

Otimização da reação em cadeia pela polimerase (*Semi Nested-PCR*) para a detecção do herpesvírus bovino tipo 1 em fragmentos de órgãos fetais e em sêmen de bovinos naturalmente infectados¹

Standardization of a polymerase chain reaction (*Semi Nested-PCR*) to detect bovine herpesvirus type 1 in aborted fetus and semen from naturally infected cattle¹

Elisabete Takiuchi²; Kerlei Cristina Médici³;
Alice Fernandes Alfieri³; Amauri Alcindo Alfieri^{3*}

Resumo

A reação em cadeia pela polimerase (PCR) foi empregada para a detecção parcial do gene da glicoproteína D do herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1) em material biológico proveniente de bovinos naturalmente infectados. Para o aumento da sensibilidade e da especificidade da PCR, foram avaliados diferentes protocolos. Para a extração do DNA, a associação dos métodos fenol/clorofórmio/álcool isoamílico e sílica/tiocianato de guanidina, proporcionou a amplificação do DNA em maior concentração e qualidade. Após a otimização dos *primers* e condições da reação foi possível detectar, por meio da *Semi Nested-PCR* (SN-PCR), o genoma da estirpe Los Angeles do BHV-1 em sobrenadante de cultura celular, sem processamento prévio, até o limite de 1 TCID₅₀. Em sêmen artificialmente infectado o limite de detecção do BHV-1 foi de 0,1 TCID₅₀. Quando utilizada em material biológico, proveniente de bovinos naturalmente infectados, a SN-PCR apresentou resultados positivos tanto em fragmentos de órgãos de fetos bovinos abortados quanto em sêmen. Essa técnica revelou-se uma alternativa viável, rápida, sensível e específica para aplicação na rotina de diagnóstico da infecção pelo BHV-1, bem como, para o monitoramento sanitário do sêmen.

Palavras-chave: Bovino, herpesvírus bovino tipo 1, diagnóstico, PCR, aborto, sêmen.

Abstract

The glycoprotein D gene of bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) was detected in clinical samples from naturally infected cattle by semi-nested polymerase chain reaction (SN-PCR). Different protocols were tested to increase the sensitivity and specificity of the technique. An association of DNA extraction methods using phenol/chloroform/isoamyl alcohol followed by silica/guanidine isothiocyanate yield greater concentration and quality of amplified DNA. After optimization of primers and reaction conditions, the genome of BHV-1 (Los Angeles strain) was detected by SN-PCR in tissue culture supernatant and artificially infected semen at the 1 and 0.1 TCID₅₀ limit, respectively. When used on clinical specimens from naturally

¹ Apoio Financeiro: CNPq, CAPES, CPG/UEL

² Aluna do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal (Área de Concentração: Sanidade Animal; Nível: Mestrado) / Universidade Estadual de Londrina (UEL)

³ Laboratório de Virologia Animal, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Agrárias, UEL, cx. postal 6001, Londrina/PR. e-mail: alfieri@uel.br

* Autor para correspondência.

infected cattle, the SN-PCR yield positive results in semen of seropositive bull and in organ fragments of aborted cattle fetus. The SN-PCR was a viable alternative, which was faster, sensitive, specific and less laborious to be used in the routine diagnosis of BHV-1 infection and semen health monitoring.

Key words: Cattle, bovine herpesvirus type 1, diagnosis, PCR, abortion, semen.

Introdução

O herpesvírus bovino tipo 1 (*bovine herpesvirus type 1* -BHV-1-) é o agente etiológico da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR) e é considerado um dos principais patógenos de bovinos, responsável por grandes prejuízos econômicos à exploração pecuária (KIRKBRIDE, 1985). Tanto em rebanhos de corte quanto de leite o BHV-1 está associado a várias manifestações clínicas como rinotraqueíte, vulvovaginite, balanopostite, conjuntivite, encefalites e diversas formas de problemas reprodutivos como mortalidade embrionária e fetal, abortamento, natimortalidade e nascimento de bezerros fracos (KARHS, 1977; WYLER; ENGELS; SCHWYZR, 1989; OKANO et al., 2003).

A ampla variedade de manifestações clínicas, presente também em outras doenças infecto-parasitárias, dificulta o diagnóstico clínico definitivo (LARSON, 1996; ALFIERI; ALFIERI; MEDICI, et al., 1998; SANCHES et al., 2000). Em rebanhos não vacinados contra o BHV-1 os métodos de diagnóstico sorológico tradicionais apenas indicam a presença da infecção, não podendo ser empregados para a realização do diagnóstico conclusivo. Outro inconveniente inclui a soroconversão pós-vacinal em animais imunizados com vacinas produzidas por metodologias convencionais, nos quais, não é possível diferenciar os resultados sorológicos positivos ocasionados pela infecção natural, daqueles resultantes da vacinação (WYLER; ENGELS; SCHWYZR, 1989; BABIUK; HURK; TIKOO, 1996; MÉDICI; ALFIERI; ALFIERI, 2000a).

O diagnóstico laboratorial da infecção pelo BHV-1 somente é conclusivo quando são utilizados métodos para a identificação do vírus ou de componentes virais (proteínas ou ácido nucléico) diretamente em amostras biológicas. Para isto, podem ser utilizadas

técnicas de isolamento viral em cultivo celular, ELISA, imunofluorescência e imunoperoxidase diretas, e técnicas moleculares como a hibridização e a reação em cadeia pela polimerase (PCR). O isolamento viral em cultivo celular é a técnica rotineiramente empregada, porém exige a manutenção de linhagens celulares tornando o processo laborioso, demorado e de alto custo. A exigência da viabilidade da partícula viral, e conseqüentemente da sua infecciosidade, constitui outro inconveniente dessa técnica. Em algumas situações, como os abortos ocasionados pelo BHV-1, devido à expulsão tardia após a morte fetal, com freqüência o vírus presente no tecido fetal não é mais infectante (KIRKBRIDE, 1992; TAKIUCHI; ALFIERI; ALFIERI, 2001). As técnicas de imunoperoxidase, imunofluorescência e ensaios imunoenzimáticos para a detecção de antígenos, apesar de não exigirem a infecciosidade da partícula viral, podem ser seriamente comprometidas caso a integridade da mesma não seja mantida. Com isto, as formas de conservação, e mesmo de transporte, das amostras podem ser de fundamental importância para o sucesso do diagnóstico etiológico conclusivo (EDWARDS; CHASEY; WHITE, 1983).

Os métodos moleculares, particularmente a PCR, estão sendo universalmente adotados para o diagnóstico etiológico de diversas viroses em animais (BÉLAK; BALLAGI-PORDÁNY, 1993). As principais vantagens da PCR incluem a rapidez na obtenção dos resultados; a não exigência da infecciosidade da partícula viral e, quando devidamente padronizada, as altas taxas de sensibilidade e especificidade (McPHERSON; TAYLOR; QUIRKE, 1994). A aplicação da PCR também tem sido efetuada com sucesso em amostras de sêmen bovino, minimizando os riscos de transmissão do BHV-1 para vacas inseminadas artificialmente (VAN ENGELBURG et al., 1993; WIEDMANN et al., 1993; XIA et al., 1995; MASRI et al., 1996; KATARIA et al., 1997; ROCHA et al., 1998).

