



## DETECÇÃO DE GAMAHERPESVÍRUS EM EQUINOS ASSINTOMÁTICOS NO BRASIL

Dall Agnol, A.M.<sup>1</sup>; Beuttemmuller, E.A.<sup>1</sup>; Pilz, D.<sup>1</sup>; Oliveira, M.V.<sup>1</sup>; Suphoronski, S.A.<sup>1</sup>; Possatti, F.<sup>1</sup>; Curti, P.A.C.<sup>1</sup>; Headley, S.A.<sup>1</sup>; Alfieri, A.F.<sup>1</sup>; Alfieri, A.A.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Virologia Animal, Depto. Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil. \*e-mail: [alfieri@uel.br](mailto:alfieri@uel.br)

### Saúde Única

**Palavras-chave:** equinos, gama herpesvírus equídeo, EHV -2 e -5.

### Introdução

Gama herpesvírus equídeo -2 e -5 (EHV-2 e -5) são prevalentes na população equina mundial. A infecção causada pelo EHV-2 ocorre em potros ainda muito jovens, com ocasional reativação dos sinais clínicos durante todo o período da vida do animal já que EHV causa infecção latente. A reativação da infecção é frequentemente subclínica, de modo que equinos de qualquer idade podem atuar como disseminadores assintomáticos desses vírus, transmitindo-os para animais suscetíveis (HARTLEY et al., 2013). Um sítio de latência já reconhecido do EHV-2 são os linfócitos B. EHV-2 pode ser associado a surtos de doença respiratória devido à modulação viral sobre quimiocinas, produzidas pelas células infectadas, que contribui para o aumento da patogenicidade do vírus. EHV-5 é considerado um cofator em infecções mistas, favorecendo o desenvolvimento de infecções ocasionadas por outros patógenos. Esse vírus tem sido associado à ocorrência de uma doença considerada emergente, a fibrose pulmonar multinodular em equinos. Acredita-se que um dos sítios de latência para o EHV-5 sejam as células pulmonares. Ambos os vírus possuem genes que modulam a resposta imune dos hospedeiros, influenciando na apresentação clínica ou subclínica da doença, que evolui de acordo com a imunidade específica desenvolvida contra a cepa infectante. Portanto, a imunidade específica induzida contra cada cepa é responsável por determinar a duração da doença clínica, bem como o tempo de excreção do vírus pelo animal (FORTIER et al., 2010). Apesar da alta prevalência mundial, até o momento nenhum desses vírus foi identificado no rebanho equino brasileiro. O objetivo deste estudo foi avaliar a presença do EHV -2 e -5 em equinos do Brasil.

### Material e Métodos

*Coleta das amostras:* Foram coletados suabes nasais de 26 cavalos adultos, sem sinais clínicos respiratórios evidentes provenientes de dois rebanhos de



propriedades distintas. O rebanho A era composto de animais da raça Appaloosa e estava localizado no Paraná, e o rebanho B possuía animais da raça Crioula e localizava-se no Rio Grande do Sul. No rebanho A foram realizados 18 suabes e no

rebanho B 8 suabes. Todas as amostras foram estocadas em *freezer*  $-80^{\circ}\text{C}$  até o processamento.

*Extração de DNA:* A extração do ácido nucleico foi realizada usando a combinação de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) e sílica/isotiocianato de guanidina, descrita por Alfieri et al. (2006).

*Detecção molecular de agentes respiratórios de equinos:* A detecção de EHV-2 e -5 foi realizada usando a técnica de *nested*-PCR para a amplificação parcial do gene da glicoproteína B (gB), utilizando os *primers* descritos por Wang et al. (2007). Também foi avaliada a presença de DNA de herpesvírus equino -1 e -4 (EVH-1 e -4), também por meio de *nested*-PCR utilizando *primers* recomendados pela OIE (2008) para a amplificação parcial do gene da gB. Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2% com brometo de etídeo e visualizados sob luz UV.

