

ANTICORPOS PARA O HERPESVÍRUS BOVINO 1 (BHV-1) EM BOVINOS DO ESTADO DE GOIÁS*

SARA VIEIRA², WILIA MARTA ELSNER DIEDERICHSEN DE BRITO¹, WESLEY JOSÉ SOUZA²,
BERNARDETE T. ALFAIA² E DANIEL CORREIA LIMA LINHARES³

* Suporte financeiro - CNPq (Proc. 521058/99-6)

1. Setor de Microbiologia, IPTSP, UFG, Rua Delenda Resende de Melo s/n. Setor Universitário, CEP 74605-050, Goiânia, Goiás.

2. Mestrados do Programa de Mestrado em Medicina Tropical, área de concentração: Microbiologia.

3. Bolsista de Iniciação Científica do CNPq (Proc.521058/99-6).

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo identificar anticorpos para o herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1) em soros de bovinos de municípios do estado de Goiás. Foram pesquisados 790 soros de bovinos, através do ensaio imunoenzimático (EIE), utilizando-se um *kit* comercial. As amostras eram, em sua maioria (75,3%), provenientes de animais e propriedades (n=90) com problemas reprodutivos, incluindo rebanhos de leite, corte e misto, distribuídas em 40 municípios do estado. A frequência encontrada foi de 83%. Rebanhos de exploração leiteira apresentaram um índice de soropositividade estatisticamente maior que o de rebanhos de corte ou misto ($p < 0,01$). Das 90 propriedades incluídas neste estudo, 96,7% apresentaram animais positivos e 97,5% dos 40 municípios apresentaram pelo menos um animal soropositivo. Os resultados aqui encontrados demonstram

a presença do BHV-1 no estado de Goiás. Amostras pareadas obtidas de 420 bovinos foram analisadas pelo teste de soroneutralização com uma hora de incubação do soro teste com o vírus padrão – amostra Cooper, ATCC-VR 864. Desses soros, 7,8% (n=33) demonstraram soroconversão indicando infecção aguda. A comparação entre o EIE e a SN-1 como método de diagnóstico para o BHV-1 demonstrou uma concordância substancial ($k=0,68$). Amostras que apresentaram resultados discrepantes no EIE e SN foram analisadas utilizando-se duas, quatro e vinte e quatro horas de incubação vírus-soro e permitiram observar um aumento na sensibilidade do teste conforme o aumento do período de incubação, sugerindo, assim, a utilização de maior período de incubação vírus-soro para o diagnóstico sorológico das infecções causadas pelo BHV-1.

PALAVRAS-CHAVE: Bovinos, herpesvírus bovino tipo 1, frequência, ensaio imunoenzimático, soroneutralização.

SUMMARY

ANTIBODIES TO BOVINE HERPESVIRUS TYPE 1 (BHV-1) IN CATTLE SERA FROM GOIÁS, BRAZIL

This study was conducted to detect antibodies to BHV-1 in cattle sera from some counties from State of Goiás, Brazil. Seven hundred and ninety (790) bovine serum samples were tested through a commercial enzyme immunosorbant assay (ELISA). The samples were in the majority (75.3%) from cattle with clinical signs associated to reproductive problems. The sera were collected from 90 properties including dairy, beef and mixed herds, distributed in 40 counties of Goiás. The positiveness rate for BHV-1 was 83.0%. Dairy cattle showed a higher rate than beef cattle ($p < 0.01$). Within the properties included in this study, 96.7% presented positive animals and 97.5% of the counties presented at least one positive animal. Paired sera were

obtained from 420 samples and they were also tested by serum neutralization test (SN) with one hour of virus-serum incubation period. Only 7.8% (n=33) of the samples showed seroconversion, indicating acute infection. The samples that showed discrepant results between the ELISA and SN (n=46), were retested by SN using different virus-serum incubation periods. There was an increasing in the detection of positive samples while the incubation virus-serum increase. These results demonstrated that BHV-1 is circulating in the State of Goiás and suggests that a 24 hours virus incubation period must be used in the serum neutralization test for BHV-1 diagnosis.