No Brasil, evidências sorológicas indicam alta frequência de animais soropositivos para o BHV-1 tanto em rebanhos bovinos com aptidão leiteira quanto de corte (RICHTZENHAIN et al., 1999; MÉDICI; ALFIERI; ALFIERI, 2000b; CORTEZ et al., 2001; TAKIUCHI; ALFIERI; ALFIERI, 2001). Porém, o diagnóstico etiológico do BHV-1, a partir de material biológico proveniente de animais com sinais clínicos compatíveis com a infecção, ainda não é realizado com muita frequência.

O presente trabalho teve como objetivo otimizar a técnica de *Semi Nested-PCR* (SN-PCR) para a identificação de seqüências específicas do genoma do BHV-1 em fragmentos de órgãos de feto abortado e em sêmen bovino.

Material e Métodos

Vírus

As estirpes Los Angeles (LA) do BHV-1 e NADL do vírus da diarreia viral bovina (*bovine viral diarrhoea virus* –BVDV–) foram produzidas em células MDBK (*Madin Darby bovine kidney*) e mantidas em meio Dulbecco modificado (DMEM, Gibco BRL, EUA) suplementado com 7% de soro fetal bovino (SFB) livre de micoplasmas e vírus (Gibco BRL, EUA), 55mg/μL de gentamicina (Sigma Co., EUA) e 2,5mg/μL de anfotericina B (Sigma Co., EUA). Para a produção do BHV-1 em cultivo celular a concentração do SFB presente no meio de cultura celular DMEM foi reduzida para 1%. O título viral presente na suspensão foi calculado em dose infecciosa 50% para cultura de tecidos (50% *tissue culture infective doses* –TCID₅₀ –).

Amostras Biológicas

Fragmentos de órgãos fetais

Foram analisados 10 fetos bovinos abortados entre o quarto e o sétimo mês de gestação. Os fetos foram obtidos na região Norte do Estado do Paraná em rebanhos de corte e de leite com histórico de

problemas reprodutivos. Em um inquérito sorológico preliminar os rebanhos estudados mostraram-se soropositivos para o BHV-1 com anticorpos detectados pelas técnicas de soroneutralização (BRITSCH, 1978), e por ensaio imunoenzimático (HerdChek®: Anti-IBR; Bovine Rhinotracheitis Virus Antibody Test Kit Screening / Verification, IDEXX Laboratories, Inc., EUA) realizado conforme instruções do fabricante. Com o objetivo de avaliar a especificidade da SN-PCR em tecido fetal foi incluído no estudo um feto bovino com seis meses de gestação, obtido em frigorífico, soronegativo para o BHV-1 (SN e ELISA) e que à necrópsia não apresentou qualquer tipo de lesão macroscópica.

Durante as necrópsias fetais foram colhidos fragmentos de pulmão, fígado, baço e rim. Os fragmentos foram triturados em tampão fosfato salina (PBS; pH=7,2) e centrifugados por 15 min / 3.000 x g a 4°C. Alíquotas de 500 μL e de 1000 μL do sobrenadante foram, respectivamente, submetidas à extração do DNA para amplificação genômica ou inoculadas em células MDBK para o isolamento viral. O sobrenadante utilizado na tentativa de isolamento do BHV-1 foi previamente tratado com gentamicina (50 mg/mL) e anfotericina B (2,5 mg/mL).

Amostras de sêmen

Foram incluídas no estudo cinco amostras de sêmen provenientes de touros soropositivos (soroneutralização / ELISA) para o BHV-1. Uma amostra de sêmen, obtida de touro soronegativo (soroneutralização / ELISA) para o BHV-1, negativa em cultivo celular (MDBK) após três passagens sucessivas foi utilizada para a otimização da SN-PCR e para a determinação do limite de detecção (TCID₅₀) da estirpe LA do BHV-1 em sêmen bovino artificialmente contaminado.

Extração do DNA

Durante os experimentos de otimização da SN-PCR foram testados quatro diferentes métodos de extração do DNA: i) fenol / clorofórmio / álcool

isoamílico (25:24:1), ii) sílica / tiocianato de guanidina, iii) associação dos métodos: fenol / clorofórmio / álcool isoamílico e sílica / tiocianato de guanidina, iv) DNAzol (Life Technologies®).

Alíquotas de 500 µL de suspensão de fragmentos de órgãos fetais e de sobrenadante de cultura de células MDBK inoculadas com o BHV-1 e alíquotas de 100 µL de amostras de sêmen bovino, diluídas 1:10 em PBS, foram tratadas com tampão de lise, constituído por SDS e proteinase K (Life Technologies®) em concentração final de 1% e 0,2 mg/mL, respectivamente. Após homogeneização em vórtex as amostras foram mantidas em banho-maria a 56°C/30 min. Para as amostras de sêmen esse intervalo de incubação estendeu-se para 60 min. Os métodos de extração do DNA pelo fenol / clorofórmio / álcool isoamílico e pela sílica / tiocianato de guanidina foram, respectivamente, realizados de acordo com Sambrook, Fritsch, Maniatis (1989) e Boom et al. (1990). A extração do DNA empregando DNAzol® foi realizada segundo as instruções do fabricante. A associação dos métodos fenol / clorofórmio / álcool isoamílico e sílica / tiocianato de guanidina foi utilizada de acordo com Alfieri (1999) com modificações. Após a adição do tampão de lise as amostras foram tratadas com igual volume de fenol / clorofórmio / álcool isoamílico (25:24:1), agitadas em vórtex e novamente aquecidas em banho-maria a 56 °C/15 min. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 10.000 x g/10 min e a fase aquosa foi então processada em sílica / tiocianato de guanidina, de acordo com Boom et al. (1990). Ao final, o DNA foi eluído em 50 µL de água ultra pura autoclavada e mantido a -20 °C até o uso. Em todos os procedimentos de extração do DNA foram incluídas alíquotas de água ultra pura autoclavada como controle negativo e a estirpe LA do BHV-1 como controle positivo.

Oligonucleotídeos Iniciadores (Primers)

Nos experimentos de otimização da PCR foram testados quatro *primers* denominados: P3 *sense* (5'GCTGTGGGAAGCGGTACG3' nt.351-368), P4 *anti-sense* (5'GTCTGACTATGGCCTTGTGTGC3'

nt.817-796), P5 *sense* (5'ACGGTCATATGGTACAAGGACAGCG3' nt.394-422) e P6 *anti-sense* (5'CCAAAGGTGTACCCGCGAGCC3' nt.716-696). Esses *primers* foram desenhados a partir da sequência do gene que codifica a glicoproteína D (gD) do envelope do BHV-1 (WIEDMANN et al., 1993). Para a primeira reação foram empregados os *primers* externos P3 e P4. Para a segunda amplificação foram testados os *primers* internos P5 e P6 (*Nested-PCR*) bem como outras duas combinações entre *primers* externos e internos (P3/P6 e P4/P5) utilizados em reação de *Semi Nested-PCR*.

PCR

A PCR foi realizada em uma solução contendo 5 µL de DNA e 45 µL de PCR-MIX constituído por 20 pmol de cada *primer* (P3/P4), 1,6 mM de dNTP (Life Technologies), 2,5 unidades de *Taq* DNA polimerase Recombinante (Life Technologies), 1 x PCR buffer (20 mM Tris HCl pH 8,4 e 50 mM KCl) e água ultra pura autoclavada para o volume final de 50 µL. Diferentes concentrações de MgCl₂, variando de 1,5 a 3,0 mM, e a adição ou não de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma Co., EUA) a 8% no PCR-MIX, foram avaliadas nos experimentos de otimização da técnica. As amostras de DNA foram pré-desnaturadas a 98°C durante 7 min e mantidas em banho de gelo até a adição dos reagentes. O processo de amplificação foi realizado em termociclador (MJ Research Co. Water Town, MA, EUA) com as seguintes condições de tempo e temperatura: i) uma etapa de 4 min/94°C; ii) 40 ciclos de 1 min/94°C (desnaturação), 1 min/60°C (anelamento) e 1 min/72°C (extensão); iii) uma etapa de extensão final de 7 min/72°C.

