

PREVALÊNCIA DE HERPESVÍRUS BOVINO TIPOS 1 E 5 NO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL – BRASIL

HOLZ, C.L.¹; CIBULSKI, S.P.¹; TEIXEIRA, T.F.¹; CAIXETA, S.P.M.B.¹; BATISTA, H.B.C.R.²; CAMPOS, F.S.²; ROEHE, L.R.²; OLIVEIRA, M.T.²; SILVA, J.R.¹; DEZEN, D.¹; VARELA, A.P.M.¹; FRANCO, A.C.²; ROEHE, P.M.^{1,2,#*}

1. Equipe de Virologia, Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), Estrada do Conde 6000, Eldorado do Sul, RS. 92990-000

2. Laboratório de Virologia, DM-ICBS/ UFRGS, Porto Alegre, RS, Av Sarmento Leite 500 sala 208, CEP 90050-170.

#Endereço para correspondência: Caixa Postal 2076, Porto Alegre, RS, Brasil, CEP 90 001 970. Tel.: 51. 3481 37 11. Fax: 51.3481 33 37. E-mail: proehe@gmail.com

Abstract

This study was carried out to estimate the seroprevalence of antibodies to bovine herpesviruses types 1(BoHV-1) and 5 (BoHV-5) in the state of Rio Grande do Sul, Brazil, against different BoHV-1 and BoHV-5 strains. The sera examined were extracted from a larger sample designed to estimate the prevalence of bovine brucellosis within the state. All sera were collected from cows 24 months or older, not vaccinated to bovine herpesviruses, from both dairy and beef herds. The number of samples to be tested was calculated based on an estimated prevalence of infection of 33%, with an average standard deviation of $\leq 1\%$ and a 95% limit of agreement. Sera from 2,200 cattle from 390 farms distributed in 158 municipalities were tested in serum neutralization (SN) tests in search for antibodies to the following viruses: BoHV-1.1 strains EVI123/98 and Los Angeles, BoHV-5a strain EVI88/95 and BoHV-5b strain A663. The overall prevalence of antibodies to BoHV-1 and BoHV-5 in the sampled herds was 29.2% (642/2,200); seropositive animals were detected in 225 (57.7%) of the sampled farms. Prevalence estimates varied according to the virus used for challenge in SN tests. These findings provide evidence that antibodies to BoHV-1 and BoHV-5 are largely spread in dairy and beef herds in Rio Grande do Sul, although prevalence in distinct geographic regions is quite variable. The results were strongly affected by the virus strains used for challenge in SN testing. This must be taken into account when performing serologic tests to detect BoHV-1 and BoHV-5 antibodies.

Key-words: bovine herpesvirus type 1, bovine herpesvirus type 5, epidemiology.

Resumo

Este estudo objetivou estimar a prevalência de anticorpos contra os herpesvírus bovinos tipos 1 e 5 (BoHV-1 e BoHV-5) no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil, frente a diferentes cepas de BoHV-1 e BoHV-5. As amostras de soro utilizadas foram extraídas de uma amostragem mais ampla, desenhada para estimar a prevalência de brucelose bovina no Estado. Todos os soros foram coletados de vacas de 24 meses de idade ou mais, não vacinadas contra herpesvírus bovinos, de rebanhos de corte e leite. O cálculo amostral foi baseado em uma expectativa de prevalência média de infecção de 33%, considerando-se um erro padrão não superior a 1% e um intervalo de confiança de 95%. Com base nesse

cálculo foram examinados 2200 soros, provenientes de 390 propriedades e 158 municípios. Os soros foram analisados na busca de anticorpos contra BoHV-1 e BoHV-5 pela técnica de soroneutralização (SN), executada frente a quatro cepas de vírus distintas EVI123/98 e Los Angeles (BoHV-1.1); EVI88/95 (BoHV-5a) e A663 (BoHV-5b).

A prevalência média de anticorpos contra BoHV-1 e BoHV-5 nos animais amostrados foi 29.2% (642/2200); animais soropositivos foram encontrados em 57,7% (225/390) dos rebanhos amostrados. Estes achados evidenciam que anticorpos contra BoHV-1 e BoHV-5 estão amplamente difundidos nos rebanhos do Estado, embora a prevalência em distintas regiões geográficas seja bastante variada. Os resultados obtidos nas estimativas de prevalência foram fortemente afetados pelas diferentes amostras de vírus usadas nos testes de SN. Esse fato deve ser levado em consideração quando estudos sorológicos para BoHV-1 e BoHV-5 forem realizados.