KEY WORDS: Bovine herpesvírus type 1, antibodies, ELISA, serum neutralization.

INTRODUÇÃO

O herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1) é um importante patógeno de bovinos, podendo causar doença respiratória, conhecida como rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), além de conjuntivite, balanopostite infecciosa bovina (IPB), vulvovaginite infecciosa bovina (IPV), reabsorção embrionária, aborto, infertilidade temporária, nascimento de animais fracos e mortalidade de neonatos (VAN DONKERSGOED & BABIUK, 1991). O BHV-1 é membro da família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*, gênero *Varicellovirus*. Como todos os herpesvírus, o BHV-1 é capaz de estabelecer latência no hospedeiro natural (ROIZMANN et al., 1992), podendo ser reativado por uma ampla variedade de estímulos. A reativação leva à excreção de partículas infecciosas, com ou sem sinais clínicos, e é, portanto, responsável pela perpetuação e transmissão do vírus na população bovina (PASTORET & THIRY, 1985; TIKOO et al., 1995).

Os métodos de diagnóstico laboratorial incluem isolamento viral, identificação direta de antígenos virais, pesquisa de anticorpos contra o vírus e do ácido nucléico viral (OIE, 2002). Os testes mais utilizados e recomendados pela OIE para a pesquisa de anticorpos são a soroneutralização (SN) e o ensaio imunoenzimático (EIE) (ACKERMAN et al., 1990). Inquéritos sorológicos realizados em alguns estados indicam que o vírus está amplamente disseminado no Brasil (VIDOR et al., 1995; MÉDICI et al., 2000a; ROCHA et al., 2001). No estado de Goiás, ANUNCIÇÃO et al. (1989) observaram uma soropositividade para o BHV-1 de 85,7%, entretanto, foram amostrados apenas 56 animais no município de Rio Verde, sudoeste do estado.

Este trabalho teve como objetivos identificar anticorpos contra o BHV-1 em bovinos de alguns municípios do estado de Goiás, através do ensaio imunoenzimático e da prova de soroneutralização, comparando-se as duas técnicas como método de diagnóstico sorológico para BHV-1. Além disso, examinaram-se algumas características epidemiológicas da infecção no estado.

MATERIAL E MÉTODOS

AMOSTRAGEM

Foram colhidas 790 amostras de soro sanguíneo de bovinos de 90 propriedades distribuídas em 40 municípios do estado de Goiás, durante os períodos de outubro de 1998 a setembro de 1999 e maio a setembro de 2000. Dados referentes ao sexo, idade e aptidão dos animais, bem como o tipo de exploração e utilização ou não de vacina para o BHV-1 foram anotados. De 420 animais foi obtida uma segunda amostra de soro aproximadamente 30 dias após a primeira colheita. Todas as amostras foram obtidas por vasopunção da veia jugular externa ou veia sacral média, utilizando-se sistema Vacunteiner (Becton-Dickinson). As amostras foram centrifugadas a 744 x g por 10 minutos e os soros inativados em banho-maria a 56° C por 30 minutos e estocados a -20°C até o momento da realização dos testes.

TESTES SOROLÓGICOS

Todas as 790 amostras de soro foram analisadas através do EIE indireto Herd Checkâ Anti-IBR (IDEXX), conduzido de acordo com o recomendado pelo fabricante.

As 420 amostras de soro pareadas foram analisadas também por soroneutralização (SN) de acordo com o descrito por HOUSE & BAKER (1971) e BITSCH (1978). A SN foi realizada em microplacas (Corning/Costar ref. 3595), e para o procedimento foi utilizada a linhagem contínua Madin-Darby *bovine kidney* (MDBK, ATCC CCL-22), cultivada em meio essencial mínimo de Eagle com sais de Earle (MEM; Gibco BRL), suplementado com 6% de soro fetal bovino (SFB; Sigma) e acrescido de 20 mg/L de gentamicina e 2,5 mg/L de anfotericina B. Como antígeno foi utilizada amostra padrão Cooper do BHV-1 (ATCC-VR 864). Para evitar resultados falsos, foram feitos controles de célula, de vírus e de citotoxicidade dos soros em cada microplaca.