N-PCR e SN-PCR

Do produto da primeira amplificação foram utilizados 3µL para as reações de N-PCR (*primers* P5/P6) e de SN-PCR (*primers* P3/P6 ou P4/P5). Todas as reações foram realizadas em 30 ciclos com as mesmas concentrações de reagentes e condições de tempo e temperatura da PCR.

Análise dos Produtos da PCR e da SN-PCR

Alíquotas de 10 µL dos produtos da PCR, da N-PCR e da SN-PCR foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão TBE pH 8,4 (Tris 89 mM; ácido bórico 89 mM; EDTA 2mM), sob voltagem constante (90V) durante aproximadamente 45 min. O gel foi corado em uma solução contendo brometo de etídio (0,5 mg/mL) e visualizado sob luz ultravioleta (UV).

Avaliação da Sensibilidade

Após a determinação do melhor método de extração do DNA, da melhor associação de *primers*, e da concentração ideal de todos os reagentes, foi avaliada a sensibilidade da SN-PCR. Para isto foi utilizado sobrenadante de cultura de células MDBK infectadas com a estirpe LA do BHV-1 com título de 10^6 TCID₅₀ / 100 µL. A partir de uma alíquota do vírus foram realizadas diluições seriadas na base 10 em solução de PBS, obtendo-se alíquotas de 500 µL contendo de 10^4 TCID₅₀ a 0,01 TCID₅₀. Para as amostras de sêmen bovino a sensibilidade foi avaliada por meio da inoculação artificial do sêmen, proveniente de um animal soronegativo para o BHV-1, com as mesmas concentrações de vírus descritas anteriormente.

Avaliação da Especificidade

A especificidade, tanto da PCR quanto da SN-PCR, foi avaliada frente a: i) células MDBK; ii) estirpe NADL do BVDV; iii) amostras de sêmen bovino livre do BHV-1; iv) herpesvírus simplex tipo 1; v) cinco sorovares de leptospiros; vi) suspensão de fragmentos de órgãos provenientes de feto bovino soronegativo (SN/ELISA) para o BHV-1.

Perfil de Restrição

A confirmação do produto amplificado na SN-PCR foi obtida pela análise do perfil de restrição com a enzima *Bgl* I (Life Technologies®), utilizada de acordo com as instruções do fabricante. Os fragmentos gerados pela clivagem enzimática foram analisados por meio da eletroforese em gel de agarose a 2%, corado em solução contendo brometo de etídio (0,5 mg/mL) e visualizados sob luz UV.

Resultados

Extração do DNA

O método fenol / clorofórmio / álcool isoamílico foi o único a não fornecer DNA em quantidade suficiente para a amplificação e visualização em gel de agarose. A associação dos métodos fenol / clorofórmio/ álcool isoamílico e sílica / tiocianato de guanidina mostrou ser a mais adequada, gerando produtos com tamanho molecular esperado, de forte intensidade e ausência de produtos inespecíficos ou de sinais de degradação do ácido nucléico. Os métodos empregando o DNazol e a sílica / tiocianato de guanidina (BOOM et al., 1990), de forma isolada, também foram eficientes na amplificação do controle positivo, porém, apresentaram limite inferior de detecção do vírus.

PCR, N-PCR e SN-PCR

De todas as associações de *primers* testadas, a que possibilitou a amplificação de produto em maior concentração e com ausência de bandas extras, foi a que utilizou os *primers* P3/P4 e P4/P5, para a primeira (PCR) e a segunda (SN-PCR) amplificação, respectivamente. Os resultados da otimização da técnica quanto à concentração de reagentes, especificidade, sensibilidade e a detecção do BHV-1 em material biológico foram obtidos após a seleção dessa associação de *primers*. A concentração ótima de MgCl₂ foi obtida nas reações contendo 1,5 mM e a adição de 8% de DMSO aumentou consideravelmente a sensibilidade da técnica.

Sensibilidade

A SN-PCR, quando realizada em sobrenadante de cultivo celular (MDBK) infectado com a estirpe LA do BHV-1, apresentou limite de detecção de 1 TCID₅₀/100 µL (Figura 1).

Em sêmen bovino, artificialmente contaminado, o BHV-1 foi detectado até o título de 0,1 TCID₅₀/100 µL (Figura 2).

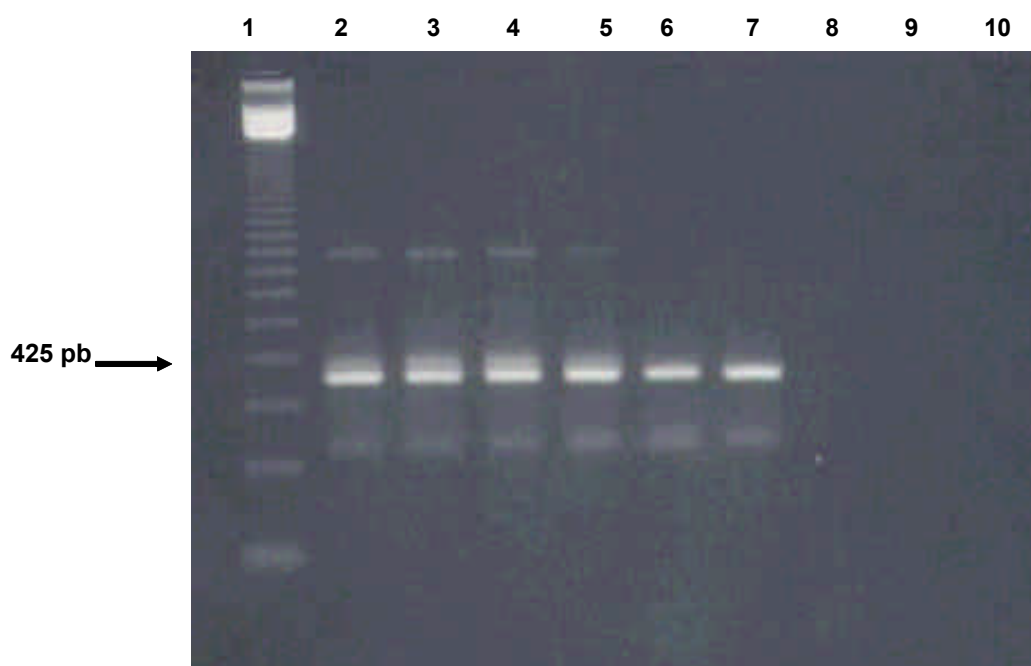


Figura 1. Avaliação da sensibilidade da *Semi Nested-PCR* (SN-PCR) na detecção do gene da glicoproteína D do herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1), realizada em sobrenadante de cultura de células MDBK infectadas com a estirpe Los Angeles. Canaleta 1: Marcador de tamanho molecular 123 pb (Life Technologies®); Canaletas 2 a 8: Títulos decrescentes do BHV-1 correspondentes a 10^5 ; 10^4 ; 10^3 ; 10^2 ; 10 ; 1 e 0,1 TCID₅₀/100 µL, respectivamente; Canaletas 9 e 10: Controles negativos da SN-PCR e da extração de ácido nucléico, respectivamente.

