

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Dissertação

**Infecções latentes por Herpesvírus bovino tipo 1 e 5
em búfalos (*Bubalus bubalis*) provenientes da região
sul do Brasil**

Daiana Maciel Medeiros

Pelotas, 2014

DAIANA MACIEL MEDEIROS

Infecções latentes por Herpesvírus bovino tipo 1 e 5 em búfalos (*Bubalus bubalis*) provenientes da região sul do Brasil

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de conhecimento: Veterinária Preventiva).

Orientador: Prof. Dr. Geferson Fischer

Co-orientador (es): Prof. Dr. Marcelo de Lima

Dr. Fabrício de Souza Campos

Pelotas, 2014

Dados de catalogação na fonte:
Maria Beatriz Vaghetti Vieira – CRB 10/1032

Biblioteca de Ciência & Tecnologia – UFPel

M488d Medeiros, Daiana Maciel

Detecção de infecções por Herpesvírus bovino tipo 1 e 5 em búfalos (*Bubalus bubalis*) provenientes da região sul do Brasil / Daiana Maciel Medeiros. – 37f. ; il. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Área de concentração: Veterinária Preventiva. Universidade Federal de Pelotas. Faculdade de Veterinária. Pelotas, 2014. – Orientador Geferson Fischer ; co-orientador Marcelo de Lima e Fabrício de Souza Campos.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Geferson Fischer (Orientador)

Prof. Dr. Marcelo de Lima (Universidade Federal de Pelotas)

Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite (Universidade Federal de Pelotas)

Prof. Dr. Mário Celso Esperotto Brum (Universidade Federal do Pampa)

“O homem não pode desejar nada, a menos que antes compreenda que ele só pode contar consigo mesmo; que está sozinho, abandonado na Terra, sem outros objetivos a não ser os que ele mesmo estabelecer, sem outro destino a não ser o que ele forjar.”

Jean Paul Sartre

RESUMO

MEDEIROS, Daiana Maciel. **Infecções latentes por Herpesvírus bovino tipo 1 e 5 em búfalos (*Bubalus bubalis*) provenientes da região sul do Brasil**. 2014. 37f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Infecções pelo herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) têm sido amplamente detectadas em rebanhos bovinos brasileiros, e são responsáveis por grandes prejuízos econômicos na bovinocultura. Entre as doenças causadas por esse vírus estão a Rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), Vulvovaginite Pustular Infecciosa (IPV) e Balanopostite Pustular Infecciosa (IBP). O impacto econômico dessa enfermidade é devido principalmente a falhas reprodutivas, como retorno ao estro e abortamentos. A espécie bovina é hospedeira natural do BoHV-1, no entanto, estudos sorológicos realizados em diversos países têm sugerido que búfalos (*Bubalus bubalis*) podem ser suscetíveis ao herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1), e outros alfa herpesvírus geneticamente relacionados. Apesar de os bovinos se infectarem naturalmente pelo BoHV-1, a distribuição dessa enfermidade na espécie bubalina não tem sido estudada no Brasil, e as informações são limitadas e suportadas apenas por inquéritos sorológicos. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi detectar a presença de DNA viral de BoHV-1 em 202 gânglios trigêmeos de bubalinos coletados em um abatedouro localizado no município de Pelotas através de uma *Semi-Nested* PCR (SN-PCR) para detecção parcial do gene da glicoproteína D (gD) do envelope do BoHV-1. Além disso, 242 amostras de soro foram testadas pela técnica de soroneutralização (SN) para a detecção de anticorpos neutralizantes frente a diferentes amostras de herpesvírus de ruminantes: BoHV-1 (cepa Los Angeles), BoHV-5 (cepa Riopel - RP), e BuHV (cepa B6). O DNA de BoHV-1 foi detectado em 30,1% dos animais, e os resultados da SN mostraram que 27,6% dos animais apresentaram anticorpos neutralizantes contra, pelo menos, um dos vírus testados. Os resultados demonstram que o BoHV-1 circula em rebanhos bubalinos na região sul do Brasil, e apesar da reatividade cruzada, anticorpos anti-BoHV-5 e anti-BuHV-B6 também foram identificados na população estudada. Este é o primeiro estudo que utiliza testes moleculares para a detecção de infecções latentes por BoHV-1 na espécie bubalina no Brasil.

Palavras-chave: herpesvírus bovino. búfalos. infecções latentes. doenças infecciosas.

ABSTRACT

MEDEIROS, Daiana Maciel. **Infecções latentes por Herpesvírus bovino tipo 1 e 5 em búfalos (*Bubalus bubalis*) provenientes da região sul do Brasil**. 2014. 37f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Infections caused by the bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1) have been widely detected in Brazilian cattle, and they are responsible for major economic losses to the cattle industry. Among the diseases caused by this virus there are infectious rhinotracheitis (IBR), Infectious Pustular vulvovaginitis (IPV) and balanoposthitis Infectious Pustular (IBP). The economic impact of this disease is mainly due to reproductive failures, such as return to estrus and abortions. The bovine is a natural host of BoHV-1, however, serologic studies in several countries have suggested that buffaloes (*Bubalus bubalis*) may be susceptible to bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1), and other genetically related alphaherpesvirus. Despite the cattle become infected naturally by BoHV-1, the distribution of this disease in the buffalo species has not been studied in Brazil, and the information is limited and only supported by serological surveys. Thus, the aim of this study was to detect the presence of viral DNA of BHV - 1 in trigeminal ganglia of 202 buffaloes collected in a slaughterhouse located in the city of Pelotas through a semi -nested PCR (SN - PCR) for detection of partial gene glycoprotein D of BoHV-1. In addition, 242 serum samples were obtained and tested by the serum neutralization (SN) technique for the detection of neutralizing antibodies against different samples of herpesvirus: BHV -1 (Los Angeles strain) , BHV -5 (strain Riopel - RP) and BuHV (strain B6). The BHV -1 DNA was detected in 30.1 % of the animals and the results of SN showed that 27.68 % of the animals had neutralizing antibodies against at least one of the tested viruses. This is the first study that uses molecular tests for the detection of latent BoHV - 1 in buffalo species in Brazil.

Keywords: bovine herpesvirus . buffaloes . Latent infections . infectious diseases.

