

COMPARAÇÃO DAS TÉCNICAS DE ISOLAMENTO VIRAL E NESTED PCR NA DETECÇÃO DO BHV-1 EM SÊMEN BOVINO EXPERIMENTALMENTE E NATURALMENTE CONTAMINADO

**A.D. Meyer^{1*}, A. Cortez², R.M. Soares², M.E. Pituco³, L. Okuda³,
H. Leomil², A.M.M.G. Castro², L.J. Richtzenhain²**

¹Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, FMVZ/USP, Av. Prof. Orlando Marques de Paiva, 87, CEP 05508-900, São Paulo, SP, Brasil.

RESUMO

O Herpesvírus Bovino tipo-1 (BHV-1) é o agente etiológico da Rinotraqueíte Infeciosa Bovina (IBR), Vulvovaginite Pustular Infeciosa (IPV) e Balanopostite Pustular Infeciosa (IBP) e o principal patógeno viral encontrado no sêmen bovino. A técnica padrão para o diagnóstico do vírus em amostra de sêmen é o isolamento viral, a qual apresenta uma série de desvantagens. O objetivo deste trabalho foi avaliar uma *nested PCR* (nPCR) para a detecção do BHV-1 em sêmen bovino. Os *primers* foram dirigidos para a região codificadora de gB e a especificidade do fragmento amplificado foi confirmada pelo perfil de restrição com as enzimas *Fnu4HI* e *Sau96I*. A nPCR avaliada revelou-se rápida e com alta sensibilidade analítica (10⁵ vezes superior ao isolamento viral). Ao ser aplicada à série de amostras de sêmen colhidas de um touro proveniente de central de Inseminação Artificial, positivo ao isolamento viral em uma única das colheitas, a nPCR mostrou ser capaz de detectar a presença do BHV-1 27 dias antes e 3 dias após o isolamento viral.

PALAVRAS-CHAVE: IBR, sêmen, PCR.

ABSTRACTS

COMPARISAN OF THE TECHNIQUESS OF VIRAL ISOLATION AND NESTED PCR IN THE DETECTION of BHV-1 IN BOVINE SEMEN CONTAMINATED EXPERIMENTALLY AND NATURALLY. Bovine Herpesvirus type 1 (BHV-1) is the causal agent of Bovine Infectious Rinotracheitis (IBR), (IPV) and (IBP) and it is the main viral pathogen found in bovine semen. The gold standard for BHV-1 direct diagnosis in bovine semen samples is viral isolation, which has numerous disadvantages. The aim of this study was to evaluate a nested PCR (nPCR) assay for BHV-1 detection in bovine semen. The *primers* targeting gB and the specify of the amplicons was confirmed with *Fnu4HI* and *Sau96I* restriction profile. The nPCR showed fast and with a high analytic sensibility (10⁵ times higher than viral isolation). When the assay was applied to a collection of semen samples collected from a bull from an Artificial Insemination Center with a single semen sample positive at viral isolation, the nPCR was able to detect the BHV-1 DNA 27 days before and 3 days after the viral isolation.

KEY WORDS: IBR, semen, PCR.

INTRODUÇÃO

O BHV-1 é o agente causal da Rinotraqueíte Infeciosa Bovina (IBR), Vulvovaginite Pustular Infeciosa (IPV) e Balanopostite Pustular Infeciosa (IBP). É considerado o principal patógeno viral encontrado no sêmen bovino, fazendo com que os esforços realizados para sua detecção neste substrato sejam crescentes (AFSHAR & EAGLESOME, 1990).

A detecção do ácido nucléico viral através da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) tem se mostrado como uma alternativa rápida e sensível ao isolamento viral. Vários protocolos para a detecção do BHV-1, em amostras de sêmen bovino, foram desenvolvidos utilizando diversos tipos de preparo da amostra, técnicas de extração do DNA viral e *primers* direcionados para diferentes regiões alvo, apresentando praticidade e desempenho bastante variados.

*Bolsista da CAPES

²VPS/LABMAS/FMVZ/USP, São Paulo, SP, Brasil.

³Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal, Instituto Biológico, São Paulo, SP, Brasil.