Palavras chave: herpesvírus bovino tipo 1, herpesvírus bovino tipo 5, epidemiologia.

Introdução

Os herpesvírus bovinos tipos 1 (BoHV-1) e 5 (BoHV-5) são membros da família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*, gênero *Varicellovirus* (ROIZMANN & PELLETT, 2007; THIRY et al., 2007). O BoHV-1 tem sido associado a diversas manifestações clínicas em bovinos, incluindo Rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), Vulvovaginite pustular/Balanopostite pustular infecciosa (IPV/IPB), abortos e infecções generalizadas em neonatos (FRANCO & ROEHE, 2007). Ocasionalmente, o BoHV-1 pode ser detectado no sistema nervoso central (SNC) de bovinos, podendo ou não estar relacionado a casos de doença neurológica. O BoHV-5, por sua vez, é o agente etiológico da Encefalite herpética bovina (ROIZMANN & PELLETT, 2007; FRANCO & ROEHE, 2007), embora possa também induzir sinais de doença respiratória e estar igualmente presente no trato genital de bovinos (FRANCO & ROEHE, 2007).

Após infecção aguda estes agentes permanecem em latência, alojando-se em gânglios sensoriais (FRANCO & ROEHE, 2007). O estabelecimento da latência e eventuais reativações representam pontos-chave na biologia dos herpesvírus, pois permitem a permanência indefinida do vírus nos hospedeiros, com episódios esporádicos de reativação e disseminação viral, determinando assim, a perpetuação da infecção nos rebanhos (FRANCO & ROEHE, 2007).

O BoHV-1 tem distribuição mundial amplamente avaliada e a sua prevalência em rebanhos bovinos atinge taxas variadas em diferentes regiões (STRAUB, 2001). Já o BoHV-5 possui uma distribuição geográfica aparentemente restrita, sendo raro seu relato no hemisfério Norte (FRANCO & ROEHE, 2007). No Brasil, as evidências obtidas indicam que é alta a prevalência de infecções por BoHV-1; porém, ainda não é possível determinar que percentagem de animais soropositivos para BoHV-1 foi de fato infectada com BoHV-5, (ou por ambos), pois, sorologicamente, ainda não é clara a diferenciação entre infecções com BoHV-1 e 5.

Os diversos trabalhos de prevalência anteriormente realizados revelaram taxas de soroprevalência muito variáveis e não se detiveram no exame da parcela de animais soronegativos para BoHV-1, mas potencialmente soropositivos para BoHV-5 (LOVATO et al., 1995; VIDOR et al., 1995). Além disso, tais trabalhos utilizaram somente uma determinada cepa de vírus, normalmente uma amostra “clássica” de BoHV-1. No Rio Grande do Sul, os levantamentos realizados indicam grandes diferenças nas taxas de soroprevalência encontradas (RAVAZZOLO et al., 1989; LOVATO et al., 1995), as quais podem estar associadas à cepa viral utilizada para desafio nos testes de diagnósticos; no

entanto, este parâmetro nunca foi anteriormente questionado. Entretanto, estudos recentes em nosso laboratório evidenciaram que a soroprevalência pode ser significativamente afetada pelo uso de cepas de vírus distintas (Dados não publicados).

O objetivo desse estudo foi estimar a soroprevalência das infecções por BoHV-1 e BoHV-5 no Estado do Rio Grande do Sul frente a uma combinação de diferentes cepas destes agentes, objetivando detectar animais soropositivos com maior eficácia e maior sensibilidade. Para tanto, foram utilizadas quatro cepas de herpesvírus bovinos, em testes sobre 2200 soros de fêmeas bovinas adultas (>24 meses) não vacinadas contra BoHV-1 ou BoHV-5.

Material e Métodos

Amostragem e coleta de dados

O presente estudo foi realizado utilizando amostras de soro bovino coletadas para o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBTA), provenientes de fêmeas bovinas adultas (>24 meses).