LISTA DE FIGURAS

Artigo 1 Infecções latentes por Herpesvirus bovino tipo 1 em búfalos (*Bubalus bubalis*) no Brasil

Figura 1 Gel de agarose a 1,5% evidenciando a amplificação de um
 fragmento de 358 pb do DNA mitocondrial bubalino (canaletas 2 a
 7). Caneleta 1: Marcador de tamanho molecular 100
 pb.....30

Figura 2 Gel de agarose a 1,5% evidenciando a amplificação do produto final da
 Semi-nested-PCR de 425 pb (canaletas 2,4, 5 e 7). Caneleta 1: Marcador
 de tamanho molecular 100 pb.....31

Lista de Abreviaturas

°C - graus Celsius

% - porcentagem

Acs – anticorpos

BHV - herpesvírus

BoHV-1 – herpesvírus bovino tipo 1

BoHV-5 – herpesvírus bovino tipo 5

BuHV – herpesvírus bubalino

CO₂ – dióxido de carbono

DICC₅₀ - doses infectantes para 50% dos cultivos celulares

ECP – efeito citopático

DNA – ácido desoxirribonucleico

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

EMEM – meio essencial mínimo com sais de Eagle

gB - glicoproteína B

gC - glicoproteína C

gD - glicoproteína D

gE - glicoproteína E

gG - glicoproteína G

gH - glicoproteína H

gI - glicoproteína I

gK - glicoproteína K

gL - glicoproteína L

gM - glicoproteína M

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IBR - rinotraqueíte infecciosa bovina

IPB - balanopostite pustular infecciosa

IPV - vulvovaginite pustular infecciosa

Kb - kilobase

M - molar

MDIC - Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior

mL - mililitros

mM - milimolar

µg - micrograma

µL – microlitro

mg - miligrama

mL – mililitro

NaCl – cloreto de sódio

N-PCR – *Nested* PCR

OIE: Organização Mundial de Saúde Animal

PCR- Reação em cadeia da polimerase

SN-PCR – *Semi-Nested* PCR

pb – pares de base

pH- potencial hidrogeniônico

RNA – ácido ribonucléico

SFB: soro fetal bovino

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SN - soroneutralização

SN-PCR – *Semi-Nested* PCR

TCID₅₀ – dose infectante a 50% do cultivo

UFPeI – Universidade Federal de Pelotas

TAE – tris acetado com EDTA

TEN – tris EDTA com cloreto de sódio

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

RS – Rio Grande do Sul

USDA - *United States Department of Agriculture*

Sumário

1. Introdução.....	10
2.Objetivos.....	15
3. Manuscrito.....	16
3.1 Artigo 1 - Infecções latentes por Herpesvirus bovino tipo 1 em búfalos (<i>Bubalus bubalis</i>) no Brasil.....	
4.Conclusão Geral.....	32
5.Referências.....	33

1 INTRODUÇÃO

A bovinocultura brasileira apresenta destaque tanto no mercado interno quanto no externo. Em vista disso, em 2012, o rebanho bovino brasileiro foi estimado em 211,2 milhões de cabeças (IBGE). Segundo dados do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (*United States Department of Agriculture* - USDA), o rebanho brasileiro ocupa a segunda posição no *ranking* mundial, ficando atrás somente do da Índia (LIVESTOCK, 2013). Neste país, embora a bovinocultura tenha significativa importância, a criação desses animais não se dá de forma comercial como ocorre no Brasil, que é considerado o maior exportador mundial de carne bovina.

De acordo com dados do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior (MDIC), até novembro de 2013, as exportações brasileiras de carne bovina atingiram o recorde de 1,36 milhão de toneladas, que renderam US\$ 6,013 bilhões de divisas para o país. No entanto, o país ainda possui perdas econômicas relacionadas a doenças que atingem os rebanhos e que podem prejudicar o ganho de peso, diminuir os índices reprodutivos ou até mesmo ocasionar a perda de animais e levar a restrições à exportação, visto que o principal obstáculo ao comércio internacional é justamente problemas sanitários relacionados a enfermidades de importância socioeconômica dentro das fronteiras dos países.

O herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) é o agente etiológico da Rinotraqueíte Infeciosa bovina (IBR) e é considerado um dos principais patógenos de bovinos responsável por grandes prejuízos econômicos na bovinocultura, tanto em rebanhos de corte quanto de leite. (KIRKBRIDE, 1985). O BoHV-1 está associado a uma variedade de síndromes clínicas como a rinotraqueíte, vulvovaginite pustular infecciosa (IPV), balanopostite pustular infecciosa (IBP), além de falhas reprodutivas, como retorno ao estro e abortamentos, manifestações que são responsáveis pelas perdas mais significativas na criação comercial de bovinos (DEJUCQ & JEGOU, 2001; THIRY., 2006).

O BoHV-1 e o herpesvirus bovino tipo 5 (BoHV-5) são estreitamente relacionados entre si em aspectos genéticos, moleculares, e antigênicos,

apresentando aproximadamente 85% de homologia em seus genomas (BRATANICH et al. 1991; CHOWDHURY, 1996; DELHON et al. 2003). No entanto, o BoHV-5 está associado a casos de meningoencefalites, com curso geralmente fatal em bovinos jovens, possuindo grande importância tanto no Brasil e como na Argentina, onde dezenas de surtos são relatados a cada ano (SALVADOR et al. 1998, RISSI et al. 2007).

Essas infecções podem ser transmitidas pelo contato direto e indireto entre animais, pois o vírus é excretado através de secreções respiratórias, oculares, genitais (muco prepucial e muco vaginal) e sêmen de animais infectados. A via de transmissão horizontal é considerada a mais importante, ocorrendo através do contato direto entre os animais e também pela monta natural. A transmissão indireta ocorre principalmente por aerossóis, fômites contaminados, fluidos fetais e fetos abortados. A inseminação artificial (IA) possui um importante papel na entrada da doença em rebanhos que nunca tiveram contato com o vírus (LEMAIRE; PASTORET; THIRY, 1994).

Ambos os vírus pertencem à família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*, gênero *Varicellovirus*, e caracterizam-se por apresentar como material genético uma fita dupla de DNA, envolto por um capsídeo icosaédrico, uma camada protéica denominada tegumento, e envelope glicoproteico (DAVISON et al., 2009). O envelope viral é composto por dez glicoproteínas, denominadas gB, gC, gD, gE, gI, gH, gL, gG, gK e gM, que se diferenciam em suas propriedades antigênicas, moleculares e função biológica nos processos de interação com a célula hospedeira e de replicação (SCHWYZER; ACKERMANN, 1996).

O BoHV-1 possui ampla distribuição mundial, diferindo nas taxas de incidência e prevalência de acordo com a região geográfica. Na maioria dos países europeus, por exemplo, a situação é endêmica, com exceção de alguns países, como Áustria, Dinamarca, Suécia e Noruega que erradicaram a infecção, através da identificação e eliminação de animais soropositivos dos rebanhos (ACKERMANN; ENGELS, 2006).

No Brasil, grande parte das propriedades apresenta animais sorologicamente positivos para o BoHV-1. Enquetes sorológicas realizadas por todo o país demonstram que a média de prevalência de infecções por BoHV-1 em rebanhos brasileiros situa-se ao redor de 30 %, com índices variando entre 50 % a 70 % de animais sorologicamente positivos (CERQUEIRA et al., 2000; VIEIRA et al., 2003;

QUINCOZES, 2005; DIAS, 2006). No Rio Grande do Sul foram descritas taxas de soropositividade de 81,7% (RAVAZZOLO et al., 1989) e 71,3 % (VIDOR et al., 1995).

