

Primeira evidência da infecção pelo vírus da diarreia viral bovina em javalis

First Evidence of Bovine Viral Diarrhea Virus Infection in Wild Boars

Matheus Nunes Weber¹, Eloisa Helena Moreira Pino¹, Carine Kunzler Souza¹, Ana Cristina Sbaraini Mósená¹, José Paulo Hiroji Sato², David Emílio Santos Neves de Barcellos² & Cláudio Wageck Canal¹

ABSTRACT

Background: The farming of wild boars has growing due to the interest of the human consumption of this exotic meat. Such a development may pose an increased risk of disease transmission between boars and domestic animals. The wild boar population has increased in South America in the last years due the absence of predator causing economic losses due to direct damage to crops and risk of disease transmission. The genus *Pestivirus* within the family *Flaviviridae* are composed by four recognized species by the International Committee on the Taxonomy of Viruses (ICTV): classical swine fever virus (CSFV), border disease virus (BDV), bovine viral diarrhoea virus type 1 (BVDV-1) and 2 (BVDV-2). Other putative species denoted as atypical pestiviruses have been reported as ‘HoBi’-like virus, giraffe pestivirus, Bungowannah pestivirus, Pronghorn antelope virus, atypical porcine pestivirus (APPV), Norwegian rat pestivirus (NrPV) and *Rhinolophus affinis* bat pestivirus (RaPestV-1). CSFV is commonly detected in wild boars, but despite positive serology, bovine viral diarrhoea virus (BVDV) was never detected in this animal species. Thereby, the present communication describes the first detection of BVDV in the lungs of captive boars using RT-PCR and DNA sequencing.

Materials, Methods & Results: Forty lung samples from farmed wild boars were collected after slaughter in a commercial abattoir. The organs were crushed separately, centrifuged, and the supernatant was stored for further analysis. The total RNA was isolated using a phenol-based protocol and RT-PCR protocol that amplified 118 bp of 5' untranslated region (5'UTR) was carried out. One out 40 samples resulted positive. The positive sample had partial fragments of 5'UTR and N terminal autoprotease (N^{pro}) sequenced and analyzed. The strain LV Java/2012 presented 99% of identity in 5'UTR and 98% in N^{pro} region with a BVDV-2 previously reported in bovines in Southern Brazil. In both 5'UTR and N^{pro} phylogenetic analysis, the strain LV Java/2015 clustered with BVDV-2 strains and was most closely related to subtype 2b identified in bovines in Southern Brazil grouping in the same terminal node.

Discussion: Wild boars are commonly associated to pathogen transmission to domestic animals. This animal species is considered a reservoir of the pestivirus CSFV and important keys in CSFV control and eradication programs in Europe. Despite indirect presence of BVDV was reported in wild boars by serology tests, the direct detection of the viral agent was never reported. The present study showed the presence of BVDV-2 genomic segments obtained by RT-PCR followed by DNA sequencing in captive wild boars. The reported data suggests a possible importance of this animal species in the epidemiology of ruminant pestiviruses which could interfere in control and eradication programs of these important pathogens for cattle worldwide. The strain LV Java/2012 was closely related to BVDV-2b and presented highest identity with a strain detected in cattle from Southern Brazil. This data suggests that wild boars and bovines could be sharing this pathogen due the similarity of the strains and that both were reported in the same region. It can lead to need of inclusion of wild swines in BVDV control programs since boars can circulate between different regions and carry this pathogen to different cattle herds. The present study reported the first molecular evidence of BVDV in wild boars in the literature. The data generated herein suggests a possible importance of boars in the epidemiology of ruminant pestiviruses.

Keywords: BVDV, wild boar, pestivirus, RT-PCR.

INTRODUÇÃO

A criação de javalis (*Sus scrofa scrofa*) em cativeiro tem crescido devido ao interesse humano pelo consumo de carnes exóticas. Além disso, animais de vida livre têm se multiplicado em descontrole no País, devido a fatores como ausência de predador natural, causando danos a lavouras e risco de transmissão de doenças a animais domésticos [3,7,9,12,19].

O gênero *Pestivirus* da família *Flaviviridae* consiste de quatro espécies reconhecidas pelo Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV): o vírus da peste suína clássica (CSFV), o vírus da diarreia viral bovina tipo 1 (BVDV-1) e 2 (BVDV-2) e o vírus da doença da fronteira (BDV) [14]. Além das espécies estabelecidas, outros grupos de pestivírus foram identificados e são definidos como pestivírus atípicos, como o vírus 'HoBi' [11], pestivírus de girafa [1], vírus Pronghorn [20], vírus Bungowannah [6], pestivírus atípico de porcos (APPV) [4], pestivírus de roedores *Rattus norvegicus* (NrPV) e pestivírus de morcegos *Rhinolophus affinis* (RaPestV-1) [22].