Inicialmente, o tempo de incubação vírus-soro utilizado foi de uma hora a 37°C (SN-1). Amostras que demonstraram resultados discrepantes nas duas técnicas, ou seja, resultados positivos no EIE, mas negativos na SN, foram testadas utilizando-se duas (SN-2), quatro (SN-4) e vinte e quatro horas (SN-24) de incubação da mistura vírus-soro, mantendo-se a temperatura de incubação de 37°C.

ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O qui-quadrado foi aplicado quando apropriado. A comparação entre as duas técnicas para a pesquisa sorológica do BHV-1 foi analisada pela determinação do índice *kappa* (THRUSFIELD, 1999).

RESULTADOS

As características da população analisada no presente estudo estão demonstradas nas Tabelas 1 e 2. A maioria das amostras testadas era de fêmeas com mais de 24 meses e de rebanhos leiteiros. Em nenhuma das propriedades amostradas era efetuada a vacinação contra o BHV-1.

A análise das 790 amostras pelo EIE demonstrou que 656 (83%) eram soropositivos para o BHV-1. A maior frequência de positivos em relação ao sexo foi encontrada entre as fêmeas (88,9%) e em

relação à idade, em animais com idade superior a 24 meses (Tabela 3). De acordo com a aptidão, a maior frequência dos animais soropositivos foi observada em animais de exploração leiteira (73,8%) (Tabela 2).

Das 90 propriedades incluídas neste estudo, 96,7% apresentaram animais soropositivos para o vírus, sendo que, dos rebanhos com animais soropositivos, 74,7% eram leiteiros, 11,5% de corte e 8,1% de exploração mista (Tabela 4). Dos 40 municípios onde foram colhidas amostras, 97,5% apresentaram pelo menos um animal soropositivo.

Das 420 amostras testadas pela SN, 317 (75,5%) foram soropositivas, e o teste dos soros pareados permitiu verificar soroconversão em 7,8% das amostras.

Entre os soros testados pelo EIE e pela SN-1, 72,4% (n=304) foram positivos e 16,2% (n=68) foram negativos em ambos os testes. O EIE detectou 46 soros positivos que não foram detectados pela SN. No entanto, a SN detectou apenas dois soros positivos não detectados pelo EIE (Tabela 5). O índice *kappa* para os dois testes foi de 0,68. A análise dos 46 soros com resultados discrepantes entre o EIE e a SN-1 e que foram testados com diferentes períodos de incubação demonstrou um aumento no índice *kappa* para 0,74; 0,78 e 0,90 após, respectivamente, duas, quatro e vinte e quatro horas de incubação.

TABELA 1. Distribuição das 790 amostras testadas por ensaio imunoenzimático para a pesquisa de anticorpos contra o herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1) em rebanhos do estado de Goiás, de acordo com o sexo e a idade.

Sexo \ Idade	6 – 12 meses		12 - 24 meses		> 24 meses		Não informada		Total	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)
Macho	-	-	-	-	21	(2,6)	2	(0,3)	23	(2,9)
Fêmea	-	-	12	(1,5)	548	(69,3)	149	(18,9)	709	(89,7)
Não informado	9	(1,1)	-	-	14	(1,8)	35	(4,5)	58	(7,4)
Total	9	(1,1)	12	(1,5)	583	(73,7)	186	(23,7)	790	(100,0)

TABELA 2. Número e percentagem de animais positivos e negativos para anticorpos contra o herpesvírus bovino tipo1 (BHV-1) por ensaio imunoenzimático, distribuídos de acordo com o tipo de exploração.

