

AVALIAÇÃO DA REAÇÃO POLIMERASE EM CADEIA (PCR) DIRIGIDA PARA O GENE gD DE AMOSTRAS DO VÍRUS DA DOENÇA DE AUJESZKY ISOLADAS NAS REGIÕES SUL E SUDESTE DO BRASIL

**R.M. Piatti¹, A.A. Ikuno¹, E.M.S. Cunha¹, R.M.F. Dambrós²,
R.M. Soares³, L.J. Richtzenhain³**

¹Centro de Sanidade Animal, Instituto Biológico, Av. Conselheiro Rodrigues Alves, 1252, CEP 04014-002, São Paulo, SP, Brasil. E- mail: piatti@biológico.br

RESUMO

Uma reação pela polimerase em cadeia (PCR), baseada no gene que codifica a glicoproteína gD do vírus da doença de Aujeszky (VDA), foi avaliada para o diagnóstico direto do VDA. A aplicação da reação em um painel de 30 amostras do VDA isoladas no período de 1982 a 1996 nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, revelou que um fragmento de DNA de 217 pares de bases foi amplificado a partir do genoma de todas as amostras virais. A especificidade do produto amplificado foi verificada pela análise do seu perfil de restrição com a endonuclease *Sal* I.

PALAVRAS-CHAVE: Vírus da doença de Aujeszky, diagnóstico direto, reação em cadeia pela polimerase (PCR), glicoproteína gD.

ABSTRACT

EVALUATION OF THE POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) DIRECTED TO THE GENE gD OF SAMPLES OF AUJESZKY'S DISEASE VIRUS ISOLATED IN REGIONS OF BRAZIL SOUTH AND SOUTHEAST. A polymerase chain reaction (PCR) assay, based on the gene that encodes gD glycoprotein of Aujeszky's disease virus (ADV), was evaluated for the direct diagnosis of ADV. When applied to a panel of 30 ADV strains isolated in the South and Southeast of Brazil from 1982 to 1996, the reaction was able to amplify a 217 bp DNA fragment from all ADV strains studied. The specificity of PCR product was confirmed by its restriction endonuclease pattern with *Sal* I.

KEY WORD: Aujeszky, virus, direct diagnosis, polymerase chain reaction (PCR), gD glycoprotein.

INTRODUÇÃO

O vírus da doença de Aujeszky (VDA), ou Herpesvirus suíno-1, pertence à família Herpesviridae, Subfamília Alphaherpesvirinae e ao gênero *Varicellovirus* (Murphy *et al.*, 1995). O VDA infecta

inúmeras espécies de mamíferos, determinando elevada letalidade (Wittmann & Rziha, 1989).

Na espécie suína, considerada hospedeiro natural e principal reservatório do vírus, a letalidade da doença de Aujeszky (DA) é dependente da faixa etária dos animais acometidos. A DA em

²Cedisa - Concórdia, SC

³Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

animais jovens caracteriza-se por sintomatologia nervosa e elevada letalidade, ao passo que em animais adultos está associada a problemas respiratórios e reprodutivos (Akkermans, 1976; Wittmann & Rziha, 1989).

À semelhança de outros herpesvirus, após uma infecção primária o genoma do VDA persiste de forma latente no tecido nervoso do hospedeiro, independentemente do grau de imunidade do animal. Após uma imunossupressão, o vírus pode ser reativado e infectar animais suscetíveis (Klein, 1982; Rziha *et al.*, 1986; Roizmann & Sears, 1991).

A DA encontra-se presente em praticamente todos os países com suinocultura industrial e é considerada uma das principais patologias infecciosas do suíno devido aos elevados prejuízos econômicos que acarreta (Eloit *et al.*, 1988; Wittmann & Rziha, 1989).

O diagnóstico laboratorial direto da infecção pelo VDA tem sido feito pelo seu isolamento em cultivo de células sensíveis (McFerran *et al.*, 1972), ou pela detecção dos antígenos virais em tecidos pelo teste de imunofluorescência (Sabó & Rajcani, 1970). A introdução de técnicas de hibridização permitiu a detecção do genoma do VDA em células hospedeiras infectadas de forma ativa ou latente (Lokensgard *et al.*, 1990).

