

## **DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA O VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA EM FÊMEAS DE REBANHOS LEITEIROS NÃO VACINADOS, COM HISTÓRICO DE PROBLEMAS REPRODUTIVOS, NO ESTADO DE GOIÁS**

*Wilia Marta Elsner Diederichsen de Brito,<sup>1</sup> Wesley José de Souza,<sup>2</sup> Sara Vieira<sup>2</sup> e Daniel Correia Lima Linhares<sup>3</sup>*

### **RESUMO**

Este trabalho foi realizado objetivando identificar anticorpos contra o vírus da diarréia viral bovina (BVDV) em fêmeas bovinas não vacinadas de rebanhos leiteiros, com histórico de problemas reprodutivos, em 10 municípios do Estado de Goiás. Foram colhidas amostras pareadas de soro sanguíneo de 452 animais com idade superior a 24 meses e pertencentes a 37 rebanhos desses municípios. A pesquisa de anticorpos foi realizada por meio de um ensaio imunoenzimático (EIE) comercial e da reação de soroneutralização (SN). A análise das primeiras colheitas por EIE demonstrou soropositividade em 35,6% das amostras, enquanto pela SN a positividade encontrada foi 33,2%. O índice Kappa calculado para a comparação dos dois testes foi de 0,84. Foi observada soroconversão em 8,1% das amostras. Do total de propriedades, 70,3% apresentaram pelo menos um animal sorologicamente positivo, e 80% dos municípios possuíam rebanhos infectados.

**DESCRITORES:** Bovinos. Vírus da diarréia viral bovina. Prevalência. Teste imunoenzimático. Reação de soroneutralização.

### **INTRODUÇÃO**

O vírus da diarréia viral bovina (BVDV), juntamente com o vírus da peste suína clássica e o da doença das fronteiras, que infectam os ovinos, pertence ao

1. Setor de Microbiologia, do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da Universidade Federal de Goiás (UFG).
2. Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical, do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da Universidade Federal de Goiás (UFG).
3. Bolsista PIBIC/UFG.

Endereço para correspondência: Wilia M. E. D. de Brito, Rua Delenda Rezende de Melo, esq. com 1ª Avenida, Setor Universitário. Caixa Postal 131, CEP 74605-050, Goiânia, GO. E-mail: wdbrito@iptsp.ufg.br

Recebido para publicação em 15/4/2003. Revisto em 21/11/2003. Aceito em 10/5/2004.

gênero *Pestivirus*, da família *Flaviviridae* (Thiel et al. 1996). São vírus de RNA, fita simples, de polaridade positiva com 12.308 nucleotídeos circundados por um capsídeo esférico protéico de 30 nm de diâmetro e por uma bicamada lipídica. Essa bicamada forma o envelope viral e dá à partícula um tamanho aproximado de 40 a 60 nm de diâmetro (Donis 1995; Thiel et al. 1996).

A infecção pós-natal com o BVDV resulta em um grande número de manifestações clínicas, ocorrendo desde infecções inaparentes até uma forma altamente fatal, conhecida como doença das mucosas (Baker 1995). O grande impacto econômico causado pela doença decorre primariamente de infecções em fêmeas gestantes, daí ser o BVDV considerado um patógeno associado à esfera reprodutiva. Nesses animais, o vírus pode ultrapassar a placenta e infectar o feto. A ocorrência de infecção nos dois primeiros trimestres da gestação pode resultar em morte embrionária e fetal, em deformidades congênitas ou ainda no nascimento de animais persistentemente infectados (PI), capazes de disseminar a infecção por longos períodos. A infecção de touros pode levar a uma queda na qualidade do sêmen e à eliminação do vírus através do líquido seminal. O diagnóstico da infecção inclui isolamento e identificação viral, pesquisa de antígenos e anticorpos virais e pesquisa do ácido nucléico viral. Para a pesquisa de anticorpos no soro, o Office International des Epizooties (OIE 2001) recomenda os testes de soroneutralização (SN) ou o ensaio imunoenzimático (EIE).

