

HERPES BOVINO TIPO 1 (BHV 1): I. SOROLOGIA DE REBANHOS COM PROBLEMAS REPRODUTIVOS¹

BOVINE HERPESVIRUS TYPE 1 (BHV-1): I. SEROLOGIC SURVEY IN HERDS WITH REPRODUCTIVE PROBLEMS

Telmo Vidor² Daniza Coelho Halfen³ Tisa Echevarria Leite⁴
Lia Treptow Coswig⁴

RESUMO

A presença de anticorpos neutralizantes contra o BHV-1, foi pesquisada pelo teste de soroneutralização (SN) em 2.341 soros, dos quais 747 apresentaram resultado positivo, representando 31,9% de bovinos infectados pelo BHV-1. Os soros foram enviados de 112 propriedades da Região Sul, sendo na maioria rebanhos de gado de corte com problemas reprodutivos. Foram detectados bovinos sorologicamente positivos em 80 propriedades, representando 71,3%, demonstrando a expressiva disseminação do vírus nos rebanhos desta região.

Palavras-chave: BHV-1, sorologia, soroneutralização.

SUMMARY

Serum antibodies against BHV-1 were studied, by the serum neutralization test, in cattle from Southern Brazil. Samples were collected from 2341 cattle from 112 farms

that had reproduction problems. Positive results were obtained in 747 (31.9) cattle from 80 (71.31%) farms, given evidence of the expressive virus dissemination in cattle from this region.

Key words: BHV-1, serum neutralization test, serology.

INTRODUÇÃO

O Herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1) pertencente a família Herpesviridae, é o agente etiológico da IBR/IPV (Rinotraqueíte Infecciosa Bovina / Vulvovaginite Pustular Infecciosa), infecções virais contagiosas de rebanhos bovinos, que afetam principalmente o trato respiratório e genital podendo provocar abortos (KAHRS, 1977). O BHV-1 causa também balanopostite pustular, conjuntivite, encefalite, doença sistêmica do recém-nascido e enterite (FENNER et al., 1987).

A infecção pelo BHV-1 está associada a perdas significativas na eficiência reprodutiva, produção de leite e conversão alimentar (KAHRS, 1977).

¹Trabalho realizado no Laboratório de Virologia e Imunologia da Faculdade de Veterinária - UFPel.

²Médico Veterinário, Professor Adjunto, Doutor, Laboratório de Virologia e Imunologia - Faculdade de Veterinária, 96010-900 - Pelotas, RS. Autor para correspondência.

³Médico Veterinário, Professor Auxiliar, Faculdade de Veterinária - UFPel.

⁴Médico Veterinário, bolsista de aperfeiçoamento CNPq/FAPERGS.

As amostras de vírus isoladas de rebanhos com IBR/IPV têm comportamento sorológico idêntico (GILLESPIE, et al., 1959) entretanto, as cepas de BHV-1 foram divididas em três subtipos, conforme análise dos perfis de restrição enzimática do genoma de várias amostras do vírus: BHV-1.1, associado com doença respiratória; BHV-1.2a e BHV-1.2b associados com doença genital (METZLER et al., 1985). Posteriormente as amostras encefálicas foram classificadas como BHV-1.3 (METZLER, et al., 1986). Atualmente, alguns autores sugerem classificar as amostras encefálicas como um novo tipo de Alphaherpesvírus, o BHV-5 (MAGIAR et al., 1993).

O BHV-1 estabelece infecção latente nas células do sistema nervoso central podendo ser periodicamente reativado sob condições de estresse ou terapia com corticóides, com liberação de partículas virais (ACKERMANN et al., 1982) resultando na disseminação do patógeno a bovinos suscetíveis.

Os animais infectados pelo BHV-1, portadores permanentes do vírus, podem ser identificados por testes sorológicos através da detecção de anticorpos específicos.

A resposta imune humoral, usualmente medida por soroneutralização (SN), tem servido como indicador da infecção e também do estado imunológico contra o BHV-1 (KAHRS, 1977).

O teste de SN é altamente específico e confiável para a detecção de anticorpos contra o BHV-1. Os animais positivos apresentam títulos médios entre 8 e 64, ocasionalmente são registrados títulos mais altos e alguns animais parecem desenvolver títulos de anticorpos muito baixos ou não detectáveis (GIBBS & RWEYEMAMU, 1977). A produção de anticorpos contra o BHV-1 pode ser detectada aproximadamente entre 8 a 12 dias pós-infecção, podendo persistir até 5 anos. Durante a fase primária da infecção são detectados anticorpos, IgM e IgG1 e na fase secundária IgG1 e IgG2 (GUY & POTGIETER, 1985).