A ampla disseminação desses agentes está relacionada diretamente com o mecanismo de latência dos herpesvírus, uma forma de infecção na qual o vírus persiste no organismo do animal de forma silenciosa, tornando-o reservatório desse agente na natureza. A latência ocorre em neurônios dos gânglios que inervam a região associada à primo-infecção, como os gânglios trigêmeo e o sacral (MEYER et al, 2001.; PEREZ et al., 2002). Uma vez infectado, o animal será portador e fonte de infecção por toda vida, assegurando a permanência do vírus nos rebanhos (JONES, 2003). Durante o período de latência não ocorre a expressão de genes virais requeridos para uma infecção produtiva, não ocorrendo assim a produção de vírus infeccioso (MEYER et al, 2001.; PEREZ et al., 2002). Circunstâncias como estresse ou tratamento com corticóides podem reativar o vírus latente, que pode ser re-excretado no sítio original da infecção primária.

A espécie bovina é hospedeira natural do herpesvirus bovino tipo 1, entretanto, infecções com BoHV-1 têm sido relatadas em outras espécies de ruminantes domésticos e selvagens (THIRY et al., 2006). Estudos sorológicos realizados em diversos países tem sugerido que búfalos (*Bubalus bubalis*) podem ser suscetíveis ao herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) (CAVIRANI et al., 1997; GALIERO et al., 2001), e outros alfa herpesvirus geneticamente relacionados (THIRY et al., 2006). Além disso, são naturalmente suscetíveis ao herpesvírus bubalino tipo 1 (BuHV-1), até o momento associado a uma infecção subclínica (THIRY & LEMAIRE, 2002). Recentemente, Scicluna et al., (2010) demonstraram que búfalos apresentam suscetibilidade à infecção por BoHV-1, podendo ser experimentalmente infectados através de inoculação por via intranasal, e que o vírus pode ser excretado por via nasal e por fezes, demonstrando o possível papel do búfalo como reservatório de BoHV-1.

A bubalinocultura vem se difundindo mundialmente devido à superioridade que pode apresentar em relação a outros ruminantes domésticos, principalmente a rusticidade e adaptação às variadas condições climáticas e de manejo. Características como docilidade, precocidade, e longevidade aliadas à grande capacidade de adaptabilidade, tornam o búfalo uma alternativa economicamente

rentável para a população, tornando a bubalinocultura uma opção pecuária extremamente relevante.

Apesar de recente no Brasil, o país já possui o maior rebanho de bubalinos da América do Sul, onde são criados para a produção de carne e de leite (PERERA, 2005), e são reconhecidas quatro raças principais: Mediterrâneo, Murrah, Jafarabadi (búfalo-do-rio) e Carabao (búfalo-do-pântano) (MARQUES; CARDOSO, 1997). Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2012), o efetivo de bubalinos atingiu a marca de 1,3 milhão de cabeças em 2011, concentrando-se principalmente na região Norte do país, das quais 38% se encontram no estado do Pará, 18,4%, no Amapá, e 6,5%, no Maranhão. A produção de búfalos no Brasil, a partir dos anos 90 apresentou crescente interesse na exploração leiteira, com formação de expressivas “bacias” de produção de leite de búfalas, particularmente no sudeste do país e junto aos maiores centros consumidores (BERNARDES, 2006). Assim, em diversos estados brasileiros, os bubalinos têm se tornado uma opção econômica interessante, principalmente pela exploração leiteira e pela consequente elaboração do queijo “*mozzarella*”, um produto de ótima aceitação pelo mercado, comercializado a altos preços, em virtude da baixa oferta (TONHATI, 2002).

Ocasionalmente os búfalos podem ser criados juntamente com os bovinos, ou muito próximos. Por serem amplamente disseminadas, possíveis infecções por BoHV-1 em rebanhos bubalinos podem também determinar grande prejuízo econômico a exploração pecuária desses animais, embora o papel desse vírus na biologia dessa espécie ainda seja desconhecido. Além disso, o evento de latência existente nas infecções por herpesvírus tem papel importante na manutenção desses vírus na natureza, pois uma vez infectado, o animal torna-se portador para o resto da vida, podendo atuar como um reservatório do vírus tanto para rebanhos bovinos quanto para bubalinos (PEREZ et al., 2002).

Até o momento as informações sobre o papel epidemiológico dos búfalos 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 esse vírus está disseminado em rebanhos bovinos de todo o país, a distribuição dessa enfermidade na espécie bubalina não tem sido estudada no Brasil. Por todos esses aspectos, é de grande interesse investigar a circulação do BoHV-1 na espécie bubalina, e assim, avaliar o possível

papel epidemiológico do búfalo na disseminação desse agente, principalmente em países onde a bubalinocultura tem se tornado cada vez mais atrativa, como é o caso do Brasil, onde a atividade é considerada economicamente relevante devido ao seu potencial de crescimento.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar um estudo sobre a ocorrência de herpesvírus bovino em rebanhos bubalinos provenientes da região sul do Brasil.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estimar a ocorrência de infecções latentes por BoHV-1 em gânglios trigêmeos de búfalos abatidos no município de Pelotas através da técnica Reação em Cadeia da Polimerase (*Semi-Nested PCR*)
- Identificar animais sorologicamente positivos contra o BoHV-1, BoHV-5 e BuHV-B6 através da técnica de soroneutralização;

3 ARTIGO

3.1 Artigo 1

Infecções latentes por Herpesvirus bovino tipo 1 em búfalos (*Bubalus bubalis*) no Brasil

Daiana. M. Medeiros¹, Marcelo de Lima¹, Fabrício.S. Campos², Geferson. Fischer¹

(Artigo científico a ser submetido à revista *Pesquisa Veterinária Brasileira*)

ABSTRACT: Medeiros D.M., Lima M., Fischer G., Campos F.S. 2014. **[Latent infection with bovine herpesvirus type 1 in buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Brazil.]** Infecções latentes por Herpesvirus bovino tipo 1 em búfalos (*Bubalus bubalis*) no Brasil. Laboratório de Virologia e Imunologia Animal, Faculdade de veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Campus Capão do Leão, Pelotas, RS 96019-900, Brazil. daianamaciemedeiros@yahoo.com.br

Infections caused by the bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1) have been widely detected in Brazilian cattle, and they are responsible for major economic losses to the cattle industry. Among the diseases caused by this virus there are infectious rhinotracheitis (IBR), Infectious Pustular vulvovaginitis (IPV) and balanoposthitis Infectious Pustular (IBP). The economic impact of this disease is mainly due to reproductive failures, such as return to estrus and abortions. The bovine is a natural host of BoHV-1, however, serologic studies in several countries have suggested that buffaloes (*Bubalus bubalis*) may be susceptible to bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1), and other genetically related alphaherpesvirus. Despite the cattle become infected naturally by BoHV-1, the distribution of this disease in the buffalo species has not been studied in Brazil, and the information is limited and only supported by serological surveys. Thus, the aim of this study was to detect the presence of viral DNA of BHV - 1 in trigeminal ganglia of 202 buffaloes collected in a slaughterhouse located in the city of Pelotas through a semi -nested PCR (SN - PCR) for detection of

partial gene glycoprotein D of BoHV - 1. In addition, 242 serum samples were obtained and tested by the serum neutralization (SN) technique for the detection of neutralizing antibodies against different samples of herpesvirus: BHV-1 (Los Angeles strain), BHV-5 (strain Riopel - RP) and BuHV (strain B6). The BHV-1 DNA was detected in 61 (30.1) % of the animals and the results of SN showed that 27.6 % of the animals had neutralizing antibodies against at least one of the tested viruses. This is the first study that uses molecular tests for the detection of latent BoHV-1 in buffalo species in Brazil.