Tipo de exploração	Animais positivos		Animais negativos		Total	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)
Leite	484	(73,8)	108	(80,6)	592	(74,9)
Corte	64	(9,7)	17	(12,7)	81	(10,2)
Não informada	108	(16,5)	9	(6,7)	117	(14,9)
Total	656	(100)	134	(100)	790	(100,0)

TABELA 3. Distribuição das amostras positivas para anticorpos contra o herpesvírus bovino tipo1 (BHV-1), por ensaio imunoenzimático, em relação à faixa etária e sexo.

Sexo \ Idade	6 - 12 meses		12 - 24 meses		> 24 meses		Não informada		Total	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)
Macho	-	-	-	-	20	(3,1)	1	(0,1)	21	(3,2)
Fêmea	-	-	9	(1,4)	453	(69,1)	121	(18,4)	583	(88,9)
Não informado	1	(0,1)	-	-	14	(2,2)	37	(5,6)	52	(7,9)
Total	1	(0,1)	9	(1,4)	487	(74,4)	159	(24,1)	656	(100,0)

TABELA 4. Distribuição percentual das propriedades amostradas com animais soropositivos para herpesvírus bovino tipo1 (BHV-1) no estado de Goiás, em relação ao tipo de exploração.

Tipo de exploração	Propriedades			
	Amostradas		Com animais soropositivos	
	n	%	n	%
Leite	67	(75,5)	65	(74,7)
Corte	10	(11,1)	10	(11,5)
Mista	7	(7,8)	7	(8,1)
Não informada	5	(5,6)	5	(5,7)
Total	90	(100,0)	87	(100,0)

TABELA 5. Comparação entre os resultados dos testes de soroneutralização e ensaio imunoenzimático para detectar anticorpos contra o BHV-1 em bovinos do estado de Goiás.

	SN		Total
	Positivo	Negativo	
EIE* Positivo	304	46	350
EIE* Negativo	2	68	70
Total	306	114	420

*Ensaio imunoenzimático

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A frequência de 83,0% de soropositivos obtida neste trabalho através do EIE aproxima-se da obtida por ANUNCIACÃO et al. (1989), que encontraram anticorpos em 85,7% das amostras provenientes do município de Rio Verde, GO. Os dados assemelham-se também aos obtidos por RAVAZZOLO et al. (1989) no Rio Grande do Sul. Outros autores encontraram índices menores do que os aqui descritos (LOVATO et al., 1995; MÉDICI et al., 2000a; ROCHA et al., 2001). Essas diferenças nos índices de soropositividade talvez possam ser explicadas pelo tipo de população bovina utilizada, pelo uso de diferentes técnicas de amostragem, de diagnóstico laboratorial e por diferenças regionais (LOVATO et al., 1995; PITUCO & DEL FAVA, 1998).

Apesar de VIDOR et al. (1995) comentarem que não há diferença na frequência da infecção de acordo com o tipo de exploração, no presente estudo ela pôde ser observada, cuja infecção mais frequente é em animais leiteiros. Isso talvez possa ser explicado pela maior aglomeração a que animais de exploração leiteira são submetidos. Diferentemente, entretanto, foi observado por MÉDICI et al., (2000a), que observaram maior frequência em animais de corte.

Os dados encontrados no presente trabalho estão de acordo com o observado por LOVATO et al. (1995), segundo os quais os índices de positividade para o BHV-1 são diretamente proporcionais à idade.