Dentre as regiões alvo estão os genes da timidina quinase (XIA *et al.*, 1995), da glicoproteína C (VAN ENGELENBURG *et al.*, 1993; VAN ENGELENBURG *et al.*, 1995; ASHBAUGH *et al.*, 1997), da glicoproteína D (WIEDMANN *et al.*, 1993; WACTER *et al.*, 1996; GEE *et al.*, 1996), e da glicoproteína B (VILCEK *et al.*, 1994; MASRI *et al.*, 1996; SANTURDE *et al.*, 1996; ROCHA *et al.*, 1998; ROS & BELÁK *et al.*, 1999). O presente trabalho objetivou avaliar uma *nested PCR* (*nPCR*) para a detecção do BHV-1 em sêmen bovino empregando um protocolo de extração de DNA simples e rápido com *primers* dirigidos para a região de gB. A especificidade do fragmento amplificado foi confirmada pelo perfil de restrição com as enzimas *Fnu4HI* e *Sau96I* (ROS & BELÁK, 1999).

MATERIAL E MÉTODOS

Vírus Padrão

Para contaminação experimental de amostras de sêmen e determinação da sensibilidade analítica das reações de *nPCR* e isolamento viral, foi empregado a amostra padrão Los Angeles do BHV-1, cultivada em células de linhagem MDBK e com título $10^{7.5}$ TCID₅₀/mL.

Isolamento Viral (IV)

O isolamento viral foi realizado segundo o protocolo recomendado pela OIE (2001), com algumas modificações. O sêmen fresco foi diluído a 1:5 em soro fetal bovino (SFB) e, após 1 ciclo de congelamento e descongelamento a -20°C, foi centrifugado a 1500xg/15 min. O sobrenadante obtido por inversão constituiu a amostra de sêmen (SI) para o isolamento viral. A inoculação foi feita com 200 µL de SI diluídos em 400 µL de SFB em monocamada de cultivo secundário de células de rim fetal bovino em placas de 24 orifícios. As placas foram incubadas por 1 hora a 37°C. A mistura de SI com SFB foi removida e adicionou-se 1 mL de Minimal Essential Medium (MEM) com 20% de SFB em cada orifício. As placas foram incubadas novamente a 37°C e observadas diariamente, em microscópio óptico, para visualização do efeito citopático. Na ausência de efeito citopático após 7 dias de cultivo, as placas foram congeladas a -20°C e em seguida descongeladas, sendo 200 µL do sobrenadante usados na inoculação de uma nova placa. A amostra foi considerada negativa na ausência de efeito citopático em três passagens consecutivas. Nas amostras que apresentaram efeito citopático foi feita a soroneutralização com soro padrão anti-BHV-1 e microscopia eletrônica para realizar, respectivamente, a identificação sorológica e a confirmação da morfologia viral.

Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) e nested PCR (nPCR)

A extração do DNA viral foi feita através da digestão enzimática por proteinase K, segundo SAMBROOK *et al.* (1989), com pequenas modificações. Ao tampão de lise (20 µL de proteinase K a 20 mg/mL, 80 µL de TNE 5x [50 mM Tris HCL, 500 mM NaCl, 125 mM EDTA pH 8,0] e 40 µL de SDS a 10%) foram adicionados 260 µL do sêmen diluído (1:5) em TE (10mM de TrisHCl, 1mM de EDTA, pH 8,0) e, incubado a 56°C por 1h. O DNA obtido foi purificado com igual volume de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1), precipitado com etanol (SAMBROOK *et al.*, 1989) e incubado a -20°C por 1h. O sedimento foi suspenso em 30 µL de TE (10mM de TrisHCl, 1mM de EDTA, pH 8,0) e armazenado à -20°C até o momento do uso.