A importância da avaliação sorológica no diagnóstico da infecção pelo HVB-1 é evidente pois demonstra a distribuição geográfica do vírus. A implantação de um programa de controle para IBR/IPV está diretamente relacionada com a prevalência da infecção em determinadas regiões. Por isso, é importante a informação de surtos da doença com isolamento do vírus e o conhecimento da situação sorológica dos rebanhos, que traduz o nível de infecção dos bovinos pelo BHV-1 (HALFEN, & FERRARI, 1994).

O presente trabalho relata os resultados obtidos nos testes de SN contra BHV-1 em 2341 amostras de soros recebidas pelo Laboratório de Virologia e Imunologia da Faculdade de Veterinária no período de 1990 a 1995.

MATERIAL E MÉTODOS

Células: Foram utilizadas as células de linhagem de rim de bovino Madin & Darby Bovine Kidney, MDBK,

cultivadas em garrafas de Roux com meio Eagle, suplementado com 10% de soro fetal e acrescentados os antibióticos nas concentrações usuais.

Antígeno: A amostra de BHV-1 utilizada nos testes de SN foi a cepa padrão Los Angeles (ATCC - Rockville, Maryland, USA) com título de $10^{6.50}$ DICT 50%/25 μ l, multiplicada em MDBK. As suspensões tituladas foram distribuídas em alíquotas e estocadas a -70°C .

Titulação: As amostras de vírus foram tituladas em microplaca pelo método da diluição final, partindo de 10^{-1} a 10^{-8} , usando-se 4 pocinhos para cada diluição e o título calculado pelo método de Behrens & Kaerber, (MAYR et al., 1982), tomando por base a presença/ausência de efeito citopático (ECP).

Soros: Os 2341 soros foram recebidos de 112 propriedades da Região Sul, incluindo uma de São Paulo, uma do Uruguai e uma da Argentina. A maioria das propriedades eram de rebanhos de gado de corte, com problemas reprodutivos, tais como, retorno ao cio, abortos, infertilidade e lesões do trato genital. Os soros foram centrifugados a 1500rpm durante 15 minutos, inativados em banho-maria a 56°C por 30 minutos, distribuídos em cartelas especiais e mantidos em -20°C , até o momento do uso.

Soroneutralização: Os testes de soroneutralização foram realizados em microplaca de fundo chato. Cada soro testado foi diluído 1:2 e 1:4, partindo de 25 μ l de soro em 25 μ l de meio Eagle com 10% de soro fetal. A seguir foi distribuído em cada pocinho com soro, 25 μ l de vírus previamente diluído contendo 100DI 50% por 25 μ l. A diluição foi feita em meio Eagle com 10% de soro fetal. As microplacas com a mistura vírus + soro foram incubadas por 1 hora a 37°C . Após a incubação foram distribuídos na microplaca 50 μ l de células em cada pocinho, na concentração de 30 mil células por pocinho. As microplacas foram incubadas a 37°C em ambiente com 5% de CO_2 e a leitura do teste foi feita em microscópio invertido, no momento em que as 100DI 50% se manifestaram (aproximadamente em 72 horas). A ausência de ECP nas diluições do soro em 1:4, indicou os soros positivos e sua presença indicou os soros negativos. Em cada teste realizado foi incluído um controle de células e uma retrotitulação como controle das 100DICT 50%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos quinze municípios, dos quais os soros procederam, três não apresentaram animais sorologicamente positivos. Os outros doze, apresentaram percentuais que variaram entre 3,4 a 86,5%. A média de animais positivos foi de 31,9%. O percentual positivo de propriedades foi no entanto de 71,3%, sobre o total de 112 examinadas. Estes resultados podem ser vistos na Tabela n^o 1.

A infecção de bovinos com BHV-1, está disseminada na maioria dos países, onde a bovinocultura possui im-

Tabela 1 - Resultados sorológicos de animais testados para Herpes Bovino Tipo 1.