Semelhante ao descrito por outros autores (RAVAZZOLO et al., 1989; LOVATO et al., 1995; MÉDICI et al., 2000a; ROCHA et al., 2001), uma elevada frequência das propriedades (96,7%) e dos municípios incluídos (97,5%) neste trabalho apresentava animais soropositivos. A soropositividade para o BHV-1 em um rebanho indica a presença de portadores do vírus que podem potencialmente atuar como fonte de infecção para animais susceptíveis, assegurando a permanência da infecção no plantel, além de causarem prejuízos econômicos por causa da queda na produtividade (TIKOO et al., 1995). Nesse sentido, a avaliação sorológica é particularmente importante para

identificação de animais/rebanhos que possam estar eliminando o vírus no meio ambiente e é o primeiro passo nos programas de controle e erradicação, nos quais bovinos infectados devem ser detectados e removidos da população (VAN OIRSCHOT, 1998). Os resultados aqui apresentados demonstram que a infecção está difundida no estado de Goiás, além de mostrar um preocupante índice de animais sorologicamente positivos nas propriedades e que indicam a necessidade da introdução de medidas de profilaxia e controle da infecção.

A análise das amostras pareadas demonstrou que apenas 7,8% dos animais apresentaram soroconversão, indicando, assim, infecção em fase aguda.

Estudos realizados por diferentes autores atestam que os testes de NS e EIE apresentam sensibilidade e especificidade semelhantes (PERRIN et al., 1993; TEIXEIRA, 1998; MÉDICI et al., 2000b). No presente estudo, os soros foram inicialmente analisados pelo teste imunoenzimático e pela SN com um período de incubação vírus-soro de uma hora. DEREGT et al. (1993) afirmaram que o aumento do tempo de incubação aumenta a sensibilidade do teste, podendo-se obter um número maior de resultados positivos. Como, no presente estudo, 46 amostras apesar de reagentes pelo EIE foram negativas pela SN com uma hora de incubação, o aumento no período de incubação resultou um aumento no número de amostras positivas identificadas, indicando que, quando não houver possibilidade de utilização do *kit* imunoenzimático comercial para análise dos soros, o diagnóstico de animais soropositivos para o BHV-1, com maior sensibilidade, deve ser feito pela SN, utilizando-se um período de incubação vírus-soro de 24 horas.

AGRADECIMENTOS

Ao professor doutor Paulo Michel Roehle, do Centro de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor - RS (PVDF), pela consultoria técnica e por ceder a linhagem celular e a amostra viral padrão; à equipe da Pfizer Ltda., Divisão de Saúde Animal, pela indicação das propriedades e colheita de amostras, e à professora doutora Divina das Dores de Paula Cardoso, pela revisão do manuscrito.

