



DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO GENÉTICA DE HERPESVÍRUS EM EQUINOS DA REGIÃO SUL DO RIO GRANDE DO SUL

AMANDA DE OLIVEIRA BARBOSA¹; FRANCIELLE LIZ MONTEIRO²;
TAMIRES ELLEN TOMIO¹; LEONARDO CLASEN RIBEIRO¹; LARIANE DA
SILVA BARCELOS¹; MARCELO DE LIMA³

¹Universidade Federal de Pelotas – barbosa.oamanda@gmail.com,
tamitomio@hotmail.com, leo_clasen92@hotmail.com, larianebarcelos@gmail.com

²Hospital de Clínicas de Porto Alegre – flmonteiro@hcpa.edu.br

³Universidade Federal de Pelotas – mdelima.ufpel@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

As infecções pelos herpesvírus em equinos são endêmicas e frequentemente associadas à doença clínica e importantes prejuízos econômicos em nível mundial (OLADUNNI et al., 2019). Classificados na família *Herpesviridae*, os herpesvírus são vírus envelopados com genoma DNA fita dupla linear (FRANCO et al., 2017). São descritos nove herpesvírus que infectam equídeos, sendo cinco capazes de infectar cavalos domésticos, os *Alphaherpesvirus equideo tipos 1, 3 e 4* (EHV-1, 3 e 4), pertencentes ao gênero *Varicellovirus* e os *Gammaherpesvirus equideo tipos 2 e 5* (EHV-2 e 5), pertencentes ao gênero *Percavirus* (ICTV, 2019).

O EHV-1 é considerado um dos patógenos virais mais importantes e prevalentes de cavalos (OLADUNNI et al., 2019). As infecções por EHV-1 podem resultar em doença respiratória, reprodutiva e, em menor frequência, doença neurológica (NEGUSSIE et al., 2017; HUSSEY, 2019). A infecção por EHV-4 é restrita ao trato respiratório, sendo considerado um dos principais patógenos causadores de doença respiratória aguda em equinos (NEGUSSIE et al., 2017). A infecção por EHV-3 causa doença venérea em éguas e garanhões, conhecida como exantema coital equino (FRANCO et al., 2017).

O real impacto clínico das infecções pelo EHV-2 e 5 ainda não é bem esclarecida. Entretanto, o EHV-2 tem sido relacionado com doença respiratória, ocular, imunossupressão e úlceras gástricas (PENNINGTON et al., 2017; DALL AGNOL et al., 2019), e o EHV-5 tem sido relacionado a casos de fibrose multinodular pulmonar equina (EMPF) (WILLIAMS et al., 2007; ESTIMA-SILVA et al., 2019).

Após a infecção primária, os herpesvírus possuem a capacidade de estabelecer latência nos linfócitos e gânglio trigêmeo do hospedeiro (FRANCO et al., 2017). Dessa forma, o animal torna-se portador e, em períodos de estresse e imunossupressão, pode ocorrer a reativação e excreção viral, contribuindo para a disseminação desses patógenos nos rebanhos equinos (GILKERSON et al., 2015).

No Brasil, a maioria dos estudos envolvendo o EHV-1 e EHV-4 são sorológicos (DIEL et al., 2006; AGUIAR et al., 2008; DIAZ et al., 2015). Entretanto, há trabalhos de detecção e identificação genética demonstrando EHV-1 em infecções latentes (CARVALHO ET AL., 2000) e associado com enfermidades (ESTIMA-SILVA et al., 2019). Para EHV-2 e EHV-5, somente em 2019 foi publicado o primeiro relato de detecção em animais assintomáticos (DALL AGNOL et al., 2019). Além disso, os dois casos de EMPF relacionados ao EHV-5 no país foram descritos na região sul (PANZIERA et al., 2014; ESTIMA-SILVA et al., 2019).

Considerando a escassez de dados, principalmente no que se diz respeito a situação epidemiológica de EHV-2 e EHV-5 e, devido à importância clínica e econômica desses agentes, o objetivo do trabalho foi detectar e identificar geneticamente herpesvírus (EHV-1, EHV-2, EHV-4 e EHV-5) em amostras clínicas de equinos da região sul do Rio Grande do Sul.

2. METODOLOGIA

Foram coletadas amostras de sangue e de secreção nasal de 179 equinos de sete propriedades (A - F) nos municípios de Pelotas, Capão do Leão, Bagé e Jaguarão. As amostras de sangue foram coletadas em tubos contendo EDTA, e a secreção nasal foi coletada com o auxílio de *swabs* estéreis e armazenada em solução contendo meio essencial mínimo (MEM) e antibióticos. Os materiais foram mantidos sob refrigeração durante o transporte até o Laboratório de Virologia e Imunologia da Universidade Federal de Pelotas (LabVir/UFPEL). O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEa) da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) sob o número 13938-2019.

A extração de DNA da capa de leucócitos, obtida a partir das amostras de sangue, e da secreção nasal, foi realizada com o *kit* comercial *ReliaPrep™ Viral TNA Miniprep*. Em seguida, foi realizada a reação em cadeia da polimerase (PCR) do tipo *semi-nested multiplex* para detecção de EHV-1/4 e do tipo *nested multiplex* para detecção de EHV-2/5, ambos para amplificação de fragmentos do gene da glicoproteína B (gB) (WANG et al., 2007).