INDEX TERMS: bovine herpesvirus . buffaloes . Latent infections . infectious diseases.

¹ Laboratório de Virologia e Imunologia Animal, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Campus Capão do Leão, Pelotas, RS 96019-900, Brasil. daianamaciemedeiros@yahoo.com.br mdelima.ufpel@gmail.com geferson.fischer@gmail.com;

² Laboratório de Virologia Animal, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS 90050-170, Brasil. camposvet@gmail.com

RESUMO

O herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) é responsável por causar doença respiratória e reprodutiva, e gera significativas perdas econômicas na bovinocultura, especialmente em função de falhas reprodutivas como retorno ao estro e abortamentos. Apesar da espécie bovina ser hospedeira natural do BoHV-1, estudos sorológicos têm sugerido que búfalos podem ser suscetíveis ao herpesvirus bovino tipo 1 (BoHV-1) e a outros alfa herpesvirus geneticamente relacionados. No entanto, a distribuição dessa enfermidade na espécie bubalina não tem sido estudada, e as informações sobre o papel epidemiológico dos búfalos em infecções por BoHV-1 são limitadas e apenas suportadas por inquéritos sorológicos. O objetivo desse trabalho foi detectar a presença de DNA viral de BoHV-1 em 202 gânglios trigêmeos de búfalos coletados em um abatedouro através de uma *Semi-Nested* PCR (SN-PCR) para detecção parcial do gene da glicoproteína D (gD) do envelope do BoHV-1.

Além disso, 242 amostras de soro foram analisadas pela técnica de soroneutralização (SN) para a detecção de anticorpos neutralizantes frente a diferentes amostras de herpesvírus: BoHV-1 (cepa Los Angeles), BoHV-5 (cepa Riopel - RP), e BuHV (cepa B6). O DNA de BoHV-1 foi detectado em 61 (30,1%) dos animais, e os resultados da SN mostraram que 27,6% dos animais apresentaram anticorpos neutralizantes contra, pelo menos, um dos vírus testados. Os resultados demonstram 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.

INTRODUÇÃO

O herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) é responsável por causar uma variedade de quadros clínicos como: rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR); vulvovaginite pustular infecciosa (IPV) e balanopostite pustular infecciosa (IBP); e falhas reprodutivas, como retorno ao estro e abortamentos (Silva, T. et al., 2000). As manifestações reprodutivas levam a significativos prejuízos econômicos, tanto em rebanhos de corte quanto de leite (Dejucq & Jegou, 2001; Thiry et al., 2006). A infecção por BoHV-1 possui ampla distribuição mundial e suas taxas de incidência e prevalência variam de acordo com a região geográfica.

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 no hospedeiro natural (Roizmann et al., 2001), podendo ser reativado por uma ampla variedade de estímulos. A latência ocorre em neurônios dos gânglios que inervam a região associada à primo-infecção, como os gânglios trigêmeo e o sacral (Meyer et al, 2001.; Perez et al., 2002). A reativação leva à excreção de partículas infecciosas, com ou sem sinais clínicos; sendo, portanto, responsável pela perpetuação e transmissão do vírus na população bovina (Pastoret & Thiry, 1985).

Infecções por herpesvírus podem ser transmitidas pelo contato direto e indireto entre animais, pois o vírus é disseminado através de secreções

respiratórias, oculares e genitais, sendo excretado em grandes quantidades por animais durante a infecção aguda (Lemaire; Pastoret; Thiry, 1994).

A espécie bovina é hospedeira natural do herpesvírus bovino tipo 1, entretanto, infecções com BoHV-1 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*) podem ser suscetíveis ao herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) (Cavirani et al., 1997; Galiero et al., 2001), e a outros alfa herpesvírus geneticamente relacionados (Thiry et al., 2006). Além disso, búfalos são naturalmente suscetíveis ao herpesvírus bubalino tipo 1 (BuHV-1), até o momento associado a uma infecção subclínica (Thiry & Lemaire, 2002).

Recentemente, Scicluna et al., (2010) demonstraram que bubalinos apresentam suscetibilidade à infecção por BoHV-1, podendo ser experimentalmente infectados através de inoculação por via intranasal, e que o vírus pode ser excretado por via nasal e por fezes, demonstrando o possível papel da espécie como reservatório de BoHV-1.

Ocasionalmente bubalinos podem ser criados juntamente com os bovinos, ou muito próximos. Por serem amplamente disseminadas, possíveis infecções por BoHV-1 em rebanhos bubalino podem também determinar grande prejuízo econômico a exploração pecuária desses animais, embora o papel desse vírus na biologia dessa espécie ainda seja desconhecido

As informações sobre o papel epidemiológico dos búfalos 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 na espécie bubalina não tem sido estudada. Dessa forma, é de grande interesse investigar a circulação do BoHV-1 na espécie bubalina, e assim, avaliar o possível papel epidemiológico do búfalo na disseminação desse agente.

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 herpesvírus bubalino (BuHV-B6) em amostras de soro.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletados 202 gânglios trigêmeo de búfalos provenientes de diferentes rebanhos do estado do Rio Grande do Sul, 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 Animal da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), os gânglios trigêmeos foram congelados a uma temperatura de -70°C para posterior utilização.

O processo de extração de DNA se iniciou com a lise de um fragmento de aproximadamente 50 mg de cada gânglio, em uma solução contendo 800 µL de TE⁵N 2X pH 7,4 (20mM de Tris-Cl (Invitrogen®), pH 7,4; 2mM de EDTA (Invitrogen®), pH 8,0; 200mM de NaCl), 80 µL de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) (Invitrogen®) 10% e 6 µL de proteinase K 20mg/mL (Ludwig®). Após 2 horas de incubação a 56° C, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 18.000 x g, e 400 µL do sobrenadante foram coletados para novos microtubos, e adicionados 40 µL de NaCl 5M (Invitrogen®) e 300 µL de fenol (Sigma®). A uma temperatura de 37 °C as amostras foram agitadas durante 30 minutos, e logo após centrifugadas por 10 minutos a 18.000 x g. Aproximadamente 400 µL do sobrenadante contendo a fase aquosa foram coletados, e, então, adicionados 800 µL de álcool absoluto em cada amostra para a precipitação do DNA.