*Sequenciamento e análise filogenética:* Produtos de PCR com melhor qualidade foram purificados com *Pure Link™ Quick Gel Extraction & PCR Purification Combo Kit* (Invitrogen™), quantificados pelo Qubit™ Fluorometer (Invitrogen™), e sequenciados utilizando BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. A identidade das sequências *consensus* foi confirmada em comparação com sequências depositadas em banco público de dados (GenBank).

## Resultados e Discussão

Dos 26 suabes nasais avaliados, 8 (30,8%) foram positivos para o EHV-2 e 16 (61,5%) para o EHV-5. Destes, 4 apresentaram infecção mista com ambos os vírus. Das 18 amostras coletadas no rebanho A 5 (27,8%) foram positivas para EHV-2 e 10 (55,6%) positivas para o EHV-5. Apenas uma amostra foi positiva para ambos os vírus. Dentre as 8 amostras avaliadas provenientes do rebanho B 3 (37,5%) foram positivas para EHV-2 e 6 (75%) para o EHV-5. Três amostras apresentaram infecção mista (Tabela 1). Todos os suabes nasais avaliados neste estudo foram negativos para o EHV -1 e -4.



**Tabela 1** - Amostras de suabes nasais de equinos adultos assintomáticos avaliados por *nested*-PCR para a identificação de DNA de gamaherpesvírus equídeo -2 e -5 em rebanhos brasileiros

Rebanho	Amostras Avaliadas (n)			
	Total	Positivas		
		EHV-2	EHV-5	Infecção Mista
Rebanho A	18	5	10	1
Rebanho B	8	3	6	3
<b>Total</b>	26	8	16	4

Este estudo identificou alta frequência de gamaherpesvírus equídeo em equinos adultos assintomáticos, sendo 61,5% para EHV-5, e 30,7% para EHV-2. Resultados descritos na Austrália de animais assintomáticos relatam maior positividade (56,7%) para o EHV-5 e menor positividade (2,8%) para o EHV-2 (WANG et al., 2007). Por outro lado, no Reino Unido, Nordengrahn e colaboradores (2002) avaliando animais com histórico anual doença respiratória identificaram maior frequência de infecção com o EHV-2 em relação ao EHV-5.

### Conclusão

Esta foi a primeira detecção de gamaherpesvírus em equinos no Brasil. Estes resultados, obtidos de cavalos assintomáticos, sugerem que tanto o EHV-2 quanto o EHV-5 sejam endêmicos em rebanhos equinos brasileiros.

### Suporte financeiro

CAPES, CNPq, FINEP e Fundação Araucária.

### Referências

ALFIERI, A.A.; PARAZZI, M.E.; TAKIUCHI, E.; MÉDICI, K.C.; ALFIERI, A.F. Frequency of group A rotavirus in diarrheic calves in Brazilian cattle herds, 1998-2002. **Tropical Animal Health and Production**, 38: 521-526, 2006.

FORTIER, G., ERCK, E.V., PRONOST, S., LEKEUX, P., THIRY, E. Equine gammaherpesviruses: Pathogenesis, epidemiology and diagnosis. **The Veterinary Journal**, 186:148-156, 2010.

HARTLEY, C.A., DYNON, K.J., MEKURIA, Z.H., EL-HAGE, C.M., HOLLOWAY, S.A., GILKERSON, J.R. Equine gammaherpesviruses: Perfect parasites? **Veterinary Microbiology**, 167: 86-92, 2013.



NORDENGRAHN, A.; MERZA, M.; ROS, C.; LINDHOLM, A.; PÁLFI, V.; HANNANT, D.; BELÁK, S. Prevalence of equine herpesvirus types 2 and 5 in horse populations by using type-specific PCR assays. **Veterinary Research**, 33:251-259, 2002.

OIE. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals OIE. **Manual Chapter 2.5.9 – Equine rhinopneumonitis**. 2008.

WANG, L., RAIDAL, S.L., PIZZIRANI, A., WILCOX, G.E. Detection of respiratory herpesviruses in foals and adult horses determined by nested multiplex PCR. **Veterinary Microbiology**, 121: 18-28, 2007.