REFERÊNCIAS

- ACKERMANN, M.; BELAK, S.; BITSCH, V.; EDWARDS, S.; MOUSSA, A.; ROCKBORN, G.; THIRY, E. Round table on infectious bovine rhinotracheitis/infecious pustular vulvovaginitis virus infection diagnosis and control. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 23, p. 361-363, 1990.
- ANUNCIACÃO, A. V. M.; LEITE, R. C.; MOREIRA, E. C.; REIS, R. Presença de anticorpos para o herpesvírus bovino 1 (BHV-1) em bovinos nos estados de Minas Gerais, Goiás e Rio de Janeiro através da prova de hemoaglutinação passiva. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 41, n. 5, p. 433-441, 1989.
- BITSCH, V. The P37/24 Modification of the Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus-Serum Neutralization Test. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 19, p. 497-505, 1978.
- DEREGT, D.; CHO, H. J.; KOZUB, G. C. A comparative evaluation of two sensitive serum neutralization tests for bovine herpesvirus-1 antibodies. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 57, p. 56-59, 1993.
- HOUSE, J. A.; BAKER, J. A. Bovine herpesvirus IBR-IPV. The antibody virus neutralization reaction. **The Cornell Veterinarian**, p. 320-335, 1971.
- LOVATO, L. T.; WEIBLEN, R.; TOBIAS, F. L.; MORAES, M. P. Herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1): inquérito soro-epidemiológico no rebanho leiteiro do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 25, n. 3, p. 425-430, 1995.
- MÉDICI, K. C.; ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F. Prevalência de anticorpos neutralizantes contra o herpesvírus bovino tipo 1, decorrentes de infecção natural, em rebanhos com distúrbios reprodutivos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 3, p. 347-350, 2000a.
- MÉDICI, K. C.; ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F. Ensaio imunoenzimático comercial no diagnóstico sorológico das infecções por herpesvírus bovino 1. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 3, p. 343-346, 2000b.
- OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE). **International Animal Health Code**. Manual of standards. Disponível em: <<http://oie.int/norms/mmanual>>. Acesso em: 21 mar. 2002.
- PASTORET, P. P.; THIRY, E. Diagnosis and Prophylaxis of Infectious Bovine Rhinotracheitis: the Role of Virus Latency. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, Great Britain, v. 8, n. 1, p. 35-42, 1985.
- PERRIN, B.; BITSCH, V.; CORDIOLI, P.; EDWARDS, S.; ELOIT, M.; GUÉRIN, B.; LENIHAN, P.; PERRIN, M.; RONSHOLT, L.; VAN OIRSCHOT, J. T.; VANOPDENBOSCH, E.; EWLLEMANS, G.; WIZIGMANN, G.; THIBIER, M. A. European comparative study of serological methods for the diagnosis of infectious bovine rhinotracheitis. **Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties**, v. 12, n. 3, p. 969-984, 1993.
- PITUCO, E. M.; DEL FAVA, C. Situação do BHV-1 na América do Sul. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE HERPESVÍRUS BOVINO (TIPO 1 E 5) E VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA (BVDV), 1998, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria, 1998. p.75-87.
- RAVAZOLLO, A. P.; DALPIZZOL, M.; MOOJEN, V. Evidência da presença de anticorpos para o vírus da rinotraqueíte infecciosa dos bovinos em bovinos de alguns municípios do estado do Rio Grande do Sul, Brasil, 1986. **Arquivos da Faculdade de Veterinária – UFRGS**, v. 17, p. 89-95, 1989.
- RIET-CORREA, F.; MOOJEN, V.; ROEHE, P. M.; WEIBLEN, R. Viroses confundíveis com febre aftosa. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 26, n. 2, p. 323-332, 1996.
- ROCHA, M. A.; GOUVEIA, A. M. G.; LOBATO, R. C. Pesquisa de anticorpos para IBR em amostragem de demanda no estado de Minas Gerais, 1990-1999. **Arquivo Brasileiro de Medicina**

na **Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 6 p. 645-647, 2001.

ROIZMANN, B.; DESROSIERS, R. C.; FLECKENSTEIN, B.; LOPEZ, C.; MINSON, A. C.; STUDDERT, M. J. The family *Herpesviridae*: an update. **Archives of Virology**, New York, v. 123, n. 3-4, p. 425-449, 1992.

TEIXEIRA, M. F. B. **Um ensaio imunoenzimático com anticorpo monoclonal para o diagnóstico sorológico de infecções pelo herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1)**. 1998. 56p. Tese (Mestrado) – Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre.

THRUSFIELD, M. **Veterinary Epidemiology**. 2nd.ed. Oxford: Blackwell Science, 1999.

TIKOO, S. K.; CAMPOS, M.; BABIUK, L. A. Bovine herpesvirus 1 (BHV-1): biology,

pathogenesis, and control. **Advances in Virus Research**, San Diego, v. 45, p. 191-223, 1995.

VAN DONKERSGOED, J.; BABIUK, L. A. Diagnosing and managing the respiratory form of infectious bovine rhinotracheitis. **Veterinary Medicine**, v. 86, n. 1, p. 86-94, jan. 1991.

VAN OIRSHCOT, J. T. The BHV-1 Situation in Europe. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE HERPESVÍRUS BOVINO (TIPOS 1 E 5) E VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA (BVDV), 1998, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria, 1998. p. 69-72.

VIDOR, T.; HALVEN, D. C.; LEITE, T. E.; COSWIG, L. T. Herpes bovino tipo 1 (BHV-1): I. Sorologia de rebanhos com problemas reprodutivos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 25, n. 3, p. 421-424, 1995.