As amostras contendo álcool absoluto foram mantidas a uma temperatura de -20°C por 30 minutos, com posterior centrifugação por 10 minutos a 18.000 x g para a formação do *pellet*. Posteriormente, o álcool foi desprezado para a adição de 100 µL de TEN 1X, e 10 µL da enzima RNase (Ludwig®). Em seguida, as amostras foram levadas para o banho-maria a 37°C por 30 minutos, e após armazenada a uma temperatura de -20°C.

Para monitorar o processo de extração da DNA, todas as amostras extraídas foram testadas por PCR para amplificação de um fragmento de 358 pb da região *D-loop* do DNA mitocondrial bubalino, e analisadas por eletroforese em gel de agarose 1,5% (Ludwig®).

As amostras de DNA extraídas foram analisadas para a presença de DNA de BoHV-1 através de uma *Semi-Nested* PCR (SN-PCR) para 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' nt.351-368), e P4 *anti-sense* (5'GTCGACTATGGCCTTGTGTGC3') para a amplificação de 468 pb, e na segunda, P4 *anti-sense* (5'GTCGACTATGGCCTTGTGTGC3') e P5 *sense* (5'ACGGTCATATGGTACAAGGACAGCG3' nt.394-422) para a amplificação de um produto final de 425 pb, descritos 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 as reações da segunda reação da SN-PCR, nas mesmas condições de tempo e temperatura.

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 um gel de agarose a 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 usando BioEdit Sequence Alignment Editor (North Carolina State University, Raleigh, NC) e alinhado com Clustal W (Thompson et al., 1994).

As amostras de sangue obtidas foram coletadas em tubos de ensaio de 10 mL estéreis, no momento da sangria, e posteriormente à formação do coágulo, foi realizada a centrifugação para a obtenção do soro. Depois de inativadas a uma temperatura de 56° por 30 minutos, as amostras foram armazenadas a -20°C até a realização dos testes sorológicos.

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) em placas de 96 orifícios, e cada vírus padrão colocado na concentração de 100 DICC₅₀ (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, seguida de incubação a 37 °C, em atmosfera a 5% de CO₂.

A leitura final dos testes foi realizada após 72 horas em microscopia óptica, pela observação da presença ou ausência de efeito citopático (ECP) característico. Para evitar resultados falsos, cada partida de testes foi realizada com controles de células e controle de vírus. O título de anticorpos neutralizantes foi expresso como a recíproca da maior diluição capaz de inibir ECP.

RESULTADOS

Para comprovação da eficiência da extração de DNA, foi realizada uma reação de PCR para amplificação de um fragmento da região *D-loop* do DNA mitocondrial bubalino. Na maioria das amostras extraídas pode-se observar banda de DNA pela eletroforese em gel de agarose 1,5% (Figura 1). Nas amostras negativas neste controle, procedeu-se nova etapa de extração.

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 (Figura 2).

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.

Os resultados dos testes de soroneutralização (SN) mostraram que das 242 amostras de soro analisadas, 67 amostras 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. Ainda, 48 amostras (19,8%) neutralizaram os 3 vírus.

DISCUSSÃO

Em bovinos, o BoHV-1 é responsável pela redução nos índices produtivos, tanto em gado de leite quanto corte, relacionada a problemas reprodutivos como aborto e retorno ao cio. Apesar da espécie bovina ser considerada alvo deste vírus, várias outras espécies são suscetíveis à infecção, como o búfalo (Scicluna et al.,

2010). No entanto, as informações a respeito da epidemiologia e da patogenia do BoHV-1 em búfalos domésticos é escassa. Segundo Perumal et al. (2013), com base no atual conhecimento a respeito da epidemiologia do BuHV-1, não se pode relacionar o vírus com casos de aborto em búfalos. No entanto, ainda que a patogenia do BuHV-1 e do BoHV-1 em búfalos não esteja estabelecida, avaliações sorológicas sugerem que estas infecções sejam transmitidas entre búfalos. Além disso, como a exploração da espécie bubalina no Brasil vem adquirindo expressividade (Brasil, 2011), torna-se evidente o interesse no conhecimento destas características.

Neste estudo avaliou-se, por técnicas diagnósticas direta e indireta, a presença do BoHV-1, BoHV-5 e BuHV em búfalos provenientes da região sul do Rio Grande do Sul. Por questões logísticas do frigorífico onde foram colhidas as amostras, não foi possível correlacionar os gânglios coletados como o soro. A detecção de DNA viral de BoHV-1 em gânglio trigêmeo de búfalos foi realizada utilizando uma *Semi-Nested* PCR para amplificação de um segmento do gene que codifica para a glicoproteína D (gD) do envelope de BoHV-1. O DNA de BoHV-1 foi detectado em 61 (30,1%) dos animais (Figura 2). Ao nosso conhecimento, este foi o primeiro estudo que utilizou testes moleculares para a detecção de infecções latentes por BoHV-1 na espécie bubalina no Brasil. Para monitorar o processo de extração de DNA, todas as amostras foram testadas por PCR utilizando *primers* desenhados para amplificar um fragmento de 358 pb da região *D-loop* do DNA mitocondrial bubalino. Neste processo, as amostras que não apresentaram amplificação de DNA mitocondrial (Figura 1), foram excluídas do estudo.

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, uma vez 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 na espécie bubalina, a investigação do impacto sanitário dessa infecção torna-se extremamente relevante, especialmente devido a parâmetros reprodutivos que podem ser afetados. Como bubalinos podem ser infectados com herpesvírus de origem bovina, esses animais também podem ser considerados fonte de infecção em potencial desses vírus para bovinos.

Metodologia semelhante à deste estudo utilizada por Petrini et al. (2012) que, visando identificar a causa de sinais clínicos respiratórios em búfalos criados na região central da Itália, identificaram animais positivos pela técnica de PCR, com amplificação de uma sequência genômica da gE de BuHV-1. Os autores concluem que, pela primeira vez, foi possível identificar o BuHV-1 em rebanho de búfalos com sintomatologia respiratória. No entanto, destacam a necessidade de correlacionar-se a sintomatologia com o agente, em estudos futuros.

Em um detalhado estudo realizado por Wang et al. (2005), utilizando micro-dissecação com laser de captura em gânglios trigêmeos de humanos, foram encontradas, em média, 6,9 cópias de genomas de Herpesvírus humano tipo 3 (HHV-3 ou vírus da Varicela-zoster - VZV). No mesmo estudo, apenas 20% dos neurônios tinham mais do que 100 cópias do genoma de VZV. Isto demonstra que o genoma de varicelovírus não está distribuído de maneira homogênea em todos os neurônios de um gânglio. Em vista da baixa quantidade de número de cópias que podem ser encontradas nos gânglios trigêmeos, dependendo da porção estudada, é possível que resultados negativos no presente trabalho possam ser devido a quantidades insuficientes de DNA viral no gânglio trigêmeo.

