

DETECÇÃO MOLECULAR DE HERPESVÍRUS EM EQUINO NA REGIÃO SUL DO RIO GRANDE DO SUL

RAPHAEL BITENCOURT FERNANDES SILVA¹; GABRIEL DA SILVA ZANI²;
AMANDA DE OLIVEIRA BARBOSA³; WELLINGTON DA ROCHA⁴; MARCELO
DE LIMA⁵; GILBERTO D'ÁVILA VARGAS⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – raphaelb130903@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – gzani27@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – barbosa.oamanda@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – wellingtondasilva.ws@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – mdelima.ufpel@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – gdavilavargas@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Os herpesvírus, pertencentes à família *Herpesviridae*, tem morfologia descrita como icosaédrica e envelopada, com circunferência variando de 120 a 300 nm. O genoma viral é composto por moléculas de DNA lineares em fita dupla, com tamanho de 125 a 235 Kb contendo mais de 70 genes (O'CALLAGHAN, 1983). Os herpesvírus são frequentemente detectados na população de animais, desde selvagens até domésticos, tendo uma vasta gama de hospedeiros de acordo com as distintas espécies de vírus (FLORES, 2007). Além disso, destaca-se o potencial para estabelecer latência, cujo hospedeiro uma vez infectado torna-se portador do agente mesmo após cessão dos sinais clínicos. Nesta instância, os Herpesvírus localizam-se inativos e com ausência de replicação gênica (VAN CLEEMPUT, et al. 2019).

Dentre os animais acometidos, os equinos podem sofrer infecções por diversos vírus da família *Herpesviridae*, sendo eles *Equid herpesvirus* (EHV-1, EHV-3, EHV-4, EHV-6, EHV-8 e EHV-9) classificados sob o gênero *Varicellovirus*, subfamília *Alphaherpesvirinae* e os *Equid herpesvirus* (EHV-2, EHV-5 e EHV-7) sob o gênero *Percavirus*, subfamília *Gammaherpesvirinae* (ICTV, 2009). Dentre o Gamaherpesvírus, destacam-se EHV-2 e EHV-5, associados principalmente com síndromes respiratórias (TELFORD et al, 1993). Em relação ao EHV-5, especificamente, observa-se sua associação com casos da doença Multinodular de Fibrose Pulmonar Equina (EMPF) (WILLIAMS et al, 2013).

O objetivo do estudo foi detectar o EHV-5 associado a caso clínico em um equino no estado de Rio Grande do Sul, através da técnica de PCR e confirmar, por sequenciamento, a identidade do agente.

2. METODOLOGIA

Em junho de 2024, foi encaminhada ao Laboratório de Virologia e Imunologia da Universidade Federal de Pelotas (LabVir – UFPEL), uma amostra de *swab* nasal proveniente de uma égua, originária da região sul do Rio Grande do Sul com suspeita clínica de doença respiratória causada por EHV. Foi relatado pelo médico veterinário solicitante, que se tratava de uma égua gestante (terço final), clinicamente apresentando sinais respiratórios, associados a taquipnéia. A amostra foi, então, submetida à Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para EHV.

Para a detecção do agente, em primeiro momento foi feita a extração dos ácidos nucleicos presentes na amostra pelo uso do kit comercial *PetNAD™ Nucleic Acid Co-prep kit* (GeneReach Biotechnology Corp.). Logo após, foi realizado o PCR

com o objetivo de amplificar segmentos dos genes da glicoproteína B (gB), por meio do uso dos primers descritos na tabela 1.

A reação de PCR foi composta por: 3 µL de material extraído da amostra, 1 µL de primer sentido senso (forward), 1 µL de primer sentido anti-senso (reverse) (10µM/µL), 12,5µl de reagente PCR comercial (*GoTaq® Green Master Mix*) e 7,5 µL de água ultrapura (livre de DNases e RNases), totalizando 25 µL de reação. A termociclagem foi padronizada nas seguintes condições: um ciclo de desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos; cinco ciclos de *touch down* com etapas de desnaturação, anelamento e extensão, no qual o primeiro anelamento começa com 65°C e perde 1°C a cada ciclo, chegando aos 35 ciclos restantes com desnaturação (95°C), anelamento (60°C) e extensão (72°C), durando 30 segundos cada, seguido por um último ciclo de extensão final, de 72°C durante 5 minutos.

Em seguida o produto foi submetido ao processo de eletroforese a 120V por 40 minutos em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio para subsequente visualização sob luz ultravioleta em transiluminador. As bandas de gel contendo o produto de PCR do tamanho desejado foram retiradas e purificadas, através do kit *GFXPCR™ DNA and Gel Band Purification kit* (Life Science) então encaminhados para a realização de sequenciamento pelo método Sanger.

Foi utilizado um *gBlock® Gene Fragment (Integrated DNA Technologies)* como controle positivo. Para confirmação da identidade viral, as sequências obtidas foram alinhadas através da ferramenta *BLASTn (Geneious by Dotmatics)* utilizando como padrão sequências depositadas no GenBank.

Tabela 1. Primers usados no PCR para a detecção de EHV-5 descritos por PANZIERA, et al. (2013)

Primer	Sentido	Sequência	Tamanho
gB	<i>Forward</i>	5'- TGATATGACGGCCAGATCACAC-3'	155 pb
	<i>Reverse</i>	5'- CCAACCCACACCATAGTCT -3'	

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O PCR realizado na amostra de *swab* nasal confirmou a presença do EHV-5, corroborando a suspeita inicial, que se baseava nos sinais clínicos respiratórios apresentados pelo equino. A sequência obtida após sequenciamento demonstrou alta homologia (100%) com sequências de EHV-5 depositadas no *GeneBank*, confirmando a identidade viral.