Mais recentemente, a reação de PCR (Saiki *et al.*, 1985; Saiki *et al.*, 1988) tem sido aplicada como um método direto sensível, rápido e alternativo na detecção de infecções virais, pois permite detectar pequenas concentrações de DNA viral (Gingeras *et al.*, 1990). Vários protocolos de PCR têm sido descritos para detectar seqüências específicas de DNA do VDA (Belak *et al.* 1989, Jestin *et al.*, 1990; Maes *et al.*, 1990, Hasebe *et al.*, 1993).

Objetivando detectar infecções latentes do VDA em suínos experimentalmente infectados, Galeota-Wheeler & Osorio (1991) desenvolveram uma reação de PCR baseada em uma seqüência conservada do gene que codifica a glicoproteína essencial gD do VDA. A especificidade do fragmento amplificado de DNA, de 217 pares de bases, foi comprovada pela pesquisa de um sítio de restrição de *Sal I*.

Harding *et al.* (1997) avaliaram a reação de PCR desenvolvida por Galeota-Wheeler & Osorio (1991) no diagnóstico direto do VDA. Utilizando um painel de 9 amostras do VDA e 13 amostras de herpesvírus relacionados, estes autores verificaram que a reação

de PCR detectou todas as amostras de VDA estudadas, não detectando os outros herpesvirus relacionados. Embora tenha sido confirmada no fragmento amplificado a presença do sítio de restrição para a endonuclease *Sal I*, estes autores puderam constatar variabilidade nos sítios de restrição de *AvaII* e *Sau96I*.

Considerando a existência de variabilidade no fragmento de DNA amplificado pela reação de PCR desenvolvida por Galeota-Wheeler & Osorio (1991), o objetivo do presente trabalho foi avaliar esta reação no diagnóstico direto de 30 amostras do VDA isoladas nas regiões Sul e Sudeste do Brasil no período de 1982 a 1996.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras do VDA

Foram utilizadas 30 amostras do VDA de São Paulo, Paraná e Santa Catarina. Todas as amostras foram isoladas a partir de tecido cerebral, sendo que 27 foram de origem suína, 1 de origem bovina, 1 de origem canina e 1 de origem felina. As diferentes amostras foram isoladas no período de 1982 a 1996. A amostra Bartha do VDA gentilmente cedida pelos Laboratórios Solvay, foi empregada como amostra padrão do vírus.

Cultivo das amostras do VDA

As amostras do VDA foram isoladas em células da linhagem PK-15. Os vírus foram inoculados em garrafas rolantes, com uma área de 1.500 cm², contendo 3x10⁹ células em meio mínimo essencial (MEM) acrescido de 10% de soro fetal bovino. Quando as células estavam confluentes, o meio MEM foi retirado e as células foram infectadas com a suspensão viral. Após 1 hora de adsorção foram adicionados 80 mL de meio MEM e as garrafas foram incubadas a 37°C, em aparelho roller. Após 24 horas de incubação, quando as células apresentavam 80% de efeito citopático, a suspensão viral foi colhida e congelada em freezer a -70°C.

Cálculo do título infeccioso em cultura de células

O título infeccioso do vírus foi determinado em microplacas, utilizando-se células PK-15 na concentração de 3x10⁵ células/cavidade. Foram inoculados em triplicata 100µL da suspensão viral nas diluições de 10⁻¹ a 10⁻⁹ e incubadas por 48 horas a 37°C. A

dose infectante cultura de tecidos (DICT 50) foi estimada pelo método do Reed & Muench (1938).