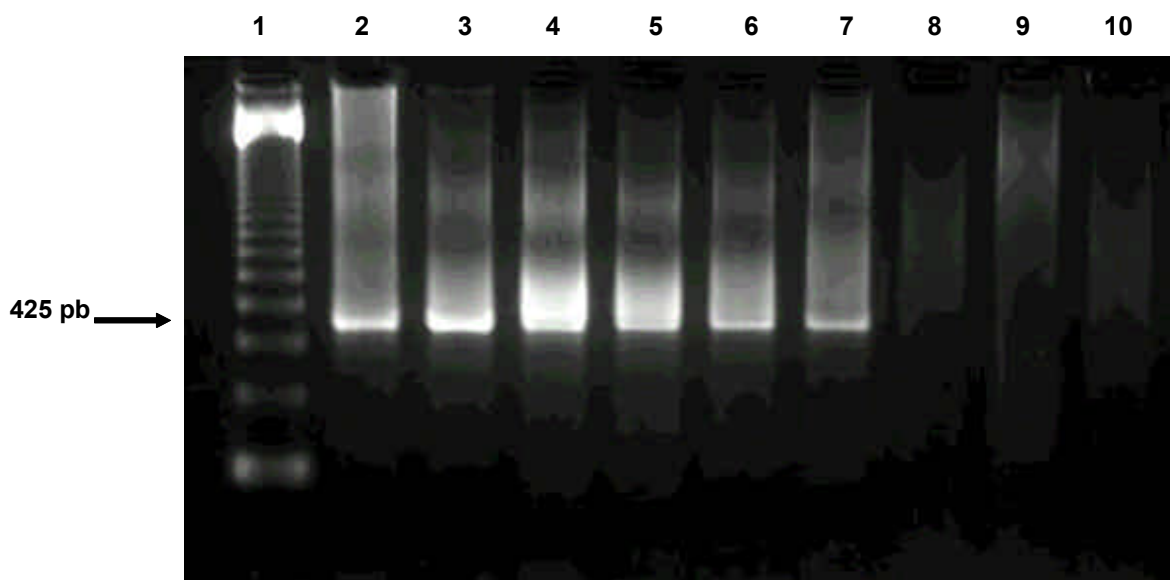


Figura 2. Avaliação da sensibilidade da *Semi Nested-PCR* (SN-PCR) na detecção do gene da glicoproteína D do herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1), realizada em sêmen bovino artificialmente contaminado com a estirpe Los Angeles. Canaleta 1: Marcador de tamanho molecular 123 pb (Life Technologies®); Canaletas 2 a 8: Títulos decrescentes do BHV-1 correspondentes a 10^4 ; 10^3 ; 10^2 ; 10 ; 1; 0,1; 0,01 TCID₅₀/100 µL, respectivamente; Canaleta 9: Sêmen bovino livre do BHV-1 (controle negativo); Canaleta 10: Controle negativo da extração de ácido nucléico.

Especificidade

Nenhum produto foi amplificado quando a SN-PCR foi testada frente aos materiais biológicos

(células MDBK, estirpes virais, bactérias, amostras clínicas) utilizados para avaliar a especificidade da técnica (Figura 3).

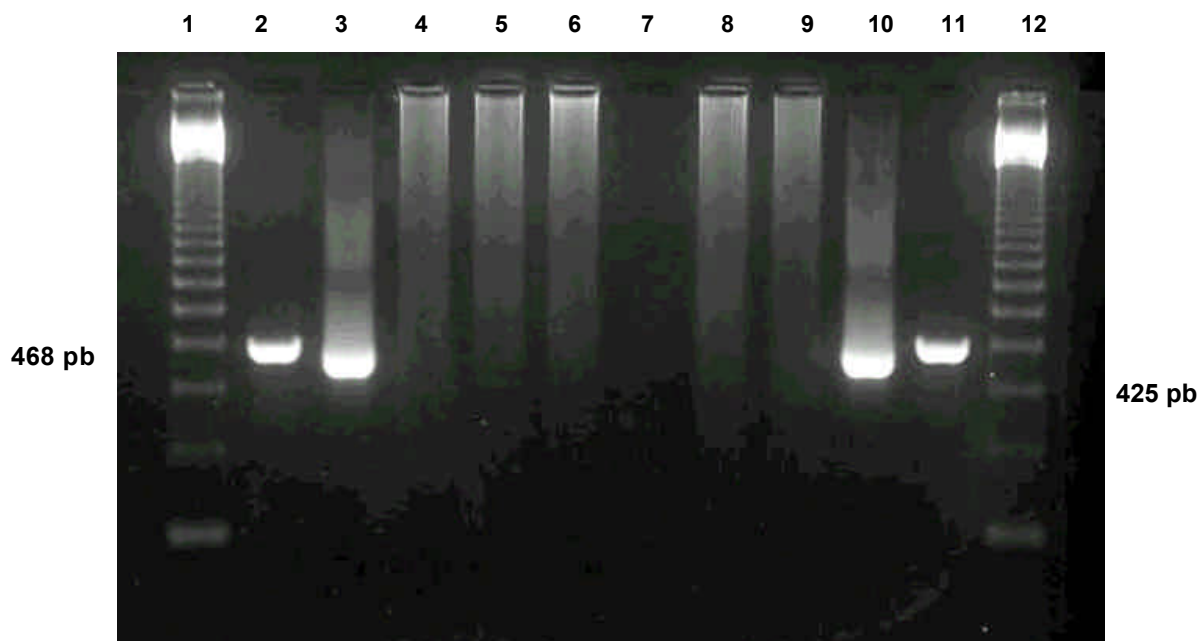


Figura 3. Avaliação da especificidade da *Semi Nested-PCR* (SN-PCR) para a detecção do gene da glicoproteína D do herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1). Canaletas 1 e 12: Marcador de tamanho molecular 123 pb(Life Technologies®); Canaletas 2 e 11: Estirpe Los Angeles do BHV-1 / PCR; Canaletas 3 e 10: Estirpe Los Angeles do BHV-1 / SN-PCR; Canaleta 4: Suspensão de células MDBK não infectadas; Canaleta 5: Estirpe NADL do vírus da diarreia viral bovina (BVDV); Canaleta 6: Herpesvírus simplex tipo 1; Canaletas 7 e 8: Fragmento de rim de feto bovino (canaleta 7) e sêmen bovino (canaleta 8) negativos, por isolamento viral, para o BHV-1; Canaleta 9: Controle negativo da extração do ácido nucléico.

Detecção do BHV-1 em Amostras Biológicas

Fragmentos de Órgãos de Fetos Abortados

O BHV-1 foi detectado pela SN-PCR em fragmentos de órgãos de quatro fetos (Figura 4).

Em três desses fetos também foi possível o isolamento do BHV-1 em cultivo de células MDBK. A confirmação do isolamento foi obtida por meio da visualização de efeito citopático e posterior caracterização por vírus-neutralização e

imunofluorescência. Tanto a SN-PCR quanto a tentativa de isolamento viral, realizadas nos fragmentos de órgãos do feto obtido em frigorífico, resultaram negativas.