A reação enzimática foi realizada num volume final de 50 µL contendo 5 µL do DNA extraído, 200 µM de cada dNTPs, 25 pmol de cada *primer* externo CR30 e CR31 (ROS & BELÁK, 1999), 1x Tampão de PCR (Gibco BRL-Gaythersburg, USA), 1,5 mM MgCl₂, 10% de dimetil sulfoxido (DMSO) e 2U de Taq DNA polimerase (Gibco BRL-Gaythersburg, USA). A amplificação foi realizada conforme descrito por ROS & BELAK, (1999) num termociclador PTC-200 DNA Engine (MJ Research Researc Inc). A *nPCR* foi feita nas mesmas condições da PCR diferindo, apenas, na concentração da Taq DNA polimerase (1,25 U), nos *primers* (CR32 e CR33) (ROS & BELAK, 1999) e na quantidade de amostra (1 µL do produto da PCR), mantendo-se a temperatura de hibridização dos *primers*. Os produtos de amplificação foram analisados através de eletroforese em gel de agarose a 2,0%. A visualização dos fragmentos amplificados foi feita através da transiluminação do gel em luz ultravioleta, após corá-lo em solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL) (SAMBROOK *et al.*, 1989).

Para confirmar a identidade do BHV-1, os produtos amplificados foram submetidos à digestão com as enzimas *Fnu4HI* e *Sau96I* (ROS & BELAK, 1999), conforme a recomendação do fabricante.

Comparação das técnicas de IV e nPCR na detecção do BHV-1 em sêmen bovino

Sêmen experimentalmente contaminado

Para a contaminação experimental e determinação da sensibilidade analítica da *nPCR*, foram utilizadas amostras de sêmen, preparadas para isolamento viral, de touros livres de anticorpos contra o BHV-1 (testados com kit comercial de ELISA – *Herd Check anti-IBR*, Idexx Laboratories-EUA) negativos para a *nPCR*, provenientes do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

Amostras de sêmen fresco (SF) foram experimentalmente contaminadas com 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 , 10^0 , 10^{-1} e 10^{-2} TCID₅₀/mL do BHV-1. O sêmen diluído (SI) obtido, a partir dessas amostras, foi então submetido às reações de *nPCR* e ao IV.

Sêmen naturalmente contaminado

Foram utilizadas 22 colheitas de sêmen de um touro de central de Inseminação Artificial (IA), com um único isolamento viral positivo. As amostras foram colhidas 42 dias antes e 11 dias após o isolamento, totalizando um intervalo de 53 dias.

RESULTADOS

Quando aplicada às amostras de sêmen experimentalmente contaminadas, a reação de *nPCR* apresentou uma sensibilidade analítica de 1TCID₅₀/mL, enquanto que o isolamento viral foi de 10^5 TCID₅₀/mL.

A Tabela 1 apresenta os resultados do isolamento viral e da *nPCR* realizados numa série de amostras de sêmen colhidas de um touro naturalmente infectado, em diferentes datas. Embora de forma descontínua, a *nPCR* foi capaz de detectar o BHV-1, no sêmen, 28 dias antes e 3 dias após o isolamento viral.

O resultado da restrição enzimática dos produtos da *nPCR* com as enzimas de restrição *Fnu4HI* e *Sau96I* gerou uma banda de 195 pb para todas as amostras amplificadas no experimento, compatível com o perfil do BHV-1 (ROS & BELÁK, 1999).

DISCUSSÃO

A região alvo da reação de *nPCR* apresenta a vantagem de permitir, através do perfil de restrição enzimática (RFLP) do produto amplificado com as enzimas *Fnu4HI* e *Sau96I*, a diferenciação dos alphaherpesvírus de ruminantes como o Herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1), Herpesvírus bovino tipo 5 (BHV-5), Herpesvírus caprino tipo 1 (CapHV-1), Herpesvírus cervídeo tipo 1 (CerHV-5) e o Herpesvírus rangiferino tipo 1 (RanHV-5) (ROS & BELÁK, 1999).

Em função da possível infecção de bovinos com outros alphaherpesvírus como o BHV-5 (BULACH & STUDDERT, 1990), o CapHV-1 (ENGELS *et al.*, 1992), o CerHV-5 (REID *et al.*, 1986) e o RanHV-5 (NEETILETON *et*

al., 1988), fica evidente a importância do uso da *nPCR* associada ao RFLP para diagnóstico definitivo de BHV-1.