Além das amostras de sangue e secreção nasal, foi processada uma amostra de tecido pulmonar parafinado de um animal da propriedade F, que veio a óbito alguns meses antes da coleta das amostras, e teve o diagnóstico histológico de EMPF pelo Laboratório Regional de Diagnóstico, LRD – UFPEL (dados não mostrados). Para a extração do DNA dessa amostra foi utilizado o *kit* comercial *ReliaPrep™ FFPE gDNA Miniprep System*, conforme instruções do fabricante. Posteriormente, foi realizada PCR convencional para amplificação de um fragmento do gene da gB (PANZIERA et al., 2014).

As reações de PCR foram elaboradas contendo 100-200 ng de DNA, 1x *GoTaq® Colorless Master Mix* e 0,4 µM de cada *primer*. As condições da PCR seguiram a referência dos primers. Para a eletroforese, realizada em gel de agarose 1,5%, foi utilizado o corante *Blue Green Loading Dye I*. Em seguida, o gel foi visualizado sob luz UV.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram analisadas amostras de sangue, secreção nasal e uma amostra de tecido pulmonar parafinado, obtidas de equinos distribuídos em sete propriedades da região sul do Rio Grande do Sul, com o objetivo de detectar e identificar geneticamente o EHV-1, 2, 4 e 5.

O EHV-1, EHV-2 e EHV-4 foram detectados em 4,47% (8/179), 0,56% (1/179) e 2,23% (4/179) das amostras de sangue, respectivamente. Nas amostras de secreção nasal, o EHV-1 foi detectado em 2,73% (3/110) das amostras, enquanto o EHV-2 foi detectado em 2,79% (5/179) e o EHV-4 em 8,18% (9/110). O EHV-5 foi detectado em 7,26% (13/179) das amostras de sangue e não foi detectado nas amostras de secreção nasal.

Das sete propriedades onde foram realizadas as coletas, três tiveram animais positivos. Na propriedade A, houve detecção de EHV-1 e EHV-4 nas amostras de sangue, sendo 11,43% (8/70) das amostras positivas para EHV-1 e 5,71% (4/70) positivas para o EHV-4. Nessa propriedade havia histórico de doenças respiratórias e reprodutivas, porém, no momento da coleta nenhum animal apresentava sinais clínicos. Dessa forma, os achados são sugestivos de infecção latente, considerando que os linfócitos são apontados pela literatura como sítio de latência para o EHV-1 e 4 (CARVALHO et al., 2000; PUSTERLA et al., 2010). Já na propriedade G, somente o EHV-4 foi detectado em uma amostra (1/5) de secreção nasal, também sugerindo excreção viral.

Na propriedade F, nas amostras de secreção nasal, 8,57% (3/35) foram positivas para EHV-1, 22,86% (8/35) para EHV-4 e 14,29% (5/35) para EHV-2. A presença de DNA viral nas amostras de secreção nasal sugere excreção viral no momento da coleta, podendo ser infecção primária ou período de reativação viral com ou sem recrudescência clínica. Além disso, das amostras de sangue, 2,86% (1/35) foi positiva para EHV-2 e 37,14% (13/35) foram positivas para EHV-5. A detecção do DNA viral nas amostras de sangue sugere a ocorrência de infecções latentes, visto que os linfócitos B são considerados como principal sítio de latência para o EHV-2 (GILKERSON et al., 2015). A presença do EHV-5 exclusivamente nas amostras de sangue também foi descrita por Van Cleemput e colaboradores (2019), onde foi observado que linfócitos infectados podem entrar em apoptose ou permanecer como reservatório do vírus em animais infectados. A amostra de tecido parafinado, também da propriedade F, foi positiva para EHV-5, confirmando o diagnóstico de EMPF associado ao EHV-5.

Além das detecções individuais, foi observado a presença de infecções mistas duplas (EHV-1/4 $n=1$; EHV1/5 $n=1$; EHV-4/5 $n=2$ e EHV-2/4 $n=2$) e triplas (EHV-1/4/5 $n=1$ e EHV2/4/5 $n=1$). Coinfecções por herpesvírus já foram descritas por outros autores (WANG et al., 2007; NEGUSSIE et al., 2017; DALL AGNOL et al., 2019), porém, o real significado clínico necessita de investigações adicionais.