Suínos (*Sus scrofa domesticus*) são os hospedeiros primários do CSFV, porém também podem ser infectados por outros pestivírus, como o BVDV-1 e 2 [2,8]. A presença desses vírus em criações de suínos gera sintomatologia semelhante à causada pelo CSFV [8,16], tornando necessária a sua diferenciação. Javalis frequentemente estão relacionados à disseminação de CSFV na Europa [7,10,19]. Apesar da demonstração sorológica de BVDV em javalis já ter sido relatada [12], jamais o vírus foi detectado e caracterizado. Com isso, o objetivo do presente estudo é testar amostras de pulmões de javalis cativos obtidas em abatedouro para a presença de pestivírus e caracterizar geneticamente as positivas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras

Quarenta amostras de pulmões de javalis foram coletadas após o abate em um abatedouro comercial (Glorinha, RS, Brasil) entre os meses de agosto e outubro de 2012. Os órgãos foram macerados individualmente, suspensos em volume final de 5 mL com PBS pH 7,2, centrifugados a 5.000 g durante 15 min e o sobrenadante coletado e estocado a -80°C.

Extração de RNA e RT-PCR

O RNA total foi extraído de 250 µL de amostra utilizando kit comercial (TRIzol® LS)¹ e eluído em 50

µL de água ultrapura, seguindo recomendações do fabricante. A RT-PCR foi realizada utilizando kit comercial Superscript®One Step RT-PCR with Platinum®Taq¹ e os iniciadores PanPesti F e PanPesti R que amplificam um fragmento esperado de 118 pares de base (pb) da região 5' não-traduzida (5' UTR) [21]. Para tanto, as reações foram preparadas em um volume total de 25 µL contendo 2 µL de RNA total da amostra, 20 pmol de cada iniciador e demais soluções do kit, conforme recomendações do fabricante. A síntese de cDNA foi realizada a 55°C por 30 min. As condições da PCR foram uma desnaturação inicial de 94°C por 3 min seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 45 s, anelamento a 60°C por 45 s e extensão a 72°C por 45 s, e extensão final a 72°C por 7 min, realizadas em um termociclador automático modelo Veriti®96-well². Na etapa seguinte, os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2,0% com 0,1 µg/mL de Blue Green Loading Dye I³ e visualização dos produtos de amplificação sob lâmpada ultravioleta.

Sequenciamento e análise filogenética

As amostras positivas foram submetidas a novas reações de RT-PCR para amplificação de fragmento de 288 pb da 5' UTR com os iniciadores 324 e 326 [18] e de 488 pb com os iniciadores LV Pesti F e LV Pesti R [21] nas condições descritas na sessão anterior. Os produtos de amplificação foram purificados utilizando o kit comercial NucleoSpin Extract II Kit⁴. Ambas as fitas foram sequenciadas utilizando-se dos iniciadores diretos e reversos em sequenciador automático (ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer)² munido com capilares de 50 cm e polímero POP6². Os DNAs-molde (30 a 60 ng) foram marcados utilizando-se 3,2 pmol do iniciador 5'-NNNNNNNNNNNN-3' e 2 L do reagente BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-1002 em um volume final de 10 L. As reações de marcação foram realizadas em termociclador GeneAmp PCR System 97002 com uma etapa de desnaturação inicial a 96°C por 3 min seguida de 25 ciclos de 96°C por 10 s, 55°C por 5 s e 60°C por 4 min. Após marcadas, as amostras foram purificadas pela precipitação com isopropanol e lavagem com etanol 70%. Os produtos precipitados serão diluídos em 10 µL de formamida, desnaturados a 95°C por 5 min, resfriados em gelo por 5 min e eletroinjetados no sequenciador automático. Os dados de sequenciamento foram coletados utilizando-se o programa Data Collection v1.0.1² com os parâmetros Dye Set

“Z”; Mobility File “DT3100POP6{BDv3}v1.mob”; BioLIMS Project “3100_Project1”; Run Module 1 “StdSeq50_POP6_50cm_cfv_100”; e Analysis Module 1 “BC-3100SR_Seq_FASTA.saz”.