A sensibilidade analítica obtida com a *nPCR*, de 1TCID₅₀/mL, demonstrou ser 10^5 vezes maior que a sensibilidade obtida com o IV, em amostras experimentalmente contaminadas. XIA *et al.* (1995) e MASRI *et al.* (1996) também compararam a sensibilidade analítica de BHV-1 através da PCR e do IV em cultivo celular em amostras de sêmen experimentalmente contaminadas. Enquanto XIA *et al.* (1995) constataram uma sensibilidade analítica de 200TCID₅₀/mL de sêmen em ambas as provas, MASRI *et al.* (1996) constataram uma sensibilidade 10^3 vezes maior da PCR em relação ao IV. A diferença de resultados pode ser atribuída a diferenças como o tipo de amostra viral empregado, volume de amostra utilizado para inoculação, tipo de células, número de passagens e o método adotado na detecção de infecção viral.

Outros autores não compararam a sensibilidade analítica das duas provas, mas observaram um número maior de amostras positivas na PCR em relação ao isolamento viral de BHV-1 em amostras de sêmen bovino (WAGTER *et al.*, 1996; ROCHA *et al.*, 1998). VAN ENGELEMBURG *et al.* (1993) compararam o IV com a PCR em amostras naturalmente infectadas e constataram, através de diluições, que a PCR apresenta uma sensibilidade analítica de 2 a 100 vezes mais elevada que o IV para detecção do BHV-1.

Quando a *nPCR* foi aplicada em uma série de colheitas de sêmen de um touro naturalmente infectado, o BHV-1 foi detectado em colheitas de sêmen até 28 dias antes e 3 dias após o único IV obtido. Das 22 colheitas de sêmen que foram testadas, apenas uma foi positiva no IV e 12 foram positivas na *nPCR*. Os resultados obtidos ilustram a eliminação intermitente do BHV-1 no sêmen e corroboram os dados de VAN ENGELEMBURG *et al.* (1995) e ROS & BELÁK (1999) que conseguiram detectar o BHV-1 por PCR em mais amostras de sêmen e por um período de tempo maior que o IV. A presença de partículas virais inativas no sêmen e/ou em reduzido número poderiam explicar o maior número de amostras positivas obtidas com a *nPCR* em relação ao IV.

O desempenho claramente superior da *nPCR* em relação ao IV em cultivo celular na detecção do BHV-1, em sêmen, e o comprovado papel da IA na transmissão do BHV-1, revelam a importância do emprego desta

Tabela 1 - Resultado do isolamento viral e da nested PCR em amostras de sêmen colhidas em diferentes datas de um touro com colheita positiva para isolamento viral (dia 0).

	dias																						
	-42	-35	-32	-28	-25	-22	-19	-14	-13	-11	-7	-6	-4	-3	0	1	3	4	7	8	10	11	
Isolamento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>nPCR</i>	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-

metodologia no monitoramento do BHV-1 em partidas de sêmen comercializadas por centrais de IA.

CONCLUSÃO

Em amostras de sêmen experimentalmente contaminada com o BHV-1, a sensibilidade analítica da *nPCR* foi de 1TCID₅₀/mL, valor 10⁵ vezes mais baixo do isolamento em cultivo celular.

Em animal naturalmente infectado, a reação de *nPCR* foi capaz de detectar o vírus em um maior número de amostras e por um período de tempo maior que o isolamento em cultivo celular.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Antonio Visintin, do Departamento de Reprodução Animal, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, da Universidade de São Paulo.