Município/País	Nº de soros	Positivos	Negativos	%Positivos
Pelotas	527	173	354	32,8
Capão do Leão	68	16	52	23,5
Bagé	336	132	204	39,2
Santa Vitória	193	167	26	86,5
Canguçu	29	01	28	3,4
Alegrete	63	24	39	38,1
Rio Grande	492	113	379	22,9
Jaguarão	43	22	21	51,1
Uruguaiana	145	37	108	25,5
Lages	269	18	251	6,7
Concórdia	32	-	32	0,0
Curitiba	42	-	42	0,0
São Paulo	49	30	19	61,2
Uruguai	42	14	28	33,3
Argentina	11	-	11	0,0
Total	2341	747(31,9%)	1594(68,1%)	-
Nº propriedades	112	80(71,3%)	32(28,7%)	-

portância econômica (GIBBS & RWEYEMAMU, 1977; DURAN & HASSARD, 1990; ACKERMANN, et al., 1990; ANUNCIACÃO et al., 1989; WEIBLEN et al., 1989). Os índices de infecção descritos são muito variáveis. ACKERMANN et al. (1990), relatam índices de 40 a 50% na Grã-Bretanha e 65% na Bélgica, incluindo neste resultado, animais vacinados. No Canadá, foram descritos índices de 37,8% de animais positivos, sendo de 59,5% a nível de propriedades (DURHAM & HASSARD, 1990). No Rio Grande do Sul, os primeiros resultados foram obtidos em 1972 por WIZIGMANN et al., com índices de 33% de positividade distribuídos em onze municípios. Em 1989, RAVAZOLLO et al. ao testarem 526 soros provenientes de 15 municípios no estado, encontraram índices de 82,7% e LOVATO et al. (1993), em resultados parciais, constataram índices de 28,9% em 2656 solos de gado leiteiro, no Rio Grande do Sul.

ANUNCIACÃO et al. (1989), relatam índices de 70% sobre 400 amostras testadas, sendo 66,2% em Minas Gerais, 85,7% em Goiás e 81,5% no Rio de Janeiro. Os índices de 31,9% de animais positivos no presente trabalho, se assemelham aos resultados publicados por vários autores citados e diferem dos apresentados por RAVAZOLLO et al. (1989) e ANUNCIACÃO et al. (1989). No entanto, os índices encontrados de 71,3% de propriedades positivas, são elevados e demonstram que a prevalência da infecção vem se alastrando, o que também já foi constatado por outros autores. ACKERMANN et al. (1990) chamam a atenção dos

índices crescentes verificados na Inglaterra, indo de 5% em 1970, para 50% em 1978.

Muito embora os resultados deste trabalho se refiram a rebanhos de gado de corte com problemas reprodutivos, não se observam muitas diferenças dos resultados descritos em gado leiteiro (LOVATO et al., 1993). Os índices observados, referem-se a animais realmente infectados pelo BHV-1, levando-se em conta a não utilização de vacinas para IBR-IPV nas propriedades examinadas. Comparando os resultados de propriedades com problemas reprodutivos e os resultados de rebanhos sem o mesmo histórico, pode-se pensar que estes últimos tratam-se igualmente de rebanhos infectados. Levando-se em conta a disseminação das modernas técnicas de reprodução e isolamento do BHV-1, de sêmen (WEIBLEN et al., 1991; VAN OIRSCHOT et al., 1993), pode-se esperar uma crescente disseminação da infecção a nível de rebanho.

As situações descritas a respeito da prevalência do BHV-1, incluindo as amostras encefálicas, recomendam sobre todos os aspectos, uma imediata atitude das autoridades sanitárias, com relação ao controle desta virose.

AGRADECIMENTO

Agradecemos ao Sr. José Carlos R. Sandrini, Técnico em Laboratório, pelo auxílio prestado durante a realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACKERMANN, M., PETERHANS, E., WYLER, R. DNA of the bovine herpes virus type 1 in the trigeminal ganglia of latent infected calves, *Am J Vet Res*, v. 43, p. 36-40, 1982.
- ACKERMANN, M., BELAK, S., BITSCH, V., et al. Round table on infectious bovine Rhinotracheitis / Infectious pustular vulvovaginitis virus infection diagnosis and control. *Veterinary Microbiology*, v. 3, p. 361-363, 1990.
- ANUNCIACÃO, A.V.M., CERQUEIRA LEITE, R., MOREIRA E.C. et al. Presença de anticorpos para o Herpesvírus Bovino 1 (HVB 1) em bovinos nos estados de Minas Gerais, Goiás e Rio de Janeiro, através da prova de hemoaglutinação passiv. *Arq Bras Med Vet Zoot*, v. 41, n. 5, p. 433-441, 1989.
- DURHAM, P.J.K., HASSARD, L.E. Prevalence of antibody to infectious bovine rhinotracheitis, parainfluenza 3, bovine respiratory syncytial, and bovine viral diarrhoea viruses in cattle in Saskatchewan and Alberta. *Can Vet J*, v. 31, p. 815-820, 1990/
- FENNER, F., BACHMANN, A., GIBBS, E.P.J., et al. *Veterinary Virology*, San Diego, Ed. Academic Press, p. 347-356, Cap. 19, 1987.