A EMPF é uma doença infecciosa de caráter crônico, descrita pela presença de nódulos no interstício pulmonar. Entre os principais sinais clínicos apresentados, destaca-se dispneia, estresse respiratório, febre intermitente, anorexia e perda de peso (PANIZERA, et al. 2013). Relatos da sua ocorrência no Brasil são recentes e, no presente momento, não é completamente evidente o papel do EHV-5 na patogenia da enfermidade (ESTIMA et al, 2017). Contudo, é descrito que a presença do vírus, mesmo em estado de latência, favorece o processo de fibrose em lesões adicionais aos pulmões (VANELLA et al, 2010), bem como a prevenção da sua reativação diminui as chances de desenvolvimento da doença (MORA et al, 2007).

Dada a cronicidade característica da doença e a possibilidade de portadores assintomáticos na população, a definição da prevalência do agente no país é

inconclusiva (AGNOL et al, 2019). A EMPF, no entanto, pode ser considerada potencialmente emergente, sendo necessária maior vigilância quanto a sua ocorrência (BIAVA, et al. 2019).

Visto que não há disponibilidade de vacinas contra o EHV-5 no mercado e a principal via de transmissão é a respiratória, os meios de prevenção se limitam ao controle de entrada de animais em uma propriedade, além do tratamento dos sintomas conforme o seu surgimento (DA SILVA, 2021).

4. CONCLUSÕES

Este estudo, por meio do uso de técnica PCR e subsequente sequenciamento, confirmou a presença de EHV-5 em um equino apresentando sinais clínicos compatíveis com doença Multinodular de Fibrose Pulmonar Equina (EMPF) no estado do Rio Grande do Sul. O diagnóstico e a identificação da doença auxiliam a elucidar a ocorrência do agente na população e auxilia no seu controle.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGNOL, A.M. et al. Detection of Equid gammaherpesvirus 2 and 5 DNA in the upper respiratory tract of asymptomatic horses from Southern Brazil. **Braz J Microbiol**, v. 50, n. 3, p. 875-878, 2019.

BACK, Helena et al. Equine multinodular pulmonary fibrosis in association with asinine herpesvirus type 5 and equine herpesvirus type 5: a case report. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 54, p. 1-5, 2012.

BIAVA, J.S. et al. First molecular detection of Equine Herpesvirus type 2 (EHV-2) and type 5 (EHV-5) in upper respiratory liquids of healthy training horses from southern Brazil. **Journal of Animal Science**, v. 97, n. 3, p. 314-315, 2019.

DA SILVA, G.B. **Herpesvírus em Equídeos no Brasil**. 2021. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco.

ESTIMA, S.P., et al. Equine multinodular pulmonary fibrosis in southern Brazil: pathology and differential diagnosis. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 11, p. 1247-1252, 2017.

FLORES, E.F., Virologia Veterinária. In: MORAES, M.P., da COSTA, P.R. **Herpesviridae**. Santa Maria: UFSM, 2007. Cap. 17, p. 435-485.

ICTV – International Committee on Taxonomy of Viruses. **Herpesviridae**. Acessado em 20 de setembro de 2024. Disponível em: <https://ictv.global/report_9th/dsDNA/Herpesvirales>.

MORA, A.L. et al. Control of virus reactivation arrests pulmonary herpesvirus-induced fibrosis in IFN-gamma receptor-deficient mice. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 175, n. 11, p. 1139-50, 2007.

NORDENGRANH, Ann et al. Prevalence of equine herpesvirus types 2 and 5 in horse populations by using type-specific PCR assays. **Veterinary research**, v. 33, n. 3, p. 251-260, 2002.

O'CALLAGHAN, D.J.; GENTRY, Glenn A.; RANDALL, Charles C. The equine herpesviruses. **The Herpesviruses**. v. 2. Boston, MA: Springer US, 1983. p. 215-318.

PANIZERA, W.; et al. Equine multinodular pulmonary fibrosis associated with equine Herpesvirus 5 in a horse in Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 7, n. 1, p. 17-20, 2013.

TELFORD, E. A. R. et al. Equine herpesviruses 2 and 5 are γ -herpesviruses. **Virology**, v. 195, n. 2, p. 492-499, 1993.

VAN CLEEMPOT, J. et al. Unravelling the first key steps in equine herpesvirus type 5 (EHV5) pathogenesis using ex vivo and in vitro equine models. **Vet Res**, v. 50, n. 13, 2019.

VANDEVANter, D. R.; et al. Detection and analysis of diverse herpesviral species by consensus primer PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 7, p. 1666-1671, 1996.

VANELLA, K.M. et al. Latent herpesvirus infection augments experimental pulmonary fibrosis. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 181, n. 5, p. 465-477, 2010.

WANG, L.; et al. Detection of respiratory herpesviruses in foals and adult horses determined by nested multiplex PCR. **Veterinary microbiology**, v. 121, n. 1-2, p. 18-28, 2007.

WILLIAMS, Kurt J. et al. Experimental induction of pulmonary fibrosis in horses with the gammaherpesvirus equine herpesvirus 5. **PLoS One**, v. 8, n. 10, 2013.