As sequências parciais da 5’UTR e N^{pro} foram montadas utilizando o programa SeqMan⁵, as sequências dos iniciadores retiradas e a sequências resultantes submetidas à análise pelo *nucleotide* BLAST do GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para confirmação da identidade. Para análise filogenética, 18 sequências de cepas representativas de pestivírus foram coletadas do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) e alinhadas com CLUSTAL W [17]. As árvores filogenéticas foram construídas utilizando o modelo de inferência *Neighbor-joining* (NJ) com o programa MEGA6 [15], utilizando o modelo estatístico Kimura-2. A robustez da hipótese foi testada em 1000 réplicas.

RESULTADOS

Um das 40 (2,5%) amostras de pulmão de javalis foram positivas na RT-PCR para detecção de fragmento da 5’UTR [21] utilizada para triagem inicial. A amostra LV Java/2012 teve porções da 5’UTR [18] e N^{pro} [21] amplificadas por RT-PCR e

submetidas a sequenciamento de DNA. Na análise por *nucleotide* BLAST, apresentou 99% de identidade na região 5’UTR e 98% na N^{pro} com a cepa de BVDV-2b LV/Patol02/09 (Números de acesso do GenBank: KP715137.1 e KP743045.1, respectivamente), detectada em bovinos no Rio Grande do Sul, Brasil.

A árvore filogenética para 5’UTR (Figura 1A) mostrou seis agrupamentos distintos correspondentes à BVDV-1, BVDV-2, BDV, CSFV, vírus HoBi e pestivírus de girafa. Cada clado monofilético foi suportado por valores de réplicas de 99 e 100%, confirmando a robustez da hipótese. A cepa LV Java/2012 agrupou-se no braço correspondente ao BVDV-2, mostrando maior relação próxima com cepas do subtipo 2b e no mesmo nodo terminal que a cepa LV/Patol02/09 (Número de acesso do GenBank: KP715137.1), suportado por valor de réplica de 99%. Já na árvore para N^{pro} (Figura 1B), ocorreram seis agrupamentos semelhantes aos correspondentes às espécies de pestivírus observados na análise para 5’UTR, suportados por valores de réplicas de 100%. A cepa LV Java/2012 também agrupou-se no braço correspondente ao BVDV-2, mostrando maior relação próxima com cepas do subtipo 2b e no mesmo nodo terminal que a cepa LV/Patol02/09 (Número de acesso do GenBank: KP743045.1).