- GIBBS, E.P.J., RWEYEMANN, M.M. Bovine herpesviruses, Part. I. Bovine Herpesvirus 1. *Veterinary Bulletin*, Weybridge, v. 47, n. 5, p. 317-343, 1977.
- GILLESPIE, J.H., McENTEE, K.J., KENDRICK, J.W. et al. Comparison of infectious pustular vulvovaginitis virus with infectious bovine rhinotracheitis virus. *Cornell Vet.*, v. 49, p. 288-297, 1959.
- GUY, J.S., POTGIETER, L.N.D. Bovine herpesvirus-1 infection of cattle kinetics of antibody formation of intranasal exposure and abortion induced by the virus. *Am J Vet Res*, v. 46, n. 4, p. 893-898, 1985.
- HALFEN, D.C., FERRARI, M.F. Infecções por herpesvírus bovino-1 em bovinos no Rio Grande do Sul. *Boletim do Laboratório Regional de Diagnóstico*, n. 4, p. 31-37, 1994.
- KAHRS, R.F. Infectious bovine rhinotracheitis: A review and update. *J Am Vet Med Assoc*, v. 171, n. 10, p. 1055-1064, 1977.
- LOVATO, L.T., REBELATTO, M.C., MORAES, M.P., et al. Serological survey of bovine herpesvirus type 1 infection in dairy herds of the Rio Grande do Sul State. *Resumos, Virologica 93*, Porto Alegre, p. 253, 1993.
- MAGYAR, G., TANYI, J., HORNYÁK, Á., et al. Restriction endonuclease analysis of Hungarian bovine herpesvirus isolates from different clinical forms of IBR/IPV and encephalitis. *Acta Veterinaria Hungarica*, v. 41, n. 1-2, p. 159-170, 1993.
- MAYR, A., BACHMANN, P.A., BIBRACK, B.M. et al. *Virologische Arbeitsmethoden - Band IV - Sicherheit bei virologischen Arbeiten - Biometrische Methoden*. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, 1982.
- METZLER, A.E., MATILE, H., GASSMANN, V., et al. European isolates of bovine herpesvirus-1: a comparison of restriction endonuclease sites, polypeptides, and reactivity with monoclonal antibodies. *Archives of Virology*, v. 85, p. 57-59, 1985.
- METZLER, A.E., SCHUDEL, A.A., ENGELS, M. Bovine herpesvirus 1: Molecular and antigenic characteristics of variant viruses isolated from calves with neurological disease. *Archives of Virology*, v. 87, p. 205-217, 1986.
- RAVAZOLLO, A.P., PIZZOL, M.P., MOOJEN, V. Evidência da presença de anticorpos para o vírus da rinopneumonia infecciosa dos bovinos em alguns municípios do Estado do Rio Grande do Sul - Brasil. *Arq Fac Vet UFRGS*, n. 17, p. 89-95, 1989.
- VAN OIRSCHOT, J.T., STRAVER, P.J., VAN LIESHOUT, J.A. et al. A subclinical infection of bulls with bovine herpesvirus type 1 at an artificial insemination centre. *Vet Rec*, v. 132, n. 2, p. 32-35, 1993.
- WEIBLEN, R., LOMBARDO de BARROS, C.S., CANABARRO, T.F., et al. Bovine meningoencephalitis from IBR virus. *Veterinary Record*, v. 124, p. 666-667, 1989.
- WEIBLEN, R., KREUTZ, L.C., CANABARRO, T.F. et al. Bovine herpesvirus isolation from semen and preputial swabs. In: *Annual Meeting of the American Association of Laboratory Diagnosticians*, San Diego, CA. USA, Abstract... San Diego: American Association, 95 p. p. 45, 1991.
- WIZIGMANN, G., VIDOR, T., RICCI, Z.T. Investigações sorológicas sobre a ocorrência e incidência dos vírus PI-3, IBR e Diarréia a vírus-enfermidade das Mucosas dos bovinos do Estado do Rio Grande do Sul. *Bol Inst Pesq Vet Desidério Finamor*, n. 1, p. 52-58, 1972.