À CAPES, pelo auxílio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFSHAR, A. & EAGLESOME, M.D. Viruses Associated with Bovine Sêmen. *Vet. Bull.*, v.60, p.93-109, 1990.
- ASHBAUGH, S.E.; THOMPSON, K.E.; BELKNAP, E.B.; CHOWDHURY, S.; COLLINS, J.K. Specific detection of shedding and latency of bovine herpesvirus 1 and 5 using a nested polymerase chain reaction. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.9, p.387-394, 1997.
- BULACH, D.M. & STUDDERT, M.J. Comparative genome mapping of bovine encephalitis herpesvirus, bovine herpesvirus 1, and buffalo herpesvirus. *Arch. Virol.*, v.113, p.17-34, 1990.
- ENGELS, M.; PALATINI, M.; METZLER, A. E.; PROBST, U.; KIHM, U.; ACKERMANN, M. Interactions of bovine and caprine herpesviruses with the natural and the foreign hosts. *Vet. Microbiol.*, v.33, p.69-78, 1992.
- GEE, A.L.W.; WAGTER, L.H.A.; HAGE, J.J. The use of a polymerase chain reaction assay for the detection of bovine herpesvirus 1 in semen during a natural outbreak of infectious bovine rhinotracheitis. *Vet. Microbiol.*, v.53, p.163-168, 1996.
- MASRI, S.A.; OLSON, W.; NGUYEN, P.T.; PRINS, S.; DEREGT, D. Rapad detection of bovine herpesvirus 1 in the semen of infected bulls by a nested polymerase chain reaction assay. *Can. J. Vet. Res.*, v.60, p.100-107, 1996.
- NEETLETON, P.F.; THIRY, E.; REID, H.; PASTORET, P.P. Herpesvirus infections in *Cervidae*. *Office International des Epizooties*, v.7, p.977-988, 1988.
- OIE 2001. Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines. Chapter 3.2.5. Infectious Bovine Rhinotracheitis/infectious Pustular Vulvovaginitis. 14p. Disponível em: <http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00049.htm> Acesso em: 20 jan. 2001.
- REID, H.W.; NEETLETON, P.F.; POW, I.; SINCLAIR, J.A. Experimental infection of red deer (*Cervus elaphus*) and cattle with a herpesvirus isolated from a red deer. *Vet. Rec.*, v.118, p.156-158, 1986.
- ROCHA, M.A.; BARBOSA, E.F.; GUIMARÃES, S.E.F.; DIAS NETO, E.; GOUVEIA, A.M.G. A high sensitivity nested PCR assay for BHV-1 detection in semen of naturally infected bulls. *Vet. Microbiol.*, v.63, p.1-11, 1998.
- ROS, C. & BELÁK, S. Studies of the genetic relationships between bovine, caprine, corvine, and rangiferine alphaherpesviruses and improved molecular methods for virus detection and identification. *J. Clin. Microbiol.*, v.37, p.1247-1253, 1999.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Press, 1989. 957p.
- SANTURDE, G.; SILVA, N.DA; VILLARES, R.; TABARÉS, E.; SOLANA, A.; BAUTISTA, J.M.; CASTRO, J.M. Rapid and high sensitive test for direct detection of bovine herpesvirus-1 genome in clinical samples. *Vet. Microbiol.*, v.49, p.81-92, 1996.
- VAN ENGELENBURG, F.A.C.; MAES R.K.; VAN OIRSHOT, J.T.; RIJSEWIJK, A.M. Development of a rapid and sensitive polymerase Chain reaction assay for detection of bovine herpesvirus type 1 in bovine semen. *J. Clin. Microbiol.*, v.31, p.3129-3135, 1993.
- VAN ENGELENBURG, F.A.C.; VAN SCHIE, F.W.; RIJSEWIJK, A.M.; VAN OIRSHOT, J.T. Excretion of bovine herpesvirus type 1 in semen is detected much longer by PCR than by virus isolation. *J. Clin. Microbiol.*, v.33, p.308-312, 1995.
- VILCEK, S.; NEETLETON, P.F.; HERRING, J.A.; HERRING, A.J. Rapid detection of bovine herpesvirus 1 (BHV 1) using the polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol.*, v.42, p.53-64, 1994.
- WAGTER, L.H.A.; GLAS, R.D.; BEUMINK-PLUYM, N.; VAN ENGELENBURG, F.A.C.; RIJSEWIJK, F.A.M.; HOUWERS, D. J. A polymerase chain reaction (PCR) assay for the detection of bovine herpesvirus 1 (BHV 1) in selectively digested whole bovine semen. *Vet. Res. Commun.*, v.20, p.401-408, 1996.
- WIEDMANN, M.; BRANDON, R.; WAGNER, P.; DUBOVI, E.J.; BATT, C.A. Detection of bovine herpesvirus-1 in semen by a nested PCR assay. *J. Virol. Methods*, v.44, p.129-140, 1993.
- XIA, J.Q.; YASON, C.V.; KIBENGE, F.S.B. Comparison of dot blot hybridization, polymerase Chain reaction, and virus isolation for detection of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) in artificially infected bovine semen. *Can. J. Vet. Res.*, v.59, p.102-109, 1995.

Recebido em 21/11/02

Aceito em 24/2/03