Sêmen de Animais Naturalmente Infectados

O BHV-1 foi detectado pela SN-PCR em uma das cinco amostras de sêmen avaliadas neste estudo (Figura 5).

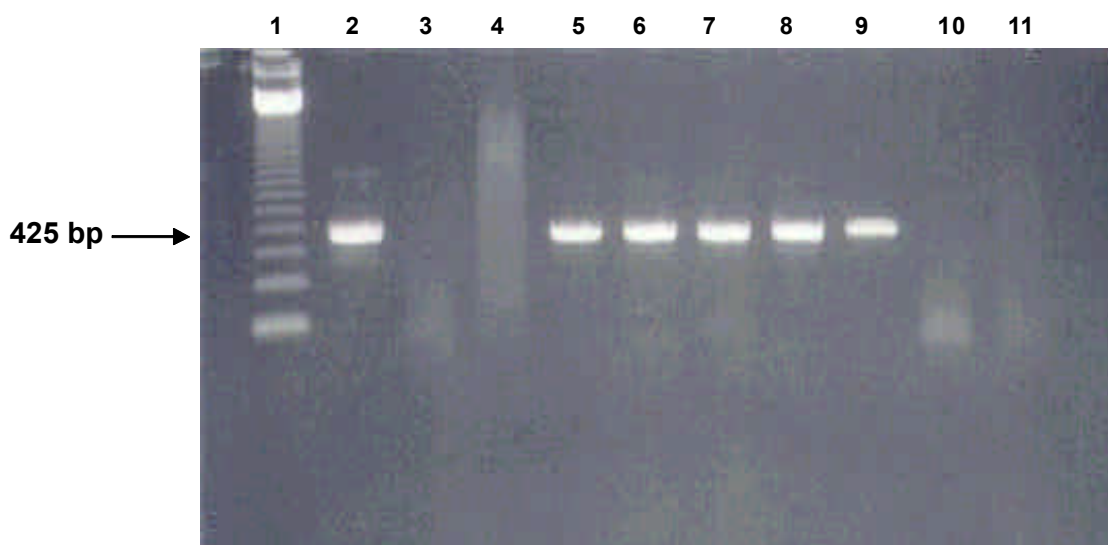


Figura 4. Detecção, por *Semi Nested-PCR* (SN-PCR), do gene da glicoproteína D do herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1) em fragmentos de órgãos de fetos bovinos abortados. Canaleta 1: Marcador de tamanho molecular 123 pb (Life Technologies®); Canaleta 2: Controle positivo (estirpe Los Angeles do BHV-1); Canaleta 3: Rim de feto bovino (negativo para o BHV-1 por isolamento viral) obtido em frigorífico; Canaletas 4 a 9: Fragmentos de órgãos de fetos bovinos abortados: rim/aborto 204 (canaleta 4); fígado/aborto 171 (canaleta 5); pulmão/aborto 187 (canaleta 6); baço/aborto 210 (canaleta 7); pulmão/aborto 233 (canaleta 8) e fígado/aborto 233 (canaleta 9); Canaletas 10 e 11: Controles negativos da extração do ácido nucléico e da SN-PCR, respectivamente.

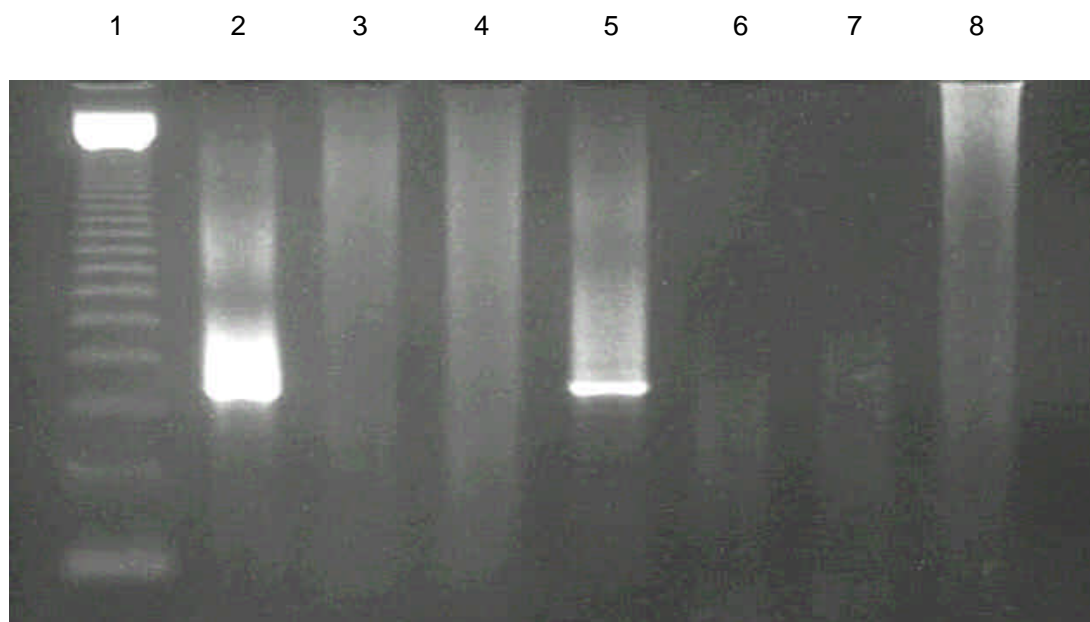


Figura 5. Detecção, por *Semi Nested-PCR* (SN-PCR), do gene da glicoproteína D do herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1) em sêmen bovino naturalmente contaminado. Canaleta 1: Marcador de tamanho molecular 123 pb (Life Technologies®); Canaleta 2: Controle positivo (estirpe Los Angeles do BHV-1); Canaletas 3 a 7: Amostras de sêmen bovino (UEL 1 a 5) provenientes de animais soropositivos, por soroneutralização e ELISA, para o BHV-1; Canaleta 8: Controle negativo da extração do ácido nucléico.

Perfil de Restrição

Após a digestão com a enzima *Bgl*I os produtos de DNA, com 425 pb, amplificados pela SN-PCR a partir da estirpe LA do BHV-1, de fragmentos de

órgãos de fetos abortados e de sêmen bovino, geraram dois fragmentos de DNA com tamanho molecular estimado de 190 pb e 235 pb (Figura 6).