Vários trabalhos previamente publicados tiveram como objetivo a aplicação de PCR para identificar e diferenciar BoHV-1 e BoHV-5 em tecidos ou em amostras clínicas (Alegre et al., 2001; Claus et al., 2005). Silva M. et al. (2007), identificaram 40 amostras de herpesvírus isoladas de diferentes casos clínicos na região Centro-Sul do Brasil, Argentina e Uruguai entre 1987 e 2006. 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. Devido à conhecida presença de BoHV-1 e BoHV-5 em bovinos no Brasil, e à ausência de testes sorológicos que diferenciem a resposta imune gerada por um e outro vírus, este tipo de trabalho se torna importante, pois ajuda a esclarecer a epidemiologia destas infecções virais, principalmente em espécies que podem representar uma fonte de infecção de herpesvírus para outros bovinos, como é o caso dos bubalinos.

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. Além da análise molecular, este estudo também avaliou a presença de anticorpos contra o BoHV-1, BoHV-5 e BuHV através da técnica de soroneutralização (SN) (House & Baker, 1971). A pesquisa sorológica demonstrou a

presença de infecções por herpesvírus bovino ou bubalino na população em estudo. Das 242 amostras de soro analisadas, 67 amostras apresentaram anticorpos neutralizantes contra, pelo menos, um dos vírus testados. Os índices de soropositivos foram de 23,14%, 22,31% e 20,66% para BoHV-1, BoHV-5 e BuHV, respectivamente. 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% (Rocha et al., 2001). 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 rebanho bovinos como para outros bubalinos.

Apesar de ser considerada um teste padrão pela OIE (Organização Mundial de Saúde Animal), a SN não permite uma diferenciação precisa entre animais infectados com BoHV-1 ou BoHV-5 e cerca de 92% dos animais infectados com estes vírus apresentam reações cruzadas à SN (Teixeira et al., 1998). Os dois vírus de origem bovina (BoHV-1 e BoHV-5) são muito semelhantes entre si em aspectos estruturais, biológicos, antigênicos e moleculares, o que não permite a distinção sorológica nestes testes (Studdert, 1989; Bratanich et al., 1991; Thiry et al., 2007). Assim, em populações de animais onde os dois vírus circulam, os testes sorológicos não permitem distinguir a resposta sorológica contra cada um deles e, como consequência, não é possível estimar a prevalência real de cada agente (Del Médico Zajac et al. 2006). Em relação ao BuHV-1, os estudos antigênicos e sorológicos ainda são escassos, e os níveis de reatividade sorológica cruzada induzidos por este em relação a BoHV-1 e BoHV-5 são desconhecidos. A SN pode ainda não detectar anticorpos em alguns animais que apresentem a infecção viral em estado de latência prolongada ou naqueles recentemente infectados. Nestas duas situações os animais podem apresentar títulos basais de anticorpos neutralizantes que não são detectáveis por meio deste procedimento sorológico, originando com isto resultados falso-negativos (Wyler et al., 1989). Portanto, é possível que o número de animais soropositivos seja maior do que o encontrado, visto que nem todos os animais latentemente infectados possuam anticorpos em níveis detectáveis pelos testes utilizados.

A confirmação da presença de anticorpos neutralizantes contra herpesvírus em rebanhos bubalino no presente estudo é um fator epidemiológico importante,

pois os dados comprovam a circulação de herpesvírus bovino, ou bubalino, na espécie em estudo. Como o rebanho bubalino em estudo não foi vacinado contra esses vírus, a presença de anticorpos neutralizantes nessa espécie indica exposição natural à infecção. Contudo, é necessário reforçar o fato de que não se pode associar essas infecções a um determinado tipo viral (BoHV-1, BoHV-5 ou BuHV), devido às extensas reações cruzadas estabelecidas pelos herpesvírus.

No caso de BoHV-1, muitos países europeus têm desenvolvido programas oficiais de erradicação em rebanhos bovinos, e muitos já conseguiram a erradicação através da detecção de animais soropositivos e remoção de animais do rebanho. Porém, esses programas consideram apenas a espécie bovina como crucial na manutenção e transmissão deste agente. A participação da espécie bubalina na produção de alimento aumenta consideravelmente no mundo, principalmente nos países em desenvolvimento, localizados em sua maioria das áreas tropicais. Como pode-se comprovar que herpesvírus de origem bovina ou bubalina circulam em rebanhos bubalinos, esta espécie precisa ser considerada na transmissão destes vírus a outros rebanhos.

Referências

- Ackermann M. & Engels M. 2006. Pro and contra IBR-eradication. *Vet. Microbiol.* 113(3/4): 293-302.
- Alegre, M.; Nanni, M.; Fondevila, N. 2001. 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.
- Bélak, S.; Ballagi-Pordány, A. 1993. Application of the polymerase chain reaction (PCR) in veterinary diagnostic virology. *Veterinary Research Communications*, Dordrecht, v.17, p.55-72.
- Bratanich A.C., Sardi S.I., Smitsaart E.N. & Schudel A.A. 1991. Comparative studies of BHV-1 variants by in vivo-in vitro tests. *J. Vet. Med.* 38(1):41-48.

Cavirani, S.; Consalvo, F.; D'onofrio, G.; Cappucci, L.; Cabassi, C. S.; Allegri, G.; Bigliardi, E.; Civardi, A. & Flammini, C. F. 1997. 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.

Claus, M. P.; Alfieri, A. F.; Folgueras-Flatschart, A. V.; Wosiacki, S. R.; Medici, 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. Methods, Netherlands, v.128, n.1-2, p.183-188.

Davison, A.J., Eberle, R., Ehlers, B., Hayward, G.S., McGeoch, D.J., Minson, A.C., Pellett, P.E., Roizman, B.,

Dejucq N, Jegou B. 2001. Viruses in the mammalian male genital tract and their effects on the reproductive system. Microbiol Mol Biol Ver, 65: 208–231

Del Médico Zajac M.P., Puntel M., Zamorano P.I., Sadir A.M. & Romera S.A. 2006. BHV-1 vaccine induces cross-protection against BHV-5 disease in cattle. Res. Vet. Sci. 81(3):327-334.

Dereget D., Cho H.J & Kozub G.C. 1993. A comparative evaluation os two sensitive sérum neutralization tests for bovine herpesvirus-1 antibodies. Can. J. Vet. Res. 57: 56-59.

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

House J. A & Baker J. A. 1971. Bovine herpesvirus IBR-IPV, The antibody viru neutralization reaction. Cornell Vet. 61:320-335

Hoy, M. A. 1994. DNA amplification by the Polymerase Chain Reaction: molecular biology made accessible. In: Insect molecular genetics: an introduction principles and applications. San Diego: Academic Press, p.203-244.

