

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DA INFECÇÃO POR HERPESVÍRUS EM PRIMATAS NEOTROPICAIS NO ESTADO DE SÃO PAULO

Isabella Naomi Furusato^{1,2}

Natália Coelho Couto de Azevedo Fernandes², Leonardo José Tadeu de Araújo²

Juliana Mariotti Guerra^{1,2}

¹Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo

²Centro de Patologia, Instituto Adolfo Lutz

isa-naomi@usp.br

Objetivos

A família Herpesviridae abrange diferentes vírus que infectam uma ampla gama de espécies, inclusive o homem e primatas neotropicais (PNTs). A estreita relação entre humanos e PNTs facilita a transmissão desse agente entre essas espécies, podendo levar a doenças graves ou até a morte. Isso compromete o importante papel desses animais como dispersores de sementes, sendo o óbito dos PNTs considerado um evento de saúde pública de notificação compulsória imediata. Assim, este trabalho tem como premissa a caracterização morfológica e molecular da infecção por vírus da família *Herpesviridae* em primatas neotropicais no Estado de São Paulo.

Métodos e Procedimentos

Foram selecionados 223 casos de óbito de primatas neotropicais recebidos pelo Centro de Patologia do Instituto Adolfo Lutz entre janeiro de 2017 a dezembro de 2019. O material genético foi extraído de fragmentos de tecido (baço ou fígado) frescos congelados utilizando kit comercial (BioGene® DNA/RNA Viral kit, Quibasa, Belo Horizonte, MG, Brasil), conforme instruções do fabricante. A detecção do herpesvírus foi realizada pela amplificação em cadeia da polimerase (Nested-PCR) do gene que codifica a enzima DNA polimerase

para Herpesviridae, utilizando os iniciadores 285s DFA (5'-GAYTTYGCIAGYYTITAYCC-3'), 285s ILK (5'-TCCTGGACAAGCAGCARIYSGCIMTIAA-3') e 285as KG1 (5'-GTCTTGCTCACCAGITCIACICCYTT-3') na primeira etapa da reação; e 286sTGV (5'-TGTAACCTCGGTGTAYGGITTYACIGGIGT-3') e 286-as IYG (5'-CACAGAGTCCGTRTCICCRTAIAT-3') na segunda reação. Controles positivos e negativos foram aplicados em cada reação. Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2%, e visualizados por meio de luz ultravioleta em equipamento Gel Doc™ EZ (Biorad, Inc, Hercules, Estados Unidos). Os fragmentos amplificados foram purificados e quantificados. O sequenciamento foi realizado em um sequenciador automático ABI-Prism 3500® Genetic Analyzer (Applied Biosystems™, Foster City, CA, EUA) com os iniciadores 286sTGV ou 286-as e BigDye™ Terminator v3.1 (Thermo Fisher Scientific™, Waltham, Massachusetts, EUA). As sequências foram editadas no programa MEGA11 e comparadas com o banco de dados do GenBank através da ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). A análise filogenética foi realizada pelo programa Geneious Prime 2022.2. Fragmentos de diversos tecidos foram processados histologicamente e emblocados

em parafina, dos quais foram obtidos cortes de 3µm de espessura por micrótomo rotativo, que foram corados por hematoxilina e eosina (HE). Em seguida, as lâminas foram examinadas em microscópio de luz, em aumentos de 40x, 100x e 400x. Os principais tecidos avaliados foram fígado, baço, rim, pulmão, coração e cérebro. As alterações anatomopatológicas foram classificadas de 0 a 5, de acordo com a intensidade, e, quando pertinente, também segundo a distribuição, tipo e localização. Os resultados foram tabulados, gerando uma frequência de ocorrência de cada alteração descrita, que foi avaliada pelo teste exato de Fisher com nível de significância de 5%. (SISGEN A496AA1 e SISBIO 68697).