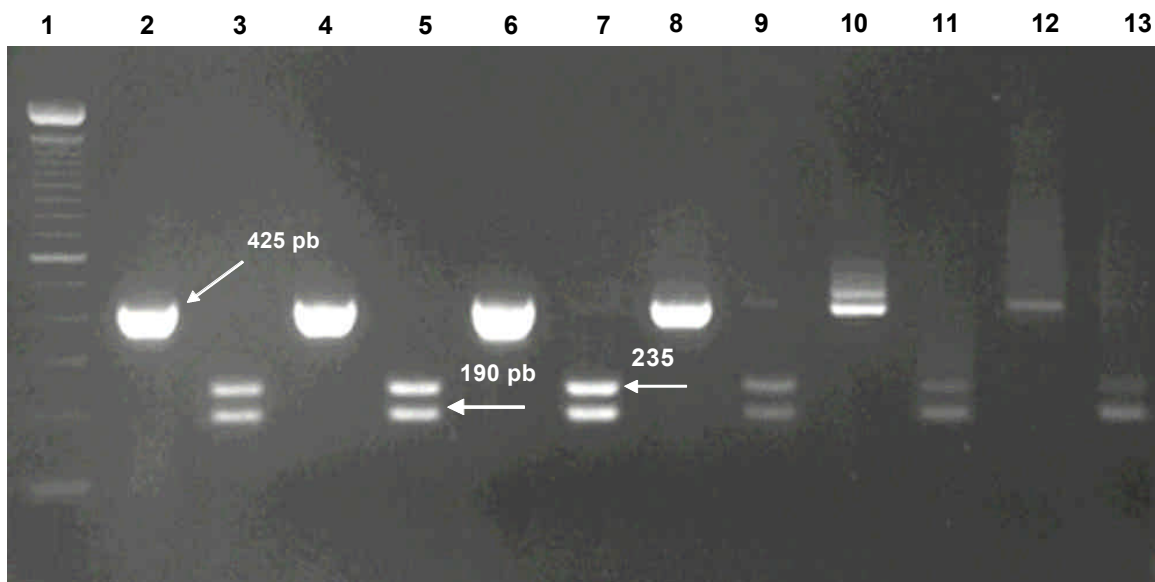


Figura 6. Análise do perfil de restrição, com a enzima *Bgl*I, dos produtos da *Semi Nested-PCR* (SN-PCR), referente a amplificação parcial do gene da glicoproteína D do herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1). Canaleta 1: Marcador de tamanho molecular 100 pb (Life Technologies®); Canaletas 2 e 3: Estirpe Los Angeles do BHV-1. Produto não clivado (425 pb) e clivado (235 e 190 pb), respectivamente; Canaletas 4 a 13: Produtos não clivados (canaletas pares) e clivados (canaletas ímpares) referentes aos abortos bovinos 171/rim, 210/baço, 233/pulmão, 204/rim e sêmen de bovino naturalmente infectado (UEL 3), respectivamente.

Discussão

A SN-PCR otimizada neste estudo mostrou-se uma alternativa viável para o diagnóstico etiológico do BHV-1. Os resultados obtidos foram favorecidos pela seleção do método de obtenção do DNA. Foram testados quatro métodos optando-se ao final por empregar a associação de dois deles: i) fenol / clorofórmio / álcool isoamílico para a remoção de proteínas celulares contaminantes e outras macromoléculas; ii) subsequente purificação das moléculas de DNA em matriz de sílica. Essa associação de dois métodos de extração de ácido nucléico, para amplificação pela PCR, também mostrou-se a mais adequada para a extração de RNA dupla fita de rotavírus a partir de fezes de leitões

e bezerros com diarreia (ALFIERI et al., 2003; BARREIRO et al., 2003).

A possibilidade de contaminação entre as amostras durante o processo de extração do DNA não deve ser excluída e a probabilidade de gerar resultados falso-positivos aumenta quando se aplica técnicas tão sensíveis quanto a PCR e a SN-PCR. Para minimizar esse inconveniente, controles negativos da extração do DNA, da PCR e da SN-PCR, constituídos por água ultra pura autoclavada, foram incluídos e processados em todas as análises.

A partir do estabelecimento do método de extração do ácido nucléico foram testadas várias combinações de *primers* que amplificam uma região genômica altamente conservada da glicoproteína gD

do envelope viral, descritos por Wiedmann et al. (1993). Resultados inconsistentes foram obtidos quando tentou-se reproduzir a metodologia proposta por esses autores que descreveram a adição simultânea dos *primers* externos (P3/P4) e internos (P5/P6) na mesma reação. Posteriormente, com o desmembramento da técnica em duas etapas de amplificação foi possível a obtenção de produtos específicos com tamanhos estimados de 468 pb e 425 pb, referentes à primeira (PCR) e segunda amplificação (SN-PCR), respectivamente, a partir do DNA extraído do sobrenadante de cultivo de células MDBK infectadas com o protótipo LA do BHV-1.

A primeira amplificação foi padronizada utilizando os *primers* externos P3/P4, que geram um produto de 468 pb. Na segunda amplificação, além de testar os *primers* internos (P5/P6) originalmente descritos por Wiedmann et al. (1993), também foram adaptadas e testadas outras duas combinações possíveis dos mesmos *primers* (P3/P6 e P4/P5). A visualização de bandas com 425 pb, com forte intensidade em gel de agarose contendo brometo de etídio e a ausência de rastros e/ou produtos inespecíficos foi fundamental para a seleção, na segunda etapa de amplificação, dos *primers* P4/P5 como os mais apropriados para a continuidade dos experimentos.

Ainda nos procedimentos de otimização da SN-PCR foram testadas diferentes concentrações de cloreto de magnésio e o uso de DMSO nas reações. A concentração ótima de $MgCl_2$ foi de 1,5 mM. Acima desta concentração eram produzidos rastros que dificultaram a visualização das bandas. O efeito benéfico do DMSO na reação pode ser explicado pela alta quantidade de ligações G-C na região alvo selecionada (64%). O uso desse reagente promove a desestabilização da fita dupla de DNA, facilitando o anelamento dos *primers* (MASOUD; JOHNSON; WHITE, 1992).

A SN-PCR possibilitou a detecção do BHV-1 presente em sobrenadante de cultivo celular e em sêmen artificialmente contaminado em títulos de, respectivamente, 1 e 0,1 TCID₅₀/100 µL (Figs.1 e

2). Esse limite de detecção foi muito superior ao descrito por Wiedmann et al., (1993) que, utilizando os mesmos *primers* em diferentes associações, detectaram 45 TCID₅₀ do BHV-1 em sobrenadante de cultivo celular e 5×10^4 TCID₅₀/0,5 mL em sêmen também artificialmente contaminado. Mesmo em associação à hibridização molecular a N-PCR descrita por Wiedmann et al. (1993) apresentou sensibilidade inferior à SN-PCR otimizada no presente experimento, revelando títulos de 4,5 TCID₅₀ e 5×10^3 TCID₅₀ para vírus adaptado em cultivo de células e sêmen, respectivamente. Provavelmente, o emprego de duas etapas distintas de amplificação; a utilização dos *primers* P4/P5 na segunda amplificação; e o método de extração do DNA, proporcionaram o aumento substancial do limite de detecção obtido no presente estudo.

Vilcek et al. (1994) com uma PCR baseada na amplificação do gene da glicoproteína gB do BHV-1 detectaram o equivalente a 3 fentogramas de DNA purificado em gradiente de cloreto de cézio. Porém, ao utilizarem DNA extraído diretamente do sobrenadante de cultivo celular contendo o BHV-1 em títulos decrescentes somente uma banda muito fraca, equivalente a 0,6 TCID₅₀, pode ser visualizada.

Van Engelenburg et al. (1993) detectaram três a cinco moléculas de DNA em 50 µL de sêmen e 0,05 TCID₅₀ do BHV-1 em cultivo de células. Contudo, o protocolo de purificação do DNA proposto por estes autores é extremamente sofisticado e envolve múltiplas etapas, o que sem dúvida inviabiliza o uso da técnica como rotina de diagnóstico, bem como, a análise simultânea de um grande número de amostras biológicas.

A SN-PCR otimizada no presente estudo proporcionou resultados satisfatórios de sensibilidade sem o emprego de qualquer recurso mais sofisticado de purificação do DNA ou métodos de ultracentrifugação para a concentração viral.