O BVDV tem distribuição mundial e demonstra ser endêmico na maioria dos países (Houe 1999), apesar de apresentar índices variados de prevalência (Luzzago et al. 1999; Obando et al. 1999; Schreiber et al. 1999; Mainar-Jaime et al. 2001; VanLeeuwe et al. 2001). No Brasil os trabalhos relatam coeficientes elevados nas regiões estudadas (Wizigman et al. 1972; Soares e Pereira 1974; Castro et al. 1993; Langoni et al. 1995; Figueiredo et al. 1997; Krahal et al. 1997; Pellegrin et al. 1997; Canal et al. 1998). As primeiras evidências da infecção no Estado de Goiás foram descritas por Vieira et al. (1999) e por Guimarães et al. (2000).

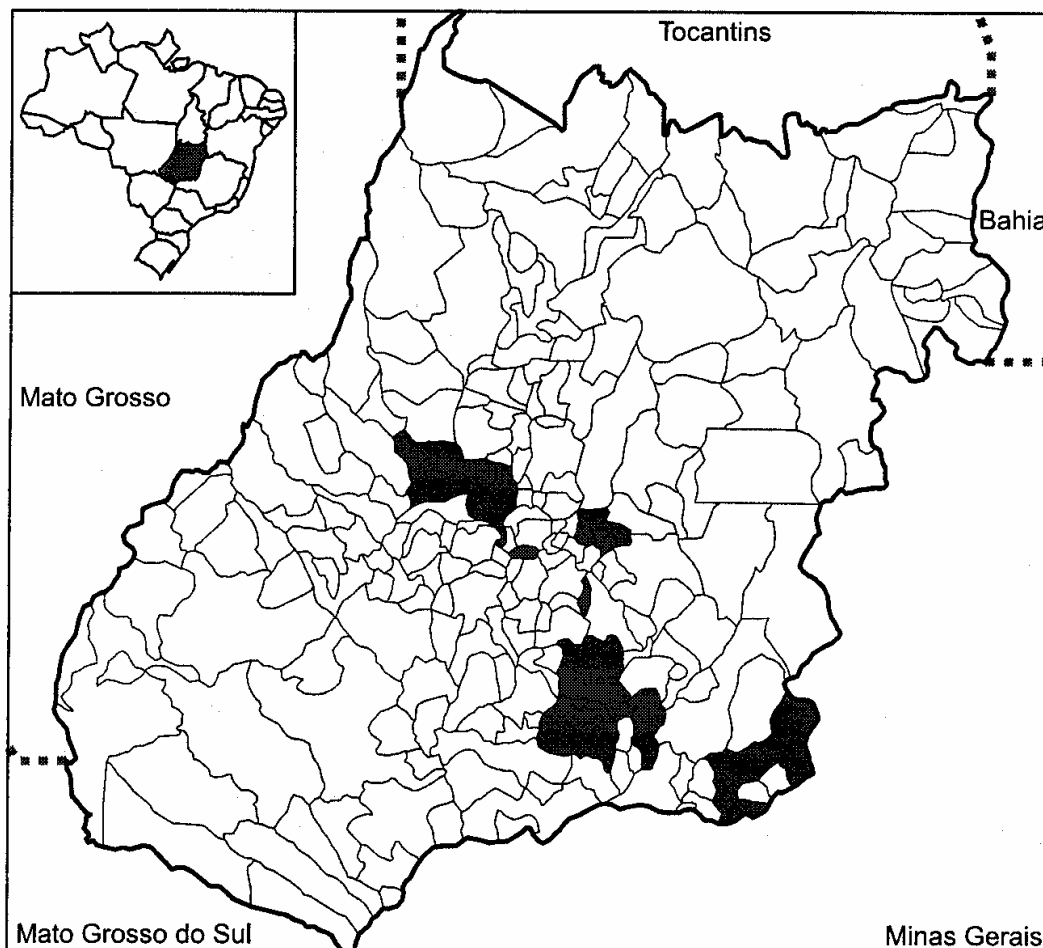
O presente trabalho teve como objetivos a detecção de anticorpos anti-BVDV em fêmeas bovinas de rebanhos leiteiros não vacinados, com problemas reprodutivos, no Estado de Goiás, e a comparação da técnica realizada *in house* com um teste comercial, desta forma padronizando a reação para utilização como teste diagnóstico.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostras

Foram analisados soros sanguíneos de 452 fêmeas bovinas, com idade acima de 24 meses e com problemas reprodutivos. As amostras provieram de 37

rebanhos leiteiros distribuídos em 10 municípios da região central do Estado de Goiás: Anápolis, Caldas Novas, Catalão, Caturai, Goiás, Itaberaí, Morrinhos, Piracanjuba, Senador Canedo e Três Ranchos (Figura 1). De 430 animais foi obtida uma segunda amostra de soro 30 dias após a primeira colheita. Não foi relatada vacinação contra o BVDV em nenhum dos animais amostrados.