Identificação sorológica das amostras virais pela reação de soroneutralização

A reação de soroneutralização (SN) foi realizada em microplacas, utilizando-se antisoro policlonal de suíno específico para o VDA. Como controle negativo utilizou-se soro normal de suíno. A um volume de 50µL de diluições seriadas do soro foram adicionados 50µL de cada uma das amostras isoladas do vírus de Aujeszky contendo 100 DICT₅₀. A mistura foi incubada por 1 hora a 37°C em estufa de CO₂ a 5%. A seguir foram adicionados 100µL de uma suspensão de 3x10⁵ células PK-15, e a preparação foi incubada por 48 horas a 37°C. Os títulos dos vírus foram avaliados pelo método de Reed & Muench (1938).

Purificação do vírus

As suspensões virais foram descongeladas e o sobrenadante centrifugado a 16.000 x g por 10 minutos e novamente centrifugado por 1 hora a 100.000 x g a 4°C, sob um colchão de 3 mL de sacarose 40% em PBS pH 7.2, em rotor Beckman 60 Ti.

Extração do DNA genômico

O sedimento resultante da purificação do vírus foi ressuspenso em 1mL de tampão TNE (Tris 0,01M, EDTA 0,001M, NaCl 0,1M), pH 8,0 contendo 0,5% de SDS e 0,2mg de proteinase K/mL e incubado em banho maria por 1 hora a 56°C. À suspensão foram acrescentados 500µL de fenol e, após agitação, a mistura foi centrifugada a 12.000 x g por 3 min. Da fase aquosa foram colhidos 300µL aos quais foram adicionados 100µL de uma solução de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) e, após agitação, a mistura foi centrifugada a 12.000 x g por 3 min. A seguir, 100µL da fase aquosa foram precipitados com 10µL de acetato de sódio 3M e 50µL de etanol absoluto a -20°C por 12 h. Após centrifugação a 12.000 x g por 30 min. a 4°C, o sedimento foi seco por 15 min. em roto-evaporador, ressuspenso em 50µL de tampão TE (Tris 0,01M, EDTA 0,001M) pH 8,0 e estocado a -20°C.

PCR

A reação de PCR foi realizada em um volume de 100µL, contendo 10 mM de Tris HCl pH 9.0; 1,5mM de MgCl₂, 50mM de KCl, 200µM de cada nucleotídeo, 10µL do DNA extraído; 2,5U da enzima *Taq* DNA polimerase e 50 pmol de cada um dos *primers sense* e *anti sense* descritos por Galeota-Wheeler & Osorio (1991), respectivamente: 5'CACGGAGGACGAGCTGGGGCT3' e 5'GTCCACGCCCGCTTGAAGCT3'. As amostras foram inicialmente desnaturadas a 94°C por 5 minutos. A reação de amplificação foi feita por 40 ciclos repetitivos de desnaturação (94°C por 1 min), anelamento (65°C por 2 min) e extensão (72°C por 2 min), com uma extensão final de 10 min a 72°C para complementação da reação.

Sobrenadantes de células PK-15 não infectadas e a mistura dos reagentes sem o DNA serviram como controles negativo da reação.

A detecção do produto amplificado foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 2%, utilizando uma diferença de potencial de 100 volts por 1 hora. O gel foi corado com brometo de etídio, visualizado em transiluminador U.V. e fotografado em câmara digital (Kodak Digital Science DC-40 Camera).

Especificidade do produto de PCR

A especificidade do DNA amplificado foi verificada pela pesquisa de um sítio de restrição para a endonuclease *Sal* I. Para tanto, o fragmento amplificado foi digerido com a endonuclease *Sal* I, seguindo as instruções do fabricante (Gibco BRL - EUA). A revelação dos fragmentos de restrição foi feita em eletroforese em gel de agarose, como descrito acima.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da identificação sorológica das amostras de campo do VDA utilizadas neste estudo, pela prova de SN, estão apresentados na Tabela 1. Os títulos de SN observados com soro padrão específico variaram de 32 a 128, sendo portanto considerados altamente específicos (Bitsch & Eskildsen, 1976; Wittmann & Rziha, 1989).