Para a avaliação da especificidade da SN-PCR o produto amplificado, de 425 pb, foi clivado com enzima de restrição. De acordo com a sequência do gene da glicoproteína D do BHV-1, disponível no

GenBank (nº de acesso M59846), foi selecionada a enzima *Bgl I* que cliva o *amplicon* em apenas um sítio, gerando dois fragmentos com 190 pb e 235 pb. Tanto a estirpe LA do BHV-1 quanto as amostras biológicas positivas, provenientes de fetos e de sêmen bovino, mostraram o mesmo padrão de restrição, confirmando a especificidade do fragmento de 425 pb (Figura 6).

A diluição (1:10) do sêmen em solução de PBS foi essencial para reduzir inibidores presentes na amostra, e que podem interferir no processo de amplificação genômica (WILSON, 1997). Procedimento semelhante também foi empregado por Xia et al. (1995), Masri et al. (1996) e Zhou et al. (1999) que obtiveram limites de detecção do BHV-1 em sêmen na ordem de, respectivamente, 0,2 TCID₅₀/100µL, 0,25 a 2,5 TCID₅₀/0,5 µL e 0,28 TCID₅₀/100 µL.

Wieddmann et al. (1993), Rocha et al. (1998), Moore, Gunn e Walls (2000), propuseram a centrifugação das amostras de sêmen antes do início da extração do DNA. Considerando que aproximadamente 90% das partículas do BHV-1 são encontradas na fração do plasma seminal (VAN ENGELBURG et al., 1993), este procedimento melhora o desempenho da técnica na medida em que são eliminados potenciais inibidores da PCR.

A sensibilidade da SN-PCR em amostras de sêmen foi determinada a partir de amostras contaminadas artificialmente. Este processo pode ser considerado um bom modelo simulado para situações de infecção natural, uma vez que o sêmen é contaminado durante a ejaculação, quando da passagem pela mucosa infectada, resultando em vírus livre no plasma seminal (KAHRS, 1977; STRAUB, 1991). O limite de detecção de 0,1 TCID₅₀/100 µL em sêmen (Figura 2) demonstra que a SN-PCR otimizada neste estudo pode ser uma alternativa viável para a avaliação da qualidade sanitária do sêmen bovino utilizado em programas de inseminação artificial.

O BHV-1 foi também detectado em sêmen proveniente de animal naturalmente infectado. Das

cinco amostras testadas esse vírus foi identificado em uma delas, proveniente de um touro com 21 meses de idade, e com título 32 para anticorpos neutralizantes do BHV-1. As outras quatro amostras, também obtidas de touros soropositivos para o BHV-1, foram negativas na SN-PCR. É provável que esses animais estariam albergando o vírus em estado de latência, o que justifica a ausência do BHV-1 no plasma seminal (Fig.5).

A utilização da PCR em amostras de sêmen naturalmente infectadas também foi realizada com sucesso por Gee, Wagter e Hage (1996) e Rocha et al. (1998). Ambos identificaram o BHV-1 em sêmen, na fase subclínica da doença, antes mesmo do aparecimento de anticorpos anti-BHV-1 detectáveis por procedimentos sorológicos tradicionais. Masri et al. (1996) e Van Engelenburg et al. (1995) demonstraram que a PCR pode detectar o BHV-1 por mais tempo no sêmen, após inoculação experimental em bovinos, quando comparada à técnica de isolamento viral.

Mweene, Okazaki e Kida (1996) e Santurde et al. (1996) descreveram a detecção do BHV-1 em tecidos de animais inoculados experimentalmente. Porém, no presente trabalho foram incluídos apenas material biológico proveniente de abortamentos ocorridos de forma espontânea.

Nos dez casos de aborto bovino avaliados foi possível a amplificação de um produto de 425 pb, referente à gD do BHV-1, em amostras de fragmentos de órgãos como pulmão, fígado, rim e baço de quatro fetos. Entretanto, devido ao número de fetos abortados estudados, não foi possível avaliar em qual órgão a presença do vírus foi mais freqüente. Simultaneamente, essas amostras também foram inoculadas em cultivo de células MDBK. Após três passagens sucessivas, o isolamento viral foi confirmado por meio de vírus-neutralização e imunofluorescência em material biológico proveniente de três fetos. Um feto foi positivo na SN-PCR e negativo no isolamento viral. Na necrópsia fetal foram observadas lesões de caráter necrótico-hemorrágicas

em fígado, baço e rim sugestivas de abortamento por IBR. O resultado negativo no isolamento viral pode ter sido devido à presença do BHV-1 em uma forma não infecciosa. Como a SN-PCR não exige a viabilidade da partícula viral, o DNA do BHV-1 pode ser amplificado. Este resultado ratifica a importância da utilização de metodologias alternativas ao isolamento viral, como a PCR, em estudos sobre o envolvimento do BHV-1 na etiologia de abortos bovinos. Fragmentos de órgãos de seis fetos foram negativos na SN-PCR. Contudo, este resultado não deve ser interpretado como um diagnóstico falso-negativo, uma vez que outras etiologias de aborto bovino não foram avaliadas.

Comparada com outros métodos de diagnóstico direto, tais como isolamento viral, imunofluorescência e técnicas de hibridização do ácido nucléico, a PCR tem confirmado a sua superioridade quanto a sensibilidade, rapidez e especificidade (VILCEK et al., 1994; VAN ENGELENBURG et al., 1995; MOORE; GUNN; WALLS, 2000). A SN-PCR descrita neste estudo pode ser facilmente aplicada nas condições de rotina de diagnóstico rápido da infecção ocasionada pelo BHV-1 em rebanhos bovinos, além de apresentar-se como uma alternativa viável para controlar a disseminação pelo sêmen, desse importante patógeno viral.

Referências

- ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F.; MÉDICI, K. C. Conseqüências da infecção pelo herpesvírus bovino tipo 1 sobre o sistema reprodutivo de bovinos. *Semina*, Londrina, v.19, n.1, p.86-93, 1998.
- ALFIERI, A. F. *Caracterização dos genótipos G (VP7) e P (VP4) de rotavírus grupo A de origem animal (bovina e suína) e humana pela reação em cadeia pela polimerase (Multiplex RT-PCR)*. 1999. Tese (Doutorado) -Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo (USP), São Paulo.
- ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A.; BARREIRO, M. A. B.; LEITE, J. P. G.; RICHTZENHAIN, L. J. G and P genotypes of group A bovine rotavirus strains circulating in Brazil. *Veterinary Microbiology*, England, 2003. (no prelo),
- BABIUK, L. A.; HURK, S. D. L.; TIKOO, S. K. Immunology of bovine herpesvirus 1 infection. Special issue: Infectious Bovine Rhinotracheitis and other ruminant herpesvirus infections. *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, v.53, p.31-42, 1996.
- BARREIRO, M. A. B.; ALFIERI, A. A.; MÉDICI, K. C.; ALFIERI, A. F.; LEITE, J. P. G. An outbreak of diarrhoea on one-week-old piglets caused by group A rotavirus genotype P[7],G3 and P[7],G5. *Veterinary Research Communications*, Dordrecht, v.27, n.6, p.505-512, 2003.
- BÉLAK, S.; BALLAGI-PORDÁNY, A. Application of the polymerase chain reaction (PCR) in veterinary diagnostic virology. *Veterinary Research Communications*, Dordrecht, v.17, p.55-72, 1993.
- BOOM, R.; SOL, C. J. A.; SALIMANS, M. M. M.; JANSEN, C. L.; WERTHEIM-VAN DILLEN, P. M. E.; VAN DER NOORDAA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v.28, n.3, p.495-503, 1990.
- BRITSCH, V. The modification of the infectious bovine rhinotracheitis virus serum neutralization test. *Acta Veterinaria Scandinavica*, Vanlose, v.19, p.497-505, 1978.
- CORTEZ, A.; HEINEMANN, M. B.; ALFIERI, A. A.; MÉDICI, K. C.; ALFIERI, A. F.; OLIVEIRA, D. B.; MEYER, A. D.; RICHTZENHAIN, L. J. Comparação das técnicas de ELISA indireto e de soroneutralização na detecção de anticorpos contra o BHV-1 em amostras de soro de bubalino (*bubalus bubalis*). *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, São Paulo, v.38, p.3, p.146-148, 2001.
- EDWARDS, S.; CHASEY, D.; WHITE, H. Experimental infectious bovine rhinotracheitis: comparison of four antigen detection methods. *Research in Veterinary Science*, London, v.34, p.42-45, 1983.
- GEE, A. L. W.; WAGTER, L. H. A.; HAGE, J. J. The use of polymerase chain reaction assay for the detection of bovine herpesvirus 1 in semen during a natural outbreak of infectious bovine rhinotracheitis. *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, v.53, p.163-168, 1996.
- KAHRS, R. F. Infectious Bovine Rhinotracheitis: A review and update. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, Schaumburg, v.171, n.10, p.1055-1064, 1977.
- KATARIA, R. S.; TIWARI, A. K.; GUPTA, P. K.; MEHROTRA, M. L.; RAI, A.; BANDYOPADHYAY, S. K. Detection of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) genomic sequences in bovine semen inoculated with BHV-1 by polymerase chain reaction. *Acta Virologica*, Bratislava, v.41, p.311-315, 1997.