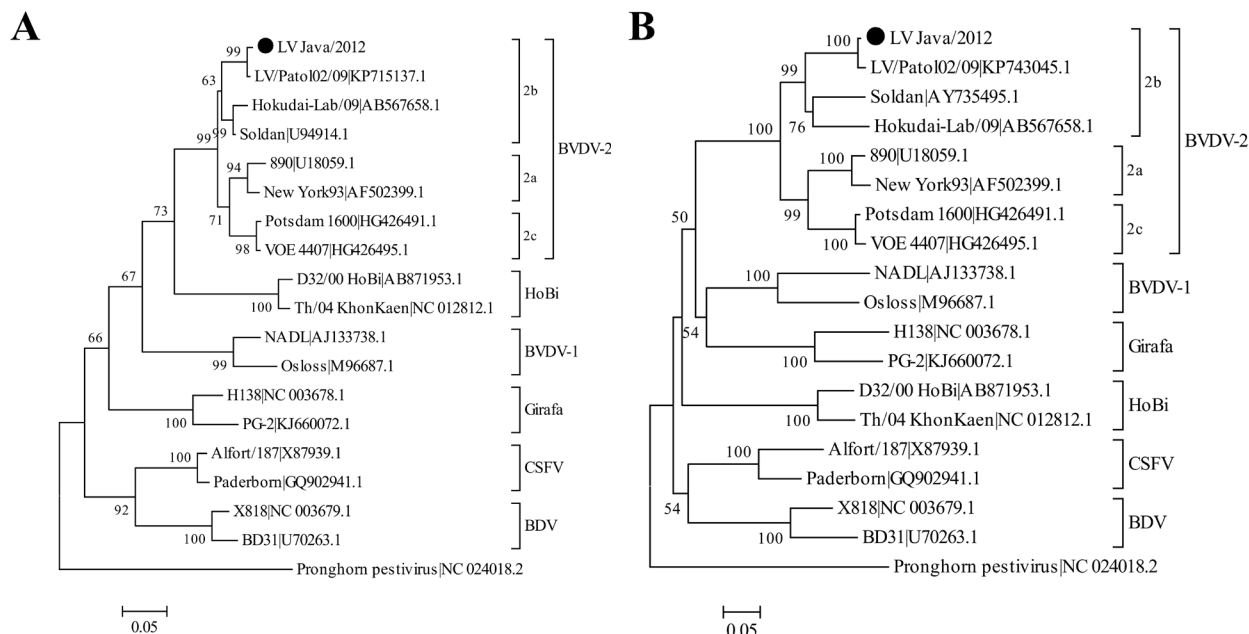


Figura 1. Árvores filogenéticas de pestivírus construídas utilizando o programa MEGA6 representando (A) análise de porção parcial da 5’UTR e (B) da região N^{pro}. Foram utilizados o modelo de inferência *neighbor-joining* e modelo estatístico Kimura-2 com 1000 réplicas, onde somente os valores de réplicas >50% são representados. A cepa detectada no presente estudo (LV Java/2012) está destacada com o símbolo ●.

DISCUSSÃO

Javalis são comumente associados a transmissão de patógenos a espécies de animais domésticos [3,7,9,12,19], sendo comumente associados como reservatórios do CSFV na Europa [7,19], dificultando programas de controle e erradicação na região [10,19]. Apesar de já relata a sorologia positiva para BVDV em javalis [12], o agente viral jamais foi relatado na espécie na literatura. O presente estudo pesquisou a presença de pestivírus em amostras de javalis cativos obtidos em abatedouro e encontrou a presença de segmentos de genomas BVDV-2. Esses dados podem sugerir uma possível importância da espécie na epidemiologia de pestivírus de ruminantes, podendo também interferir dificultando programas de controle e erradicação desse agente viral que causa grandes prejuízos na bovinocultura ao redor do mundo [5].

O BVDV-1 e BVDV-2 são endêmicos no Brasil, sendo BVDV-1a e BVDV-2b os mais prevalentes em bovinos no Sul do Brasil [13,21]. No presente estudo, foi encontrada uma cepa de pestivírus em javali que demonstrou maior identidade e relação (Figura 1) com cepas de BVDV-2b, especialmente com a cepa LV/Patol 02/09, recentemente relatada no Rio Grande do Sul, Brasil [13]. Estes dados sugerem que possa estar ocorrendo uma possível transmissão de BVDV entre javalis e bovinos, visto a semelhança das cepas e ao fato de ambas terem sido encontradas na mesma região. Este fato pode levar a necessidade de inclusão do controle deste agente viral em suínos selvagens, que circulem livremente e podem levar o BVDV a

diferentes regiões e rebanhos, atuando como mais um dispersor do vírus.

O BVDV causa sintomatologia semelhante a cepas de baixa virulência do CSFV em suínos [8,16]. Mais estudos quanto à presença de BVDV e suas consequências em javalis são necessários para averiguar possível patogenicidade do agente viral na espécie.

CONCLUSÃO

O presente estudo relatou a primeira evidência molecular da presença de BVDV em javalis na literatura. Os dados aqui relatados sugerem uma possível importância de suínos selvagens na epidemiologia de pestivírus de ruminantes, devido ao livre trânsito desses animais, que tem tido sua população crescendo na América do Sul nos últimos anos, principalmente devido à ausência de predador dessa espécie exótica na região.

MANUFACTURERS

¹Life Technologies™. Carlsbad, CA, USA.

²Applied Biosystems. Foster City, CA, USA.

³LGC Biotecnologia. Cotia, SP, Brazil.

⁴Macherey-Nagel. Duren, Germany.

⁵DNASTAR Lasergene® 11. Madison, WI, USA.

Acknowledgements. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Propesq/UFRGS supported this work.

Declaration of interest. The authors declare no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

REFERENCES

- 1 Avalos-Ramirez R., Orlich M., Thiel H.J. & Becher P. 2001. Evidence for the presence of two novel pestivirus species. *Virology*. 286: 456-465.
- 2 Deng Y., Sun C.Q., Cao S.J., Lin T., Yuan S.S., Zhang H.B., Zhai S.L., Huang L., Shan T.L., Zheng H., Wen X.T. & Tong G.Z. 2012. High prevalence of bovine viral diarrhoea virus 1 in Chinese swine herds. *Veterinary Microbiology*. 159: 490-493.
- 3 Hälli O., Ala-Kurikka E., Nokireki T., Skrzypczak T., Raunio-Saarnisto M., Peltoniemi O.A.T. & Heinonen M. 2012. Prevalence of and risk factors associated with viral and bacterial pathogens in farmed European wild boar. *The Veterinary Journal*. 194: 98-101.
- 4 Hause B.M., Collin E.A., Peddireddi L., Yuan F., Chen Z., Hesse R.A., Gayger P.C., Clement T., Fang Y. & Anderson G. 2015. Discovery of a novel putative atypical porcine pestivirus in pigs in the USA. *Journal of General Virology*. 96: 2994-2998.
- 5 Houe H. 2003. Economic impact of BVDV infection in dairies. *Biologicals*. 31: 137-143.
- 6 Kirkland P.D., Frost M.J., Finlaison D.S., King K.R., Ridpath J.F. & Gu X. 2007. Identification of a novel virus in pigs - Bungowannah virus: a possible new species of pestivirus. *Virus Research*. 129: 26-34.