Kramps J.A., Quak S., Weerdmeester K. & Van Oirschot J.T. 1993. Comparative study on sixteen enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of antibodies to bovine herpesvirus 1 in cattle. *Vet. Microbiol.* 35(1/2):11-21.

Lemaire, M.; Pastoret, P. P.; Tlilry, E. 1994. Le contrôle de l'infection par le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine. *Annales de Médecine Vétérinaire*, v. 138, n. 3, p. 167-180.

Mc pherson, Q. P.; Taylor, G. R.; Quirke, P. *PCR a practical approach*. Oxford: Information Press, Ltd., 1994. 247 p.

Médici K.C., Alfieri A.F. & Alfieri A.A. 2000. Ensaio imunoenzimático comercial no diagnóstico sorológico das infecções por herpesvírus bovino 1. *Ciência Rural* 30(2):343-346.

Meyer, G.; Lemaire, M.; Ros, C.; Belak, K.; Gabriel, A.; Cassart, D.; Coignoul, F.; Belak, S.; Thiry, E. 2001. Comparative pathogenesis of acute and latent infections of calves with bovine herpesvirus types 1 and 5. *Archives of Virology* 146, p.633–635.

Perez, S.E.; Bretschneider, G.; Leunda, M.R.; Osorio, E.A.; Flores, E.F.; Odeon, A.C. 2002. Primary infection, latency, and reactivation of bovine herpesvirus type 5 in the bovine nervous system. *Veterinary Pathology* 39, p.437–444.

Perrin B., Bitsch V., Cordioli P., Edwards S., Eloit M., Guérin B., Lenihan P., Perrin M., Rønsholt L. & Van Oirschot J.T. 1993. A European comparative study of serological methods for the diagnosis of infectious bovine rhinotracheitis. *Rev. Sci. Tech.* 12(3):969-984.

Rocha, M.A.; Gouveia, A.M.G.; Lobato, Z.I.P.; Leite, R.C. 2001. 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.

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

Sambrook, J., Russell, D.W., 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York

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 Ver. Res.* 5(2):116.

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

Scicluna, M.T.; Caprioli, A.; Saralli, G.; Manna, G.; Barone, A.; Cersini, A.; Cardeti, G.; Condoleo, R.U.; Autorino, G.L. 2010. Should the domestic buffalo (*Bubalus bubalis*) be considered in the epidemiology of bovine herpesvirus 1 infection? *Veterinary Microbiology*, v.43, n.1, p.81-88.

Studdert, M.J., Thiry, E., 2009. The order Herpesvirales. *Arch. Virol.* 154, 171–177.

Studdert, M.J. 1989. Bovine encephalitis herpesvirus. *Veterinary Record*, v. 125, p. 584.

Saiki, R. K.; Scharf, S.; Faloona, F. A. et al. 1990. Enzymatic amplification of β globin sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anaemia. *Science*, v. 230, n. 4732, p. 1350-1354.

Teixeira, M.B. et al. 1998. Diferenças em níveis de anticorpos neutralizantes contra herpesvírus bovinos tipos 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5). *Pesquisa Agropecuária Gaúcha*, v. 4, n. 1, p. 61-65.

Thiry J., Keuser V., Muylkens B., Meurens F., Gogev S., Vanderplasschen A. & THIRY E. 2006. Ruminant alphaherpesvirus related to bovine herpesvirus 1. *Veterinary Research*. 37:169-190.

Thiry, E. & Lemaire, M. 2002. Infezioni sostenute da herpesvirus eterologhinei ruminanti. *Summa* 6, p. 29-34.

Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. 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.

Wiedmann, M.; Brandon, R.; Wagner, P.; Dubovi, E. J.; Batt, C. A. 1993. Detection of bovine herpesvirus-1 in bovine semen by a nested PCR assay. *Journal of Virological Methods*, Amsterdam, v.44, p.129- 140, 1993.

Wellenberg G.J. Mars M.H. & Van Oirschot J.T. 2001. Antibodies against bovine herpesvirus (BHV) 5 may be differentiated from antibodies against BHV1 in a BHV1 glycoprotein E blocking ELISA. *Vet. Microbiol.* 78(1):79-84.

Wang, K.; Lau, T.Y.; Morales, M; Mont, E.K.; Straus, S.E. 2005. Laser-capture microdissection: refining estimates of the quantity and distribution of latente Herpes simplex vírus 1 and Varicella-zoster vírus DNA in human trigeminal ganglia at the single-cell level. *J. Virol.*; United States, v.79, p14079-14087.

Wyler, R.; Engels, M.; Schwyzr, M. 1989. Infectious bovine rhinotracheitis/vulvovaginitis (BHV-1). In: WITTMANN, G. *Herpesvirus diseases of cattle, horses and pigs*. Boston: Kluwer Academic Publishers, p.1-72.

Legendas das figuras

Fig. 1. Gel de agarose a 1,5% evidenciando a amplificação de um fragmento de 358 pb do DNA mitocondrial bubalino (canaletas 2 a 7). Caneleta 1: Marcador de tamanho molecular 100 pb.

Fig. 2. Gel de agarose a 1,5% evidenciando a amplificação do produto final da *Semi-nested*-PCR de 425 pb (canaletas 2,4, 5 e 7). Caneleta 1: Marcador de tamanho molecular 100 pb.