- KIRKBRIDE, C. A. Managin and outbreak of livestock abortion 2: diagnosis and control of bovine abortion. *Veterinary Medicine*, Lenexa, v.80, n.5, p.70-79, 1985.
- KIRKBRIDE, C. A. Etiologic agents in a 10 year study of bovine abortions and stillbirths. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, Columbia, v.4, n.2, p.160-175, 1992.
- LARSON B. L. Diagnosing the cause of bovine abortions and other perinatal deaths. *Veterinary Medicine*, Lenexa, v.81, p.478-486, 1996.
- MASOUD, S. A.; JOHNSON, L. B.; WHITE, F. F. The sequence within two primers influences the optimum concentration of dimethyl sulfoxide in the PCR. *PCR Methods Applications*, v.2, p.89-90, 1992.
- MASRI, S. A.; OLSON, W.; NGUYEN, P. T.; PRINS, S.; DEREGT, D. Rapid detection of bovine herpesvirus 1 in the semen of infected bulls by a nested polymerase chain reaction assay. *Canadian Journal Veterinary Research*, Ottawa, v.60, p.100-107, 1996.
- 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. A.; ALFIERI, A. F. Avaliação de um ensaio imunoenzimático comercial no diagnóstico sorológico da infecção pelo herpesvírus bovino tipo 1. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.30, n.2, p.343-346, 2000a.
- MÉDICI, K. C.; ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F. Prevalência de anticorpos neutralizantes contra o herpesvírus bovino tipo 1, decorrente de infecção natural, em rebanhos com distúrbios reprodutivos. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.30, n.2, p.347-350, 2000b.
- MOORE, S.; GUNN, M.; WALLS, D. A rapid and sensitive PCR-based diagnostic assay to detect bovine herpesvirus 1 in routine diagnostic submissions. *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, v.75, p.145-153, 2000.
- MWEENE, A. S.; OKAZAKI, K.; KIDA, H. Detection of viral genome in non-neural tissues of cattle experimentally infected with bovine herpesvirus 1. *Japanese Journal of Veterinary Research*, Sapporo, v.44, n.3, p.165-174, 1996.
- OKANO, W.; BRACARENSE, A. P. F. R. L.; REIS, A. C. F. ALFIERI, A. A. Achados histopatológicos em fetos bovinos abortados e não abortados. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v.55, n.2, p.223-225, 2003.
- RICHTZENHAIN, L. J.; ALFIERI, A. A.; LEITE, R. C.; WEIBLEN, R.; MORO, E.; UMEHARA, O. Pesquisa de anticorpos séricos contra o herpesvírus bovino tipo 1 em fêmeas bovinas de propriedades com histórico de problemas reprodutivos, localizadas em 21 estados brasileiros. *Arquivos de Instituto Biológico*, São Paulo, v.66, p.127, 1999. (supl.)
- 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. *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, v.63, p.1-11, 1998.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2.ed. New York: Cold Spring Harbor, 1989.
- SANCHES, A. W. D.; LANGOHR, I. M.; STIGGER, A. L.; BARROS, C. S. L. Doenças do sistema nervoso central em bovinos no Sul do Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira, Seropedica*, v.20, n.3, p.113-118, 2000.
- SANTURDE, G.; SILVA da, N.; VILLARES, R.; TABARÉS, E.; SOLANA, A.; BAUTISTA, J. M.; CASTRO, J. M. Rapid and high sensitivity test for direct detection of bovine herpesvirus-1 genome in clinical samples. *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, v.49, p.81-92, 1996.
- STRAUB, O. C. BHV-1 Infectious: Relevance and spread in Europe. *Compendium in Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, Oxford, v.14, n.2, p.175-186, 1991.
- TAKIUCHI, E.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Herpesvírus bovino tipo 1: Tópicos sobre a infecção e métodos de diagnóstico. *Semina*, Londrina, v. 22, n.2, p.203-209, 2001.
- VAN ENGELENBURG, F. A. C.; MAES, R. K.; VAN OIRSCHOT, J. T.; RIJSEWIJK, F. A. M. Development of a rapid and sensitive polymerase chain reaction assay for detection of bovine herpesvirus type 1 in bovine semen. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v.31, n.12, p.3129-3135, 1993.
- VAN ENGELENBURG, F. A. C.; VAN SCHIE, F. W.; RIJSEWIJK, F. A. M.; VAN OIRSCHOT, J. T. Excretion of bovine herpesvirus 1 in semen is detected much longer by PCR than virus isolation. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v.33, n.2, p.308-312, 1995.
- VILCEK, S.; NETTLETON, P. F.; HERRING, J. A.; HERRING, A. J. Rapid detection of bovine herpesvirus 1 (BHV 1) using the polymerase chain reaction. *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, v.42, p.53-64, 1994.
- WIEDMANN, M.; BRANDON, R.; WAGNER, P.; DUBOVI, E. J.; BATT, C. A. Detection of bovine herpesvirus-1 in bovine semen by a nested PCR assay. *Journal of Virological Methods*, Amsterdam, v.44, p.129-140, 1993.

WILSON, I. G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.63, n.10, p.3741-3751,1997.

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

XIA, J. Q.; LOFSTEDT, R. M.; YASON, C. V.; KIBENGE, F. S. B. Detection of bovine herpesvirus 1 in the semen of

experimentally infected bulls by dot-blot hybridisation, polymerase chain reaction and virus isolation. *Research in Veterinary Science*, London, v.59, p.183-185, 1995.

ZHOU, J.; LYAKU, J.; FREDRICKSON, R. A.; KIBENGE, F. S. B. Improved detection of bovine herpesvirus 1 in artificially infected bovine semen by protein amplification. *Journal of Virological Methods*, Amsterdam, v.79, p.181-189, 1999.