*Figura 1.* Localização dos municípios onde foram colhidas as amostras para pesquisa de anticorpos contra o BVDV em fêmeas bovinas provenientes de rebanhos com problemas reprodutivos, sem histórico de vacinação, no Estado de Goiás, Brasil (2001)

#### Testes sorológicos

Todas as amostras foram analisadas através do EIE e da SN. As segundas amostras (n=430) foram testadas pela SN para verificar soroconversão.

Para o EIE foi utilizado um ensaio de bloqueio comercial (HerdChek™IDEXX) com o protocolo recomendado pelo fabricante. A SN foi

realizada em células Madin Darby Bovine Kidney (MDBK, ATCC CCL-22) mantidas em meio Eagle's MEM (meio mínimo essencial de Eagle's com sais de Earle – Gibco, USA) e contendo  $10^2$  U/mL de penicilina,  $10^2$  µg/mL de estreptomicina e 2,5 µg/mL de fungizon adicionado de 6% de soro fetal bovino (SFB Sigma, USA). A amostra citopatogênica Singer (BVDV tipo I) foi usada como a amostra de referência do vírus.

As amostras de soro, previamente inativadas a 56°C por 30 minutos, foram adicionadas, em diluições seriadas (1:2 a 1:128) e em duplicata, a microplacas de cultivo celular (Corning/Costar cod. 3595) e misturadas com igual volume (50 µL/orifício) de vírus contendo 100 TCID<sub>50</sub>. As misturas vírus-soro foram incubadas por duas horas a 37°C em ambiente de CO<sub>2</sub>, sendo-lhes depois adicionados 50 µL de suspensão celular. As microplacas foram então incubadas nas mesmas condições anteriores por 96 horas. O título neutralizante foi definido como a mais alta diluição a apresentar soroneutralização; as amostras com título igual ou superior a 1:4 foram consideradas sorologicamente positivas.

#### Análise estatística

A comparação entre os dois testes foi realizada através do índice Kappa (Thrusfield 1999).

#### RESULTADOS

Do total de amostras estudadas, 161 (35,6%) foram consideradas reagentes à presença de anticorpos contra o BVDV pelo EIE, enquanto 150 amostras (33,2%) demonstraram a presença de anticorpos com título igual ou maior que 1:4 pela SN (Tabela 1). A variação dos coeficientes encontrados, em relação ao número de animais positivos, sobre o total colhido por propriedade variou de 0 a 62,5% (Tabela 2).

*Tabela 1.* Resultados obtidos na pesquisa dos 452 soros de bovinos de rebanhos leiteiros não vacinados, com histórico de problemas reprodutivos e procedentes de diferentes municípios do Estado de Goiás, para identificação de anticorpos contra o BVDV pelos testes de EIE e SN

Resultados Testes	Positivos		Negativos		Total	
	N	%	N	%	N	%
EIE	161	(35,6)	291	(64,4)	452	(100,0)
SN	150	(33,2)	302	(66,8)	452	(100,0)

A pesquisa de anticorpos em soros pareados foi realizada em 430 amostras, permitindo observar a soroconversão em 8,1% delas. Das 37

propriedades estudadas, 26 (70,3%) apresentaram pelo menos um animal sorologicamente positivo, e em 8 (80%) dos 10 municípios amostrados foram encontrados rebanhos com animais soropositivos.

**Tabela 2.** Resultados obtidos em relação aos rebanhos, animais e soroconversão na pesquisa dos soros de bovinos de rebanhos leiteiros não vacinados, com histórico de problemas reprodutivos, para a identificação de anticorpos contra o BVDV, do Estado de Goiás, Brasil (2001), discriminados de acordo com os municípios onde foram colhidas as amostras

