

AVALIAÇÃO MOLECULAR DA PRESENÇA DO HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 1 (BOHV-1) NO SÊMEN DE TOUROS DO ESTADO DE MATO GROSSO

Daniel Lucas da Costa Bica (Bolsista FUNADESP/UNIC), e-mail: danielbica06@gmail.com. Michele Lunardi (Orientadora), e-mail: michelelunardi@gmail.com.

Universidade de Cuiabá (UNIC) | Laboratório de Virologia Animal e Biologia Molecular

Introdução

O Herpesvírus Bovino tipo 1 (BoHV-1) pertence a família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*, gênero *Varicellovirus* e pode ser classificado ainda nos subtipos BoHV-1.1 e BoHV-1.2 (D'ARCE *et al.*, 2002). Este agente viral é responsável por determinar distúrbios reprodutivos de grande influência na taxa de natalidade dos rebanhos, uma vez que promove quadros com abortos, morte fetal, absorção embrionária, infertilidade temporária, nascimento de animais fracos e suscetíveis a infecções sistêmicas e óbito, além de alterações inflamatórias na genitália tanto do macho quanto da fêmea (VIEIRA *et al.*, 2003).

Este patógeno possui distribuição mundial e uma de suas principais características é a sua capacidade de permanecer em latência no seu hospedeiro, se manifestando em quadros imunossupressores (MARSÍ; OLSON; NGUYEN, 1996). Essa característica lhe permite "residir" nos rebanhos, assegurando sua permanência e transmissibilidade (seja pelas vias aéreas, venérea ou outro tipo que envolva contato direto com mucosas contaminadas) nos rebanhos, muitas vezes sem ser detectado (VIEIRA *et al.*, 2003).

Esta pesquisa teve como objetivos avaliar amostras de sêmen bovino colhidas de algumas propriedades do estado de Mato Grosso, para a presença do DNA genômico do BoHV-1, utilizando a reação em cadeia pela polimerase (PCR) e verificar a importância do modo de transmissão venérea da infecção pelo BoHV-1 por meio da caracterização de percentuais de touros positivos para a presença do BoHV no sêmen.

Material e Métodos

Foram coletadas 99 amostras de sêmen bovino em 8 fazendas mato-grossenses, que se localizam nas macrorregiões Noroeste, Norte, Médio Norte, Oeste, Centro Sul e Sudeste do estado. Suas atividades eram voltadas a produção de gado de corte. O número de amostras por fazenda variou entre 5 e 15. Os touros foram escolhidos aleatoriamente e as idades variaram de 36 meses a 120 meses.

Uma alíquota de 1mL do sêmen colhido de cada um destes animais foi submetida ao diagnóstico molecular para o BoHV-1 e armazenada a -20 °C até o procedimento de extração dos ácidos nucleicos.

Os procedimentos relacionados ao diagnóstico (extração do material genético e reação em cadeia de polimerase) foram realizados no Laboratório de Virologia Animal e Biologia Molecular da própria universidade.

Para a extração do material genético, o DNA viral foi purificado a partir de alíquotas de 250µL de sêmen com o kit QIAamp DNA mini and Blood mini da Qiagen, conforme recomendações do fabricante. Os ácidos nucleicos extraídos foram mantidos a -20°C até a sua utilização na PCR.

Alíquotas de água ultrapura estéril e células MDBK infectadas com a cepa viral padrão foram utilizadas como controles negativo e positivo, respectivamente, nos procedimentos de extração de DNA.

A reação em cadeia de polimerase (PCR) foi realizada de acordo com Claus e Cols. (2005). A reação continha 5µl do DNA extraído a partir de alíquotas de sêmen e 45 µl do PCR-mix, este por sua vez foi preparado com:

- 20 pmol de cada um dos primers :
 - B1 (5'CAA CCG AGA CGG AAA GCT CC 3' nt 185-204);
 - B5 (5'CGG ACG AGA CGC CCT TGG 3'- nt 322-339) ;
 - Bcon [5'AGT GCA CGT ACA GCG GCT CG 3' nt 519-538 (BoHV-1) e nt 461-480 (BoHV-5)].
- 1,6 mM de cada dNTP (Invitrogen™ Life Technologies, USA);
- 2,5 unidades de *Taq* DNA polimerase Platinum (Invitrogen™ Life Technologies, USA);
- 1x PCR buffer (20 mM Tris-HCl pH 8,4 e 50 mM KCl);
- 1,5 mM de MgCl₂;
- 8% dimetilsulfoxido (DMSO, Sigma Co., USA);
- Água estéril ultrapura (para completar o volume de 50 µl).

A amplificação foi realizada com as seguintes condições de tempo e temperatura:

- Desnaturação inicial de 3 min a 94°C;
- 40 ciclos de 1 min/94°C (40 min); 1 min/58°C; 1 min/72°C;
- Uma extensão final de 7 min/72°C.