A reação de PCR, baseada em uma sequência conservada do gene que codifica a glicoproteína essencial gD do VDA (Galeota-Wheeler & Osorio, 1991), foi capaz de amplificar um fragmento especí-

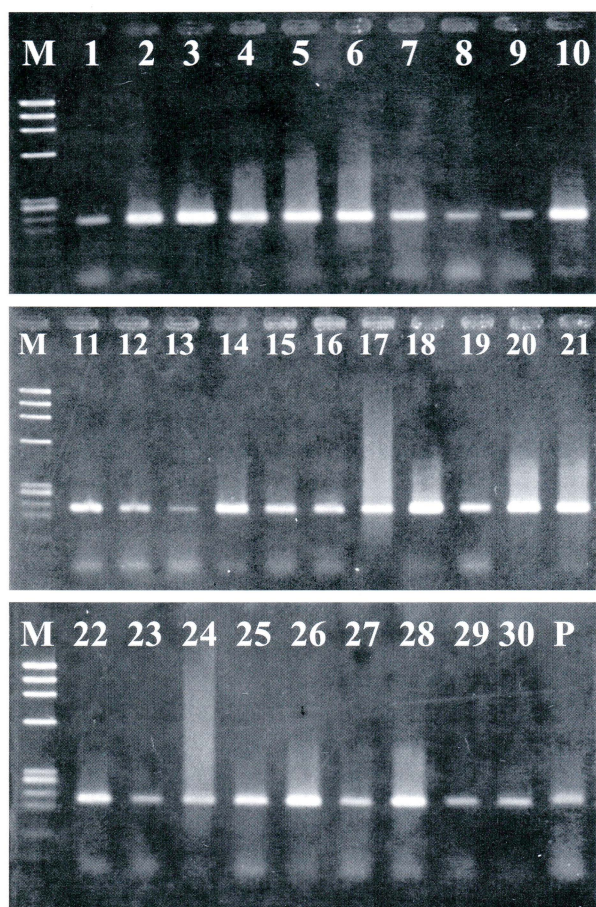


Fig. 1 - Detecção por eletroforese em gel de agarose do fragmento de 217 pb amplificado pela reação de PCR a partir das 30 amostras do VDA estudadas. **M** = marcador de peso molecular (DNA do fago λ 174 digerido com *Hae*III - Pharmacia); **P** = amostra de VDA padrão (Bartha); **1 a 30** = amostras do VDA.

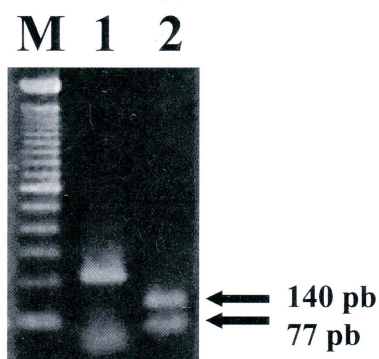


Fig. 2 - Detecção por eletroforese em gel de agarose dos fragmentos obtidos pela restrição do produto amplificado pela reação de PCR com a enzima *Sal*I. **M** = marcador de peso molecular (100 bp ladder - Pharmacia Biotech); **1** = fragmento íntegro; **2** = fragmentos resultantes da digestão com *Sal*I.

Tabela 1 - Resultados da soroneutralização das amostras do VDA estudadas.