O cálculo amostral baseou-se em uma expectativa de prevalência de infecções por BoHV-1 e 5 da ordem de 33%, considerando-se um erro padrão não superior a 1% e um intervalo de confiança de 95%. As amostras de soro foram examinadas de maneira que o tamanho amostral fosse proporcionalizado ao tamanho do rebanho de cada mesorregião do RS. Este último dado foi determinado com base nos dados estimados pelo IBGE a respeito da população bovina do RS (IBGE, 2006). Portanto, o RS foi subdividido em 7 mesorregiões, das quais foram selecionadas 2200 amostras, escolhidas aleatoriamente dentre os soros de animais não vacinados contra IBR. Das 390 propriedades pertencentes a 158 municípios do RS foram selecionados de 1 a 15 soros. Todas as amostras foram inativadas em banho-maria a 56° C por 30 minutos e em seguida foram estocadas a -20° C até o momento do uso.

Vírus e células

Para a sorologia foram utilizadas células de rim de bovino *Madin Darby Bovine Kidney* (MDBK, originária da ATCC; CCL-22) cultivadas em meio mínimo essencial de Eagle (Gibco) suplementadas com 10% de soro fetal bovino (Soral) e antibióticos.

As cepas de vírus utilizadas foram selecionadas em função de haverem sido as que detectaram com maior sensibilidade um grande número de animais soropositivos em testes prévios (Dados não publicados). Estas foram: Los Angeles – LA (BoHV-1.1), EVI123/98 (BoHV-1.1), A663 (BoHV-5b) e EVI88/95 (BoHV-5a). A multiplicação e titulação das cepas virais foram realizadas em células MDBK.

Testes de Soroneutralização

A pesquisa de anticorpos neutralizantes para BoHV-1 e BoHV-5 foi realizada utilizando-se a técnica de soroneutralização (SN) em microplacas de 96 orifícios, como descrito previamente (DEREGT et al., 1993). Os testes foram repetidos frente a cada uma das quatro cepas virais, utilizando-se em cada teste 100 doses infectantes para 50% dos cultivos celulares (DICC₅₀).

Resultados e Discussão

Dentre os 2200 soros bovinos examinados, 29,2% foram positivos frente à pelo menos uma das quatro cepas de vírus utilizadas nos testes de SN. Houve diferença nos resultados dos testes frente às diferentes cepas virais utilizadas (Tabela 1).

Tabela 1. Diferença dos valores de prevalência das SN frente a diferentes cepas de BoHV-1 e 5

Quantidade de cepas utilizadas	Diferença dos valores de prevalência
1 cepa	19,1-23,2%
2 cepas	24,5-27%
3 cepas	27-28,3%
4 cepas	29,20%

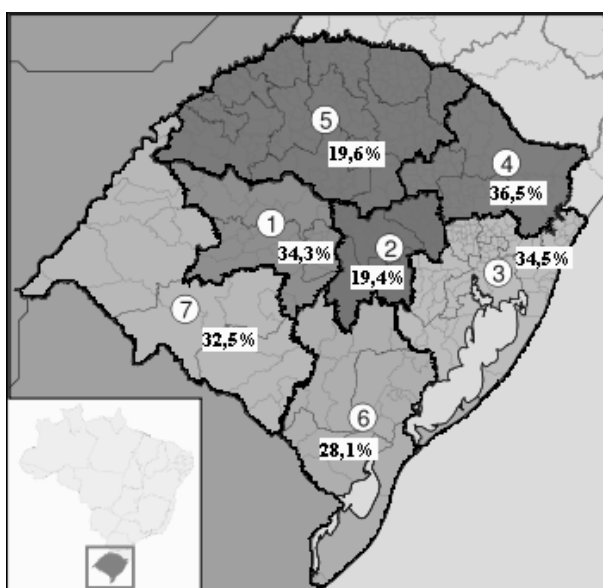
Ao utilizar-se apenas uma cepa viral a prevalência encontrada foi reduzida (tabela 1). A não detecção de amostras soropositivas equivale à não detecção de animais potencialmente disseminadores da infecção, o que pode comprometer seriamente eventuais programas de erradicação e controle, onde a eficácia na identificação de soropositivos é crítica no processo. Esse tipo de fenômeno pode vir a comprometer estratégias de controle e erradicação desses herpesvírus.

