Kreutz, L C., Canabarro, T.F., Schuch, L.F. & Rebelato, M.C. 1992. Isolation of bovine herpesvírus 1 from preputial swabs and semen of bull with balanoposthitis. J Vet Diagn Inv 4:341-343.