4. CONCLUSÕES

A partir da detecção e identificação genética de EHV-1, EHV-2, EHV-4 e EHV-5, podemos concluir que há ocorrência e circulação desses patógenos nos rebanhos equinos da região sul do Rio Grande do Sul. Esses dados representam uma contribuição para o diagnóstico e conhecimento da situação epidemiológica desses agentes em nível regional e nacional.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, D. M.; CAVALCANTE, G. T.; LARA, M. C. C. S. H., et al. Prevalência de anticorpos contra agentes virais e bacterianos em equídeos do município de Monte Negro, Rondônia. Amazônia Ocidental Brasileira. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v. 45, n. 4, p. 269-276, 2008.
- CARVALHO, R.; OLIVEIRA, A.; SOUZA, A. M.; PASSOS, L. M. F.; MARTINS, A. S. Prevalence of equine herpesvirus type 1 latency detected by polymerase chain reaction. **Arch. Virol**, v. 145, p. 1773–1787, 2000.
- DALL AGNOL, A. M. D. et al. Detection of Equid gammaherpesvirus 2 and 5 DNA in the upper respiratory tract of asymptomatic horses from Southern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 3, p. 875–878, 2019.
- DIAZ, K. A. F.; HÜBNER, S. D. O.; VARGAS, G.; FISCHER, G.; LILENBAUM, W.; DE LIMA, M. Ocorrência de anticorpos contra o herpesvírus equino e vírus da arterite equina em rebanhos equinos do estado do Rio de Janeiro. **Ciência Animal Brasileira**, v. 16, n. 3, p. 410-418, 2015.
- DIEL, D. G.; et al. Prevalência de anticorpos contra os vírus da influenza, da arterite viral e herpesvírus em equinos do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 5, p. 1467-1473, 2006.
- ESTIMA-SILVA, P.; RIET-CORREA, F.; COELHO, A. C. B.; ECHENIQUE, J. V. Z.; MARCOLONGO-PEREIRA, A. C.; DE LIMA, M.; DIEL, D. G.; SCHILD, A. L. P. Identification of equine herpesvirus type 1 as cause of abortion in mares in Southern Brazil. **Arq. Bras. De Med. Vet. e Zootec.** V. 71, p. 1421-1424, 2019.



FRANCO, A.C.; ROEHE, P.M. Herpesviridae. In: FLORES, E. F. **Virologia Veterinária: Virologia Geral e Doenças Víricas**. p. 433-488, 3ª ed., editora UFSM, Santa Maria, 2017.

GILKERSON J.R., BAILEY K.E., DIAZ-MENDEZ A., HARTLEY C.A. Update on viral diseases of the equine respiratory tract. **Veterinary Clinics: Equine Practice**, Melbourne, v. 31, n. 1, p. 91–104, 2015.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT/2000/XP. **Nucleic Acids Symp. Ser.** V. 41, p. 95–98, 1999.

HUE, E. S. et al. Detection and quantitation of equid gammaherpesviruses (EHV2, EHV-5) in nasal swabs using an accredited standardised quantitative PCR method. **Journal of Virological Methods**, v. 198, p. 18-25, 2014.

HUSSEY, G. S. Key Determinants in the Pathogenesis of Equine Herpesvirus 1 and 4 Infections. **Veterinary Pathology**, v. 56, n. 5, p. 656-659, 2019.

ICTV, **International Committee on Taxonomy of Viruses**. Acesso em 02 de setembro de 2020. Online. <<https://talk.ictvonline.org>>, 2019.

NEGUSSIE, H.; GIZAW, D.; TESFAW, L.; LI, Y.; OGUMA, K.; SENTSU, H.; NAUWYNCK, H. J. Detection of Equine Herpesvirus (EHV) -1, -2, -4 and -5 in Ethiopian Equids with and without Respiratory Problems and Genetic Characterization of EHV-2 and EHV-5 Strains. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 64, n. 6, p. 1970–1978, 2017.

OLADUNNI, F. S.; HOROHOV, D. W.; CHAMBERS, T. M. EHV-1: A Constant Threat to the Horse Industry. **Frontiers in Microbiology**, p.1-25, 2019.

PANZIERA, W.; GIARETTA, P. R.; GALIZA, G. J. N.; LIM, A.; BOLIN, S. R.; BORGES, C. H.; FIGHERA, R. A.; BARROS, C. S. L. Equine multinodular pulmonary fibrosis associated with equine herpesvirus 5 in a horse in Brazil. **Braz. J. Vet. Pathol.** V. 7, n. 1, p. 17-20, 2014.

PENNINGTON, M. R. et al. First demonstration of equid gammaherpesviruses within the gastric mucosal epithelium of horses. **Virus Research**, v. 242, p. 30-36, 2017.

STADEN, R. The Staden sequence analysis package. **Mol. Biotechnol.** V. 5, p. 233-241, 1996.

VAN CLEEMPUT, J.; POELAERT, K. C.; LAVAL, K.; NAUWYNCK, H. J. Unravelling the first key steps in equine herpesvirus type 5 (EHV5) pathogenesis using ex vivo and in vitro equine models. **Veterinary Research**, v. 50, n. 1, p.13, 2019.

WANG L. et al. Detection of respiratory herpesviruses in foals and adult horses determined by nested multiplex PCR. **Veterinary Microbiology**, v. 121, p.18–28, 2007.

WILLIAMS, K. J.; MAES, R.; DEL PIERO, F.; LIM, A.; WISE, A.; BOLIN, D.C.; CASWELL, J.; JACKSON, C.; ROBINSON, N. E.; DERKSEN, F.; et al. Equine multinodular pulmonary fibrosis: A newly recognized herpesvirus-associated fibrotic lung disease. **Vet Pathol**, v. 44, p. 849–862, 2007.