Do total de 390 propriedades testadas contra o BoHV-1 e 5, foram encontrados animais reagentes em 57,7%. Com relação aos municípios analisados, 63,9% apresentavam pelo menos uma propriedade com animais positivos.

As diferenças entre os resultados encontrados neste trabalho e os levantamentos sorológicos realizados anteriormente no RS (RAVAZZOLO et al., 1989; LOVATO et al., 1995; VIDOR et al., 1995) podem ser apontadas como sendo consequência do tipo de população bovina estudada ou pelas técnicas utilizadas. Os resultados anteriores não podem ser considerados como reflexo da situação da infecção no Estado devido ao pequeno número de amostras analisadas ou por representarem grupos populacionais específicos.

Nas diferentes mesorregiões do Estado, podem ser percebidas diferenças significativas nas prevalências (Figura 1). Essas diferenças podem ser explicadas devido a forma como os animais são criados e manejados nestas diferentes mesorregiões. Além disso, fatores climáticos e geográficos também podem influenciar nestas diferenças.

Figura 1. Soroprevalência* de anticorpos contra herpesvírus bovinos tipos 1 e 5 de acordo com as mesorregiões do Estado do Rio Grande do Sul.



Mesorregiões:

- 1: Centro Ocidental
- 2: Centro Oriental
- 3: Metropolitana de Porto Alegre
- 4: Nordeste
- 5: Noroeste
- 6: Sudeste
- 7: Sudoeste

* Soroprevalência média, expressa em percentagens calculadas sobre o total de amostras examinadas em cada mesorregião.

Conclusões

Os anticorpos anti-BoHV-1 e 5 encontram-se difundidos em todo o Estado do Rio Grande do Sul, sendo que os valores encontrados diferenciam-se dependendo das mesorregiões analisadas.

Baseando-se nesse coeficiente de prevalência encontrado e sabendo-se da importância da latência dos herpesvírus bovinos, como forma de perpetuação da doença no rebanho, recomenda-se que sejam tomadas medidas de prevenção e controle dessas enfermidades nos rebanhos do Estado do Rio Grande do Sul.

Agradecimentos

Agradecimentos ao professor Lucas Veiga (UFCSPA) e ao Núcleo de Apoio Estatístico da UFRGS pelo auxílio nas análises estatísticas dos dados e ao Instituto de Pesquisas Veterinárias onde o trabalho pode ser realizado. Apoio financeiro CNPq, FEPAGRO, FAPERGS, CAPES.

Referências

Deregt D., Cho H.J.C. & Kozub G.C. 1993. A comparative evaluation of two sensitive serum neutralization tests for bovine herpesvirus-1 antibodies. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 57:56-59.

Franco A.C. & Roehle P.M. 2007. Herpesviridae, p. 433-488. In: Flores, E.F. *Virologia Veterinária*. 1ª ed. Ed. Da UFSM, Santa Maria.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa da Pecuária Municipal 2006. <http://www.ibge.gov.br> (acessado em 25/Nov/2007).

Lovato L.T., Weiblen R., Tobias F.L. & Moraes M.P. 1995. Herpesvírus bovino tipo 1 (HVB-1): Inquérito soro-epidemiológico no rebanho leiteiro do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Rural* 25(3):425-430.

Ravazzolo A.P., Dal Pizzol M. & Moojen V. 1989. Evidência da presença de anticorpos para o vírus da rinotraqueíte infecciosa dos bovinos em alguns municípios do Estado do Rio Grande do Sul. *Arquivos da Faculdade de Veterinária-UFRGS* :98-95.

Roizmann B. & Pellett P.E. 2007. The family Herpesviridae, a brief introduction, p. 2480-2497. In: Knipe, M.D. & Howley, P.M. *Field's Virology*. 5ªed. Ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia-USA.

Straub O.C. 2001. Advances in BHV1 (IBR) Research. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 108:419-422.

Thiry J., Widén F., Grégoire F., Linden A., Belák S. & Thiry E. 2007. Isolation and characterisation of a ruminant alphaherpesvirus closely related to bovine herpesvirus 1 in a free-ranging red deer. *BioMed Central Veterinary Research* 3(26).

Vidor T., Halfen D.C., Leite T.E. & Coswig L.T. 1995. Herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1): sorologia de rebanhos com problemas reprodutivos. *Ciência Rural* 25(3):420-424.