Amostra/ Ano/ Origem	Animal	Município Origem	Título infectante DICT50/ML	Título SN com soro padrão
1/82/SP	suíno	Artur Nogueira	$10^{7.1}$	64
2/82/SC	suíno	Concórdia	$10^{7.5}$	128
3/83/SC	suíno	Ipumirim	$10^{6.2}$	32
4/85/SP	gato	Sapopemba	$10^{6.5}$	128
5/86/SP	suíno	Bragança Paulista	$10^{7.2}$	64
6/88/PR	bovino	Curitiba	$10^{6.8}$	64
7/90/PR	cão	Curitiba	$10^{6.7}$	32
8/90/SP	suíno	C. Limpo Paulista	$10^{6.8}$	128
9/90/SP	suíno	São Paulo	$10^{7.5}$	128
10/91/SP	suíno	Floreal	$10^{6.2}$	64
11/91/SP	suíno	Paranapanema	$10^{7.6}$	128
12/91/SC	suíno	Faxinal do Guedes	$10^{6.7}$	64
13/92/SP	suíno	Cerqueira César	$10^{6.5}$	128
14/92/SP	suíno	Franca	$10^{6.4}$	128
15/92/SC	suíno	Seara	$10^{6.2}$	32
16/92/SC	suíno	Seara	$10^{6.5}$	32
17/93/SC	suíno	Rio do Sul	$10^{6.8}$	32
18/93/SC	suíno	Xavantina	$10^{7.3}$	64
19/93/SC	suíno	Xavantina	$10^{6.2}$	64
20/93/SC	suíno	Agrolândia	$10^{7.1}$	128
21/94/SC	suíno	Chapecó	$10^{6.0}$	64
22/94/SC	suíno	Xavantina	$10^{6.3}$	32
23/94/SC	suíno	Rio do Sul	$10^{7.2}$	64
24/94/SC	suíno	Faxinal do Guedes	$10^{6.7}$	32
25/95/SC	suíno	Xavantina	$10^{6.4}$	128
26/95/SC	suíno	Xavantina	$10^{6.2}$	64
27/95/SC	suíno	Xanxerê	$10^{7.0}$	128
28/96/SC	suíno	Rio do Sul	$10^{6.3}$	128
29/96/SC	suíno	Itajaí	$10^{7.2}$	64
30/96/SC	suíno	Seara	$10^{7.5}$	64

fico de 217 pares de bases em todas as 30 amostras de campo do VDA estudadas e na amostra padrão Bartha (Fig.1). Não foram observadas amplificações em todos os controles da reação.

A especificidade de todos os produtos de PCR foi confirmada pela análise do perfil de restrição com a endonuclease *Sal*I, revelando 2 fragmentos, um de 140 e outro de 77 pares de bases (Galeota-Wheeler & Osorio, 1991). O perfil típico encontra-se na Figura 2.

Os resultados do presente estudo corroboram aqueles obtidos por Harding *et al.*, (1997), os quais também observaram a aplicabilidade da reação de PCR descrito por Galeota-Wheeler & Osorio (1991) na detecção de 9 diferentes amostras de campo do VDA.

Embora Harding *et al.* (1997) tenham demonstrado variabilidade no fragmento amplificado, atra-

vés da pesquisa de sítios de restrição para *Sau96I* e *AvaII*, as 30 amostras de campo do VDA utilizadas neste estudo e a amostra padrão Bartha foram detectadas pela reação de PCR empregada.