Municípios	Rebanhos		Animais		Soroconversão*	
	Positivos/total	%	Positivos**/total	%	N/total	%
Anápolis	03 / 7	21,0	23 / 84	27,4	05 / 80	6,2
Caldas Novas	01 / 1	00,0	03 / 15	20,0	01 / 15	6,6
Catalão	02 / 7	14,0	06 / 62	9,7	01 / 62	1,6
Caturai	0 / 1	-	0 / 10	-	0 / 10	-
Goiás	01 / 1	00,0	03 / 18	16,7	01 / 16	6,2
Itaberaí	05 / 5	00,0	16 / 50	26,7	04 / 44	9,1
Morrinhos	08 / 8	00,0	67 / 107	62,6	16 / 103	15,5
Piracanjuba	05 / 5	00,0	31 / 73	42,5	07 / 67	10,4
Senador Canedo	0 / 1	-	0 / 20	-	0 / 20	-
Três Ranchos	01 / 1	00,0	01 / 13	7,7	0 / 13	-
TOTAL	26 / 37	70,3	150 / 452	33,2	35 / 430	8,1

\*Foram consideradas apenas as amostras analisadas pela SN. \*\* Amostras positivas no EIE e/ou SN.

A comparação entre os testes de EIE e SN permitiu observar que 281 amostras foram positivas e 140 foram negativas em ambos os testes (Tabela 3). O índice Kappa calculado foi de 0,84.

**Tabela 3.** Resultados comparativos entre o EIE e a SN para detecção de anticorpos anti-BVDV em amostras de soro sanguíneo de bovinos leiteiros não vacinados, com histórico de problemas reprodutivos, procedentes de diferentes municípios do Estado de Goiás, Brasil (2001)

TESTES	SN			
		Positivo	Negativo	Total
EIE	Positivo	140	21	161
	Negativo	10	281	291
	Total	150	302	452

## DISCUSSÃO

A frequência de 35,6%, encontrada no presente trabalho, difere dos coeficientes relatados por Vieira et al. (1999) e por Guimarães et al. (2000), que

observaram respectivamente 15,8% e 52,2% para o Estado de Goiás, e também dos apresentados por Langoni et al. (1995), Figueiredo et al. (1997), Krahal et al. (1997), Pellegrin et al. (1997) e Canal et al. (1998), em estudos sobre o BVDV em outros estados do Brasil.

Houe (1995) destaca que, apesar de a infecção pelo BVDV ocorrer em todo o mundo de uma forma endêmica, variações podem ser encontradas nos diferentes estudos devido a diferenças na estrutura populacional dos rebanhos, ao manejo e aos sistemas de criação. Além disso, fatores como densidade da população bovina, práticas de pastoreio e comércio de animais são descritos como de grande importância na instalação ou manutenção da infecção num rebanho (Houe 1999). Dessa forma seria de se esperar que não houvesse diferença significativa nos percentuais encontrados nos trabalhos realizados no Estado de Goiás por Vieira et al. (1999), já que apresentam população semelhante à deste trabalho. Entretanto, naquele estudo, diferente do que ocorre neste, os autores encontraram um elevado percentual de amostras que foram classificadas como inconclusivas, devido ao fato de não haver uma segunda amostra para confirmar o resultado positivo da amostra inicial em teste imunoenzimático, o que provavelmente elevaria o índice encontrado.

Apenas 8,1% dos animais estudados demonstraram soroconversão pela SN, indicando infecção aguda pelo BVDV, com variação de 0 até mais de 15% no índice, de acordo com o município onde foram colhidas as amostras. Esse dado pode estar refletindo o fato da elevada frequência encontrada no estudo, pois os animais chegam à idade adulta já infectados e, assim, poucos apresentam a infecção aguda. De acordo com Mainar-Jaime et al. (2001), o índice da infecção pelo BVDV é diretamente proporcional à idade. Segundo os autores, os animais podem infectar-se a partir da perda de anticorpos maternos, aos seis meses de idade, sendo de se esperar um índice maior de soroconversão entre animais mais jovens – que não foram avaliados nesta pesquisa.