Resultados

Em 62 (27,8%) casos foram detectados fragmentos genômicos de *Herpesviridae* pela técnica de Nested-PCR. Desses, 39 (62,9%) foram positivos para *Gammaherpesvirus callitrichine 3*, todos em animais do gênero *Callithrix* (saguís). Cinco (8,1%) foram positivos para *Alouatta macconnelli cytomegalovirus* em animais do gênero *Alouatta*, e dois (3,2%) para *Cebus albifrons lymphocryptovirus 1* em *Sapajus* sp. Dezesesseis (25,8%) foram positivos para *alfaherpesvírus humano* tipo 1, sendo 13 do gênero *Callithrix* sp., 2 (12,5%) *Alouatta* sp. e 1 (6,3%) *Callicebus* sp. Os achados anatomopatológicos demonstraram diferenças estatísticas entre os saguís positivos e negativos para fragmentos genômicos de *Gammaherpesvirus callitrichine 3*, sendo que no primeiro grupo observou-se maior frequência de bactérias no fígado ($p=0,01394$) e no baço ($p=0,04809$), leucocitose sinusoidal ($p=0,03161$) e dilatação sinusoidal hepática ($p=0,0461$), necrose hepatocitária ($p=0,0362$) e esplênica ($p=0,04809$), esplenite aguda ($p=0,04881$), degeneração tubular renal ($p=0,0157$) e necrose tubular renal aguda ($p=0,03725$). Além disso, um dos saguís positivos para *Gammaherpesvirus callitrichine 3* também apresentou linfoma de células B multissistêmico. As demais espécies de PNTs não revelaram diferenças estatísticas quanto aos achados microscópicos entre animais positivos e negativos para *Herpesviridae*.

Conclusões

Os resultados deste trabalho contribuíram com a epidemiologia das herpesviroses nos primatas neotropicais, especialmente do gênero *Callithrix*. Estudos futuros com mais animais dos outros gêneros abordados são interessantes para melhor compreender o impacto da infecção nestes grupos. Além disso, o trabalho ressalta a importância da conservação de primatas não-humanos e os riscos para humanos envolvidos no manejo desses animais em vida livre e em cativeiro.

Agradecimentos

Agradecimentos à toda a equipe do Instituto Adolfo Lutz que contribuiu para a realização deste projeto e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio através do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC) (processo 116603/2022).

Referências

- BONFIM, F. F. O. **Evidência de Alphaherpesvirus humano 1 e Gammaherpesvirus callitrichine 3 em primatas não humanos de vida livre no estado do Rio de Janeiro**. Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2019.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Guia de vigilância de epizootias em primatas não humanos e entomologia aplicada à vigilância da febre amarela**. 2 ed. Brasília, 2014.
- EHLERS, B. et al. Identification of novel rodent herpesviruses, including the first gammaherpesvirus of *Mus musculus*. **J Virol**, v. 81, n. 15, p. 8091-100, Aug 2007.
- HUNT, R. D. Herpesviruses of Primates: An Introduction. In: JONES, T. C., MOHR, U. H. R. **Nonhuman Primates I**. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 1993.
- ROIZMAN, B.; PELLET P.E. Herpesviridae, In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M., **Fields Virology**. 6 ed. Filadélfia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013.

MOLECULAR AND MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION OF HERPESVIRUS INFECTION IN NEOTROPICAL PRIMATES AT SÃO PAULO STATE

Isabella Naomi Furusato^{1,2}

Natália Coelho Couto de Azevedo Fernandes, Leonardo José Tadeu de
Araújo

Juliana Mariotti Guerra^{1,2}

¹School of Veterinary and Animal Science, University of São Paulo

²Pathology Center, Adolfo Lutz Institute

isa-naomi@usp.br

Objectives

The Herpesviridae family harbors a large number of viruses that infect a wide range of animals, including humans and neotropical primates (NTPs). The intimate contact between the human species and other primates allows the transmission of this agent between them, which can lead to serious illness or even death. This compromises the important role of these animals as seed dispersers, and the death of NTPs is an event of public health importance and immediate compulsory notification. Thus, the objective of this study is the molecular and morphological characterization of the infection caused by herpesvirus in neotropical primates at São Paulo state.

Materials and Methods

223 cases of death of neotropical primates received by the Pathology Center at Adolfo Lutz Institute, from January 2017 to December 2019, were selected. The genetic material was extracted from fresh frozen tissue fragments (spleen or liver) using a commercial kit (BioGene® DNA/RNA Viral kit, Quibasa, Belo Horizonte, MG, Brazil), according to the manufacturer's instructions. Herpesvirus detection was performed by the polymerase chain reaction (Nested-PCR) that amplifies the