- 7 Leifer I., Hoffmann B., Höper D., Rasmussen T.B., Blome S., Strebelow G., Höreth-Böntgen D., Staubach C. & Beer M. 2016. Molecular epidemiology of current classical swine fever virus isolates of wild boar in Germany. *Journal of General Virology*. 91: 2687-2697.
- 8 MacLachlan N.J. & Dubovi E.J. 2011. Flaviviridae. In: *Fenner's Veterinary Virology*. London: Academic Press, pp.467-481.
- 9 Meng X.J., Lindsay D.S. & Sriranganathan N. 2009. Wild boars as sources for infectious diseases in livestock and humans. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London – Biological Sciences*. 364: 2697-2707.
- 10 Rossi S., Staubach C., Blome S., Guberti V., Thulke H.H., Vos A., Koenen F. & Le Potier M.F. 2015. Controlling of CSFV in European wild boar using oral vaccination: a review. *Frontiers in Microbiology*. 6: 1141.
- 11 Schirmer H., Strebelow G., Depner K., Hoffmann B. & Beer M. 2004. Genetic and antigenic characterization of an atypical pestivirus isolate, a putative member of a novel pestivirus species. *Journal of General Virology*. 85: 3647-3652.
- 12 Sedlak K., Bartova E. & Machova J. 2008. Antibodies to selected viral disease agents in wild boars from the Czech Republic. *Journal of Wildlife Diseases*. 44: 777-780.
- 13 Silveira S., Weber M.N., Mósena A.C.S., Silva M.S., Streck A.F., Pescador C.A., Flores E.F., Weiblen R., Driemeier D., Ridpath J.F. & Canal C.W. 2015. Genetic diversity of Brazilian bovine pestiviruses detected between 1995 and 2014. *Transboundary and Emerging Diseases*. [in press].
- 14 Simmonds P., Becher P., Collet M.S., Gould E.A., Heinz F.X., Meyers G., Monath T., Pletnev A., Rice C.M., Stiansny K., Thiel H.J., Weiner A. & Bukhet J. 2011. Flaviviridae. In: King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B. & Lefkowitz E.J. (Eds). *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego: Academic Press, pp.1003-1020.
- 15 Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A. & Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. 30: 2725-2729.
- 16 Tao J., Liao J., Wang Y., Zhang X., Wang J. & Zhu G. 2013. Bovine viral diarrhea virus (BVDV) infections in pigs. *Veterinary Microbiology*. 165: 185-189.
- 17 Thompson J.D., Higgins D.G. & Gibson T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. 22: 4673-4680.
- 18 Vilcek S., Herring A.J., Herring J.A., Nettleton P.F., Lowings J.P. & Paton D.J. 1994. Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. *Archives of Virology*. 136: 309-323
- 19 Vilcek S. & Nettleton P.F. 2006. Pestiviruses in wild animals. *Veterinary Microbiology*. 116: 1-12.
- 20 Vilcek S., Ridpath J.F., Van Campen H., Cavender J.L. & Warg J. 2005. Characterization of a novel pestivirus originating from a pronghorn antelope. *Virus Research*. 108: 187-193.
- 21 Weber M.N., Silveira S., Machado G., Groff F.H.S., Mósena A.C.S., Budaszewski R.F., Dupont P.M., Corbellini L.G. & Canal C.W. 2014. High frequency of bovine viral diarrhea virus type 2 in Southern Brazil. *Virus Research*. 191: 117-124.
- 22 Wu Z., Re X., Yang L., Hu Y., Yang J., He G., Zhang J., Dong J., Sun L., Du J., Liu L., Xue Y., Wang J., Yang F., Zhang S. & Jin Q. 2012. Virome analysis for identification of novel mammalian viruses in bat species from Chinese provinces. *Journal of Virology*. 86: 10999-11012.