O número de municípios e rebanhos com animais soropositivos encontrado no presente trabalho (70,3% e 80%, respectivamente) foi maior que o observado por Vieira et al. (1999), de 52% e 47,1% também para o Estado de Goiás. O trabalho desses autores foi desenvolvido no mesmo laboratório onde foram analisadas as amostras do presente trabalho, e a diferença encontrada entre os resultados de ambos pode inicialmente indicar um aumento dos índices da infecção tanto de rebanhos quanto de municípios no período. Cabe ressaltar, entretanto, que no trabalho de Vieira et al. (1999) não foi possível obter a amostra pareada dos soros pesquisados, não sendo, portanto, confirmado como reagente um elevado índice de amostras. Índices igualmente elevados também foram encontrados em outros estados do Brasil (Krahal et al. 1997; Pituco et al. 1997), o que revela um alto percentual de exposição dos rebanhos nacionais ao BVDV e a importância da implementação de programas de controle para o vírus (Luzzago et

al. 1999). De modo semelhante ao observado por Canal et al. (1998) e por Guimarães et al. (2000), o índice de animais reagentes por propriedade variou de 0 a 100%.

Era de se esperar a diferença nos índices de prevalência da infecção de acordo com a técnica utilizada, que, aliás, já havia sido mostrada anteriormente (Bock et al. 1986; Canal et al. 1998; Guimarães et al. 2000). Entretanto o coeficiente Kappa encontrado corrobora a afirmação de que ambas as técnicas podem ser utilizadas para o diagnóstico sorológico do BVDV.

Guimarães et al. (2000), em estudo realizado no entorno de Goiânia, apontam a ampla disseminação da infecção pelo BVDV. Essa observação é comprovada pelos dados obtidos no presente trabalho, segundo o qual a infecção ocorre não só na região de Goiânia, mas também em outros municípios do Estado de Goiás. Como afirmam Guimarães et al. (2000), esse resultado é preocupante, pois, como em tais regiões não é adotada a vacinação no manejo sanitário dos rebanhos, o status sorológico é exclusivo de infecções naturais.

#### AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Prof. Dr. Eduardo Furtado Flores, da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), pela cessão da linhagem celular e pela amostra viral padrão; à equipe da Pfizer Ltda, Divisão de Saúde Animal, pela indicação das propriedades e pela colheita de amostras.

Auxílio financeiro: CNPq (Processo 521058/99-6)

#### ABSTRACT

**Bovine viral diarrhea virus: antibody detection in bovine females, not vaccinated, with reproductive disorders of dairy herds, in the State of Goiás, Brazil**

The aim of this study was to detect antibodies against bovine viral diarrhea virus (BVDV) among cows without BVDV vaccination from dairy herds with reproductive disorders in State of Goiás, Brazil. Two tests were used, a commercial blocking ELISA (Herd Check™ IDEXX) and serum neutralization (SN) with two hours virus-serum incubation period. From the total of the samples 35,2% were seropositive by ELISA and 34,5% were positive by SN test. Four hundred and thirty four samples of paired serum were collected and concomitant analysis of both samples allowed the identification of 8,0% of seroconversion. The samples were picked from 37 herds of 10 districts of Goiás. From those, 70,3% herds and 80,0% districts presented at least one seropositive animal. The simultaneous analysis of the samples by ELISA and SN demonstrated an almost perfect agreement rate ( $\kappa = 0,84$ ) between the tests, in agreement to Thrusfield (1999).