Herpesviridae DNA polymerase gene, using the primers 285s DFA (5'-GAYTTYGCIAGYYTITAYCC-3'), 285s ILK (5'-TCCTGGACAAGCAGCARIYSGCIMTIAA-3') and 285as KG1 (5'-GTCTTGCTCACCAGITCIACICCYTT-3') in the first round of the reaction; and 286sTGV (5'-TGTAACCTCGGTGTAYGGITTYACIGGIGT-3') and 286-as IYG (5'-CACAGAGTCCGTRTCICCRTAIAT-3') in the second round. Positive and negative controls were used in all reactions performed. PCR amplicons were analyzed by electrophoresis in a 2% agarose gel and visualized under ultraviolet light using a Gel Doc™ EZ equipment (Biorad, Inc, Hercules, United States). Amplicons were purified and quantified. Sequencing was performed on an ABI-Prism 3500® Genetic Analyzer automated sequencer (Applied Biosystems™, Foster City, CA, USA) with primers 286sTGV or 286-as and BigDye™ Terminator v3.1 (Thermo Fisher Scientific™, Waltham, Massachusetts, USA). The sequences were edited in the MEGA11 program and compared with the GenBank database using the BLAST tool (Basic Local Alignment Search Tool). Phylogenetic analysis was performed using the Geneious Prime 2022.2 program. Fragments of different tissues were embedded in paraffin blocks, from which 3µm thick sections were obtained by rotating

microtome, and then stained with hematoxylin and eosin (HE). The slides were examined under a light microscope, at magnifications of 40x, 100x and 400x. The main tissues analyzed were liver, spleen, kidney, lung, heart and brain. The anatomopathological findings were classified from 0 to 5, according to their intensity, and, when relevant, also according to their distribution, type and location. The results were tabulated, generating a frequency of occurrence of each described alteration, which was evaluated using Fisher's exact test with a significance level of 5%. (SISGEN A496AA1 and SISBIO 68697).

Results

In 62 (27.8%) cases, Herpesviridae genomic fragments were detected by the Nested-PCR technique. Among these, 39 (62.9%) were positive for *Callitrichine gammaherpesvirus 3*, all of them in animals of the genus *Callithrix* (marmosets). Five (8.1%) were positive for *Alouatta macconnelli cytomegalovirus* in animals of the genus *Alouatta*, and two (3.2%) for *Cebus albifrons lymphocryptovirus 1* in a *Sapajus* sp. Sixteen (25.8%) were positive for *Human alphaherpesvirus 1*, with 13 of the genus *Callithrix* sp., 2 (12.5%) *Alouatta* sp. and 1 (6.3%) *Callicebus* sp. The anatomopathological findings showed statistical differences between the positive and negative marmosets for genomic fragments of *Gammaherpesvirus callitrichine 3*, and in the first group it was more frequently observed bacteria in the liver ($p=0.01394$) and spleen ($p=0.04809$), hepatic sinusoidal leukocytosis ($p=0.03161$) and sinusoidal dilatation ($p=0.0461$), hepatocytic ($p=0.0362$) and splenic necrosis ($p=0.04809$), acute splenitis ($p=0.04881$), renal tubular degeneration ($p=0.0157$) and acute renal tubular necrosis ($p=0.03725$). In addition, one of the marmosets positive for *Gammaherpesvirus callitrichine 3* also had B-cell lymphoma with multisystem involvement. There were no statistical differences regarding the microscopic findings between positive and negative animals for Herpesviridae in the other NTPs species.

Conclusions

The results of this work contributed to the epidemiology of herpesvirus infections in

neotropical primates, especially of the genus *Callithrix*. Further studies with more animals of the other genera discussed are interesting to better understand the impact of the infection in them. Also, this study highlights the importance of conservation of non-human primates and the risks for humans involved in the management of these animals, whether in captivity or free living conditions.

Acknowledgements

Thanks to the entire team at Adolfo Lutz Institute who contributed to this project and to National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for the support through the Institutional Scientific Initiation Scholarship Program (PIBIC) (116603/2022).

References

- Bonfim, F. F. O. (2019). *Evidência de Alphaherpesvirus humano 1 e Gammaherpesvirus callitrichine 3 em primatas não humanos de vida livre no estado do Rio de Janeiro*. [Master's dissertation, Instituto Oswaldo Cruz].
 Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. (2014) *Guia de vigilância de epizootias em primatas não humanos e entomologia aplicada à vigilância da febre amarela*.
 Ehlers, B. et al (2007). Identification of novel rodent herpesviruses, including the first gammaherpesvirus of *Mus musculus*. *Journal of virology*, 81(15), 8091-8100.
 Hunt, R. D. (1993). Herpesviruses of primates: an introduction. In *Nonhuman Primates I* (pp. 74-78). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
 Roizman, B. & Pellet, P. E. (2013). Herpesviridae. In: Knipe DM, Howley PM, (Eds.). *Fields Virology*.