CONCLUSÃO

A reação de PCR proposta por Galeota-Wheeler & Osorio (1991) demonstrou sua aplicabilidade no diagnóstico direto do VDA, visto ter sido capaz de detectar as 30 amostras do VDA isoladas nas regiões Sul e Sudeste do Brasil no período de 1982 a 1996.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKKERMANS, J. P. W. M. La maladie d' Aujeszky. *Ann. Med.*, v. 120, p. 295-306, 1976.
- BITSCH, V.; ESKILDSEN, M. A. Comparative examination of swine sera for antibodies to Aujeszky virus with a conventional and a modified virus-serum neutralization test and a modified direct complement fixation test. *Acta Vet. Scand.*, v.17, p. 142-152, 1976.
- BELAK, S.; PORDÁNY, A. B.; FLENSBURG, J.; VIRTANEN, A. Detection of pseudorabies virus DNA sequences by the polymerase chain reaction. *Arch. Virol.*, v. 108, p. 279- 286, 1989.
- ELOIT, M.; FARGEAUD, D.; L'HARIDON, R.; TOMA, B. Identification of the pseudorabies virus glycoprotein gp50 as major target of neutralizing antibodies. *Arch. Virol.*, v. 99, p. 45-56, 1988.
- GALEOTA-WHEELER, J. G. & OSORIO, F. A. Investigation of sites of pseudorabies virus latency, using polymerase chain reaction. *Am. J. Vet. Res.*, v. 52, p. 1799-1803, 1991.
- GINGERAS, T. R.; RICHMAN, D. D.; KWOH, D. Y.; GUATELLI, J. C. Methodologies for in vitro nucleic acid amplification and their applications. *Vet. Microbiol.*, v. 24, p. 235-251, 1990.
- HARDING, M.; J, PRUD 'HOMME, I.; ROLA, J. Specificity and nucleotyping studies of a gp50 based Polymerase Chain Reaction assay for detection of pseudorabies virus. *Can. J. Vet. Res.*, v. 61, p. 157-160, 1997.
- HASEBE, H.; GALEOTA-WHEELER, J. G.; OSORIO, F. A. Gene specific assay to differentiate strains of pseudorabies virus. *Vet. Microbiol.*, v. 34 p. 221-231, 1993.
- JESTIN, A.; FOULON, T.; PERTUISET, B.; BLANCHARD, P.; LABOURDET, M. Rapid detection of pseudorabies virus genomic sequences in biological samples from infected pigs using polymerase chain reaction DNA amplification. *Vet. Microbiol.*, v. 23, p. 317-328, 1990.
- LOKENS GARD, J. R.; THAWLEY, D. G.; MOLITOR, T. W. Pseudorabies virus latency: Restricted transcription. *Arch. Virol.*, v. 110, p. 129-136, 1990.
- KLEIN, R. J. The pathogenesis of acute, latent and recurrent Herpes Simplex Virus infections. *Arch. Virol.*, v. 72, p. 143-168, 1982.
- MAES, R. K; BEISEL, C. E.; SPATZ, S. J.; THACKER, B. J. Polymerase chain reaction amplification of pseudorabies virus DNA from acutely and latently infected cells. *Vet. Microbiol.*, v. 24, p. 281-295, 1990.
- McFERRAN, J. B.; CLARKE, J. K.; KNOX, E. R.; CONNOR, T. A study of the cell lines required to detect a variety of veterinary viruses in routine diagnostic conditions. *Brit. Vet. J.*, v. 128, p. 627-635, 1972.
- MURPHY, F. A; FAUQUET, C. M.; BISHOP, D. H. L.; GHABRIAL, S. A.; JARVIS, A. W.; MARTELLI, G. P.; MAYO, M. A.; SUMMERS, M. D. Vírus Taxonomy. Classification and Nomenclature. Sixty Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch. Virol.*, supl.10, p. 120-121, 1995.
- REED, L. J. & MUENCH, H. Simple method of estimating fifty per cent end points. *Am. J. Hyg.*, v. 27, p. 493-497, 1938.
- RZIHA, H. J.; METTENLEITER, T. C.; OHLINGER, V.; WITTMANN, G. Herpesvirus (Pseudorabies Virus) latency in swine: occurrence and physical state of viral DNA in neural tissues. *Virology*, v. 155, p. 600-613, 1986.
- ROIZMAN, B. & SEARS, A. Herpes Simplex Viruses and their replication. In: FIELDS, B. N. & Knipe, D. M. (Eds). *Fundamental virology*. 2. ed. New York: Raven Press, 1991. p. 1795-1841.
- SABÓ, A. & RAJCANI, J. Rapid diagnosis of

- Aujeszky's disease by the fluorescent antibody technique. *Acta Virol.*, v. 14, p. 475- 484, 1970.
- SAIKI, R.K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K. B.; HORN, G.T.; ERLICH, H. A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, v. 230, p. 1350-1354, 1985.
- SAIKI, R.K.; GELFAND, D.H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S.; HIGUCHI, R.; HORN, G.T.; MULLIS, K. B.; ERLICH, H. A. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, v. 239, p. 487-491, 1988.
- WITTMANN, G. & RZHIA, H. J. Aujeszky's Disease (Pseudorabies) in pigs. In: WITTMANN, *Herpesvirus diseases of cattle, horses and pigs*, (Ed). Boston: Kluwer, 1989. p. 230-235.

Recebido para publicação em 5/2/99