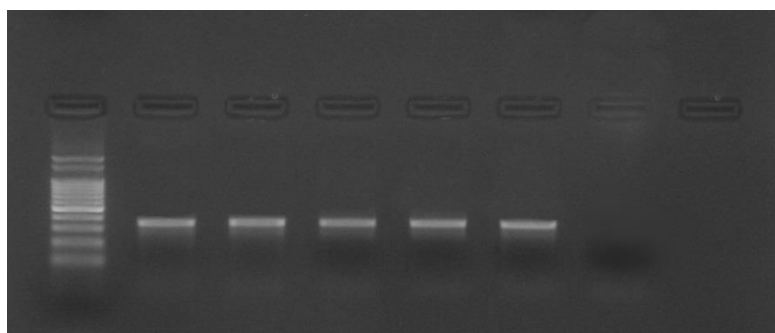


Fig. 1

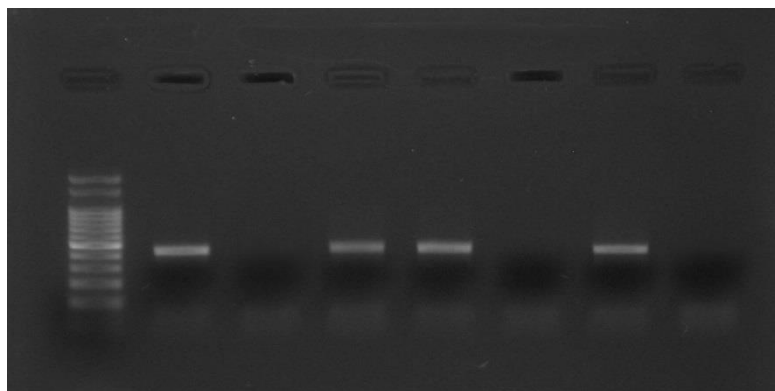


Fig.2

4 CONCLUSÃO GERAL

- O DNA de BoHV-1 foi detectado pela *Semi-Nested* PCR em 30,1% dos animais.
- Bubalinos são hospedeiros para o herpesvírus bovino tipo 1, e podem ser uma espécie disseminadora desse agente para bovinos, e também para outros bubalinos.
- Os dados obtidos neste estudo indicam a presença de anticorpos neutralizantes contra BoHV-1, BoHV-5 e BuHV-B6 em rebanhos bubalinos provenientes da região sul do Brasil
- Os resultados pela técnica da soroneutralização revelam uma extensa reatividade sorológica cruzada entre BoHV-1, e BoHV-5, e BuHV-B6
- Devido a reações cruzadas entre os herpesvírus, não se pode associar a ocorrência da infecção a um determinado tipo viral.
- A presença de anticorpos neutralizantes para herpesvírus nessa espécie indica exposição natural à infecção, já que os animais não eram vacinados para IBR

5 REFERÊNCIAS

- ACKERMANN M. & ENGELS M. Pro and contra IBR-eradication. **Veterinary Microbiology**. 113(3/4):293-302, 2006
- Bratanich A.C., Sardi S.I., Smitsaart E.N. & Schudel A. A Comparative studies of BHV-1 variants by in vivo-in vitro tests. **J. Veterinary Medicine**. 38(1):41-48, 1991
- 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.
- CERQUEIRA, R.B.; CARMINATI, R.; SILVA, J.M.; CAMPOS, S.G.; MEYER, R.; SARDI, S. Serological survey for bovine herpesvirus 1 in cattle from different regions in the state of Bahia, Brazil. **Braz. J. Veterinary Research and Animal Science**, Brazil, v.37, n.6, 2000
- CHOWDHURY, S.I. Construction and characterization of an attenuated bovine Herpesvirus type 1 (BHV-1) recombinant virus, **Veterinary Microbiology**, v. 52, n.1-2, p.13-23, 1996.
- 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
- DEJUCQ N, JEGOU B. Viruses in the mammalian male genital tract and their effects on the reproductive system. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**;65: 208–231, 2001
- DELHON G., MORAES M.P., LU Z., FLORES E.F., WEIBLEN R. & ROCK D. Genome of bovine herpesvirus type 5. **Journal of Virology**. 77:10339- 10347, 2003
- DIAS, M.M. **Análise da soroprevalência do Herpesvírus bovino tipo 1 e do cortisol sérico em diferentes situações de manejo no Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: 2006. 84 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias – Virologia) - Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.
- 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.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa da Pecuária Municipal**, 2012

JONES, C. Herpes simplex virus type 1 and bovine herpesvirus1 latency. **Clinical Microbiology Review**, v. 16, n. 1, p.79-95, 2003.

LEMAIRE, M.; PASTORET, P. P.; TILIERY, E. Le contrôle de l'infection par le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine. **Annales de Médecine Vétérinaire**, v. 138, n. 3, p. 167-180, 1994.

LIVESTOCK. In: ESTADOS UNIDOS. **Department of Agriculture**. PSD: production, supply and distribution online. Reports. Washington, D.C.: United States Department of Agriculture - USDA, 2013. Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov/psdonline>>. Acesso em: jan. 2014

KIRKBRIDE, C. A. Manangin and outbreak of liverstock abortion 2: diagnosis and control of bovine abortion. **Veterinary Medicine**, Lenexa, v.80, n.5, p.70-79, 1985.

MARQUES, J. R. F.; CARDOSO, L. S. **A bubalinocultura no Brasil e no Mundo**. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE BUBALINOCULTURA. *Anais*. Cruz das Almas: Escola de Agronomia da Universidade Federal da Bahia, p.10-221, 1997.

MEYER, G.; LEMAIER, M.; ROS, C.; BELAK, K.; GABRIEL, A.; CASSART, D.; COIGNOUL, F.; BELAK, S.; THIRY, E. Comparative pathogenesis of acute and latent infections of calves with bovine herpesvirus types 1 and 5. **Archives of Virology** 146, p.633–635, 2001.

PEREZ, S.E.; BRETSCHEIDER, G.; LEUNDA, M.R.; OSORIO, E.A.; FLORES, E.F.; ODEON, A.C. Primary infection, latency, and reactivation of bovine herpesvirus type 5 in the bovine nervous system. **Veterinary Pathology** 39, p.437–444, 2002.

RISSI D.R., RECH R.R., FLORES E.F., KOMMERS G.D. & BARROS C.S.L. Meningoencefalite por herpesvírus bovino-5. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 27(7):261-268, 2007

SALVADOR S.C., LEMOS R.A.A., RIET-CORREA F., ROEHE P.M. & OSORIO A.L.A.R. Meningoencefalite causada por herpesvírus bovino-5 no Mato Grosso do Sul e São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 18(2):76- 83, 1998

SCICLUNA, M.T.; CAPRIOLI, A.; SARALLI, G.; MANNA, G.; BARONE, A.; CERSINI, A.; CARDETI, G.; CONDOLEO, R.U.; AUTORINO, G.L. Should the domestic buffalo (*Bubalus bubalis*) be considered in the epidemiology of bovine herpesvirus 1 infection? **Veterinary Microbiology**, v.43, n.1, p.81-88, 2010.

RAVAZZOLO, A.P.; DAL PIZZOL, M.; MOOJEN, V. Evidência da presença de anticorpos para o vírus da rinotraqueíte infecciosa dos bovinos em alguns municípios do Estado do Rio Grande do Sul. **Arquivos da Faculdade de Veterinária**, UFRGS, Porto Alegre, v.17, n.1, p.98-95, 1989.

TONHATI, H. **Critérios de seleção para produção total de leite em bubalinos criados no estado de São Paulo, Brasil**. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista. 68p. Tese (Livre Docência), 2002.

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

VIEIRA, S.; BRITO, W.M.E.D.; SOUZA, W.J.; ALFAIA, B.T.; LINHARES, D.C.L. Anticorpos para o Herpesvírus bovino 1 (BHV-1) em bovinos do estado de Goiás. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Goiás, v.4, n.2, p.131-137, 2003.

QUINCOZES, C.G. **Prevalência e fatores de risco associados às infecções pelos herpesvírus bovino tipo 1 e 5 (BHV-1 e 5) e pelo vírus da diarréia viral bovina (BVDV) nos rebanhos dos municípios de Santa Vitória do Palmar e Chuí**. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 2005. 117 f. Dissertação (Mestrado em Veterinária – Virologia) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, UFPEL, Pelotas, 2005.

VIDOR, T.; HALFEN, D.C.; LEITE, T.E.; COSWIG, L.T. Herpesvirus bovino tipo 1 (BHV 1): sorologia de rebanhos com problemas reprodutivos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.25, n.2, p.421-424, 1995.