Os produtos amplificados com cerca de 354 pb foram avaliados por eletroforese em gel de agarose a 2%, em tampão TBE pH 8,4 (89 mM Tris; 89 mM ácido bórico; 2 mM EDTA) sob voltagem constante (90V) por aproximadamente 45 min, corados com brometo de etídeo (0,5 µg/ml), e visualizados sob luz UV.

Para validar os resultados foram testados, simultaneamente às amostras, controles positivos e negativos, todos apresentando resultados satisfatórios quanto ao esperado.

Resultados e Discussão

Dentre as 99 amostras avaliadas, 21 foram positivas para a detecção molecular do BoHV-1, demonstrando que o vírus estava presente nos rebanhos e sendo excretado no sêmen dos reprodutores.

Os resultados positivos foram encontrados nas amostras provenientes de cinco das oito fazendas e em três das seis macrorregiões testadas (Tabela 1), onde a maior quantidade de touros excretando o vírus foi evidenciada em rebanhos provenientes da região Centro-sul (15 amostras positivas dentre as 36 amostras testadas). As amostras positivas foram encontradas também em animais mais com média de quatro anos.

Tabela 1: Distribuição das frequências de touros infectados por Herpesvírus Bovino Tipo 1 (BoHV-1) por Macrorregião do Estado de Mato Grosso

Macrorregiões	Touros avaliados	Touros positivos	%
Noroeste	15	4	26,67%
Médio Norte	20	0	0%
Norte	5	0	0%
Oeste	15	0	0%
Centro Sul	36	15	41,67%
Sudeste	8	2	25%
Total	99	21	---

Fonte: Dados da pesquisa.

Para validar os resultados foram testados, simultaneamente às amostras, controles positivos e negativos, todos apresentando resultados satisfatórios quanto ao esperado.

Os achados deste estudo demonstram que a eliminação do vírus por meio do sêmen pode constituir importante via de transmissão da infecção nos rebanhos, destacando a necessidade de se conhecer o status dos touros quanto a infecção pelo BoHV-1 antes que estes animais sejam utilizados para a reprodução, tanto por monta natural como para a coleta de sêmen para a inseminação artificial. Vale ressaltar que os percentuais de animais positivos observados nesse estudo representam os indivíduos que estavam eliminando o vírus pelo sêmen no momento da coleta, tanto após a ocorrência de uma infecção aguda como pela reexcreção viral após um estado de latência viral. Portanto, a ferramenta diagnóstica utilizada nesta investigação avaliou os animais pontualmente, não sendo possível verificar se entre os animais que não estavam eliminando o vírus pelo sêmen estavam presentes indivíduos latentemente infectados.

Mesmo frente a provável colaboração do agente patogênico com grandes perdas reprodutivas nos rebanhos do estado, observa-se ainda determinada negligência quanto ao diagnóstico de infecções com este patógeno, de modo a colocar sob risco extensos os rebanhos e sua capacidade produtiva.

Conclusão

O estudo demonstrou a importância da transmissão venérea do BoHV-1, demonstrando falhas no controle sanitário reprodutivo dos rebanhos testados. Por meio deste também foi possível demonstrar que a detecção do BoHV-1 se torna um importante diagnóstico diferencial perante determinadas patologias reprodutivas.

Novas avaliações, mais abrangentes, precisam ser realizadas para determinar a prevalência do BoHV-1 em rebanhos e animais de diferentes aptidões nas diversas regiões do estado, pois a prevalência estabelecida nos estados vizinhos por sorologia apresentou níveis muito elevados, evidenciando riscos de possível infecção.

Agradecimentos

A FUNADESP e Universidade de Cuiabá (UNIC). Adicionalmente, pela orientação prestada Profa. Dra. Michele Lunardi, pelo apoio técnico por parte da técnica do laboratório, mestrandos e outros estagiários.

Referências

CLAUS M.P. *et. al.* Rapid Detection and Differentiation of Bovine Herpesvirus 1 and 5 Glycoprotein C Gene in Clinical Specimens by Multiplex-PCR. *J. Virol.*, v.128, p.183-188, 2005.

D'ARCE, R.C.F. *et.al.* Restriction Endonuclease and Monoclonal Antibody Analysis of Brazilian Isolates of Bovine Herpesvirus Types1 and 5. *Vet. Microbiol.*, v.88, p.315-324, 2002.

FLORES, E.F. *Virologia veterinária*. Santa Maria: Editora da UFSM, 2007.

MARSI, S.A.; OLSON,W.; NGUYEN, P.T. Rapid detection of bovine herpesvirus 1 in semen of infected bulls by a nested polymerase chain reaction. *Canadian J. Vet. Res.*, v.60, p.100-107, 1996.

VIEIRA, S. *et al.* Anticorpos para o Herpesvírus bovino tipo 1(BoHV-1) em bovinos do estado de Goiás. *Ciênc. Anim. Bras.*, v.4, n.2, p.131-137, 2003.