**KEYWORDS:** Bovines. Bovine viral diarrhea virus. Occurrence. ELISA. Serum neutralization.

## REFERÊNCIAS

1. Baker C. The clinical manifestations of bovine viral diarrhoea infection. *Vet Clin North Am* 11:425-443, 1995.
2. Bock RE, Burgess GW, Douglas IC. Development of an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of bovine serum antibody to bovine viral diarrhoea virus. *Aust Vet J*, 63:406-408, 1986.
3. Canal CW, Strasser M, Hertiz C, Masuda A, Peterhans E. Detection of antibodies to bovine diarrhoea virus (BVDV) and characterization of genomes of BVDV from Brazil. *Vet Microbiol* 63:85-97, 1998.
4. Castro, RS, Melo, LEH, Abreu, SRO, Muniz, AMM, Albuquerque, APS. Anticorpos neutralizantes contra *Pestivirus* em soros bovinos do Estado de Pernambuco. *Pesq Agropec Bras* 28: 1327-1331, 1993.
5. Donis RO. Molecular biology of bovine viral diarrhoea virus and its interactions with the host. *Vet Clin North Am* 11: 393-423, 1995
6. Figueiredo HCP, Vieira PR, Lage AP, Leite, RC. Prevalência de anticorpos contra o vírus da diarréia bovina e vírus em Minas Gerais, Brasil. *Rev Bras Reprod An*, 21:11-15, 1997.
7. Guimarães PLSN, Chaves NST, Silva LAF, Acyprestes CS. Frequência de anticorpos contra o vírus da diarréia viral bovina em bovinos do entorno de Goiânia, em regime de criação semi-extensivo. *Ciência Animal Brasileira* 1: 137-142, 2000.
8. Houe H. Epidemiology of bovine viral diarrhoea virus. *Vet Clin North Am* 11:521-547, 1995.
9. Houe H. Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections. *Vet Microbiol* 64:89-107, 1999.
10. Krahal M, Braga AC, Oliveira LG, Neto JASP, Prado JAP, Rosa JCA, Júnior W 1997. Pesquisa de anticorpos para Leptospirose, rinotraqueíte infecciosa bovina e diarréia viral bovina em soros bovinos de propriedades rurais do Rio Grande do Sul. Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 25, 1997, Gramado. *Anais Soc Bras Med Vet*, 1997. INF 75, p. 174.
11. Langoni H, Paes AC, Tonin FB, Silva AV, Denard MB 1995. Prevalence of BVD, IBR and P13 in bovine by ELISA test. In: *Virologica*, 1995, Ribeirão Preto. Resumos... Ribeirão Preto: *Soci Bras Virol* n.43. p.5
12. Luzzago C, Piccinini R, Zepponi A, Zecconi A. Study on prevalence of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) antibodies in 29 Italian dairy herds with reproductive problems. *Vet Microbiol* 64: 274-282, 1999.
13. Mainar-Jaime RC, Berzal-Herranz B, Arias P, Rojo-Vásquez FA. Epidemiological pattern and risk factors associated with bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection in a non-vaccinated dairy cattle population from the Asturias region of Spain. *Prev Vet Med* 52: 63-73, 2001.
14. Obando C, Baule C, Pedrique C, Veracierta C, Belak S, Merza M, Lopez JM. Serological and molecular diagnosis of bovine viral diarrhoea virus and evidence of other viral infections in dairy calves with respiratory disease in Venezuela. *Acta Vet Scand* 40: 253-262, 1999.
15. Office International Des Epizooties (OIE). International Animal Health Code. *Manual of standards*, 2001.
16. Pellegrin AO, Sereno, JRB, Leite RC. Seropositivity to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) in Zebu cows in the Brazilian Pantanal. *Arq Med Vet Zootec* 49: 375-377, 1997.
17. Pituco EM, Del Fava C, Okuda LH. Prevalência da infecção pelo vírus da diarréia viral bovina (BVDV) em búfalos (*Bubalus bubalis*) no Vale do Ribeira, SP, Brasil. *Arq Inst Biol* 64: 23-28, 1997.



18. Schreiber P, Dubois F, Dreze F, Lacroix N, Limboyrg B, Coppe PH. Prevalence of bovine virus diarrhoea virus infection Belgian White Blue cattle in Southern Belgium. *Vet Quart* 21: 28-32, 1999.
19. Soares LA; Pereira DAC. Neutralizing antibodies against bovine viral diarrhoea virus – mucosal disease in cattle sera from São Paulo, Brazil. *Rev Microbiol* 5: 1-5, 1974.
20. Thiel HJ, Plagemann PGW, Moennig V. Pestivirus. In: Fields DM, Knipe DM, Howley, PM. *Fields Virology*. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. 1996.
21. Thrusfield M. Veterinary Epidemiology. *Black Scienc* 2: 472-483, 1999.
22. VanLeeuwen JA; Keefe GP; Tremblay R; Power C; Wichtel JJ. Seroprevalence of infection with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, bovine leukemia virus, and bovine viral diarrhoea virus in maritime Canada dairy cattle. *Can Vet J* 42: 193-198, 2001.
23. Vieira S, Dias F<sup>o</sup>FC, Queiroz DAO, Brito WMED. Herpesvirus-1 (BHV-1) and bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in cattle from Goiás, Brazil. *Virus Review and Research* 4:59, 1999.
24. Wizigmann G, Vidor T, Ricci ZMT. Investigações sorológicas sobre ocorrência e incidência dos vírus P13, rinotraqueíte infecciosa e da diarréia à vírus-enfermidade das mucosas dos bovinos, no Estado do Rio Grande do Sul. *Anais. IPVDF*, 1971.