

SORONEUTRALIZAÇÃO (SN) FRENTE A DIFERENTES TIPOS E SUBTIPOS DE HERPESVÍRUS BOVINOS TIPOS 1 (BoHV-1) E 5 (BoHV-5)

CIBULSKI, S.P.¹; HOLZ, C.L.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) 3481-3711. E-mail: proehe@gmail.com

Abstract

Serum neutralization (SN) test is widely used to detect neutralizing antibodies to a number of viruses, including bovine herpesviruses types 1 (BoHV-1) and 5 (BoHV-5). In order to examine such variables, a study was designed in which SN sensitivity was evaluated when performed against different BoHV-1 strains as well as against distinct BoHV-1 and BoHV-5 types and subtypes. Bovine serum samples (n=810) from two widely separated geographical regions were tested in SN assays against six distinct bovine herpesviruses, including two BoHV-1.1 strains, a BoHV-1.2a strain and three samples of different BoHV-5 subtypes (BoHV-5a, b and c). SN results were compared in a 2x2 table using McNemar test and the agreement was analysed using the Kappa correlation coefficient. When each particular virus strain was evaluated in the assay, the sensitivity varied from 59.3% to 76.4%. When seropositives obtained with all the six strains were added together, the highest sensitivity was obtained (327; 100%). This results showed that to detect a higher number of seropositive animals, it is necessary to perform the assay using many virus samples together. When serum samples from geographically distinct areas were analysed separately, it became evident that seropositivity revealed by each particular virus varied between regions, but this effect tended to loose significance when the sum of SN results against different viruses was considered. These results indicate that the SN sensibility against BoHV-1 and 5 can be affected by the use of different types or subtypes of this virus.

Key words: serum neutralization, bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1), bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5).

Resumo

O teste de soroneutralização (SN) é extensamente utilizado na detecção de anticorpos neutralizantes contra uma grande variedade de vírus, incluindo os herpesvírus bovinos tipo 1 (BoHV-1) e 5 (BoHV-5). O trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar possíveis diferenças associadas ao uso de distintos tipos e subtipos de herpesvírus bovinos em testes de SN. Soros bovinos de 810 animais de duas regiões geograficamente distantes foram testados pela técnica de

SN frente a seis cepas de herpesvírus bovino, incluindo duas de BoHV-1.1, uma de BoHV-1.2a e três de diferentes subtipos de BoHV-5 (BoHV-5a, b e c). Os testes de SN foram comparados, dois a dois, pelo teste de McNemar e a concordância foi analisada pelo coeficiente de correlação Kappa. Quando cada cepa viral foi avaliada isoladamente no teste, a sensibilidade variou de 59,3% a 76,4%. Ao analisarmos os resultados conjuntos das seis cepas virais avaliadas no estudo, foi determinada a sensibilidade máxima (327 – 100%). Estes resultados mostram que para a detecção do maior número de animais soropositivos, é necessário realizar testes de SN frente a cepas virais distintas. Quando amostras de soro de diferentes regiões geográficas foram analisadas separadamente, ficou evidente que a soropositividade revelada por cada cepa viral variou entre as regiões, mas este efeito foi reduzido quando os resultados frente a distintos vírus foram considerados. Estes resultados indicam que a sensibilidade dos testes de SN frente ao BoHV-1 e ao BoHV-5 pode ser afetada pelo uso de diferentes tipos ou subtipos destes vírus.

Palavras chave: Soroneutralização (SN), herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1), herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5).

Introdução

Os herpesvírus bovinos tipos 1 e 5 (BoHV-1 e BoHV-5) pertencem à família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*, gênero *Varicellovirus* (Thiry et al. 2007). Com base em características genômicas e antigênicas, os BoHV-1 foram divididos em três diferentes genótipos: BoHV-1.1, BoHV-1.2a e BoVH-1.2b. Os subtipos 1.1 e 1.2a são os mais patogênicos e estão normalmente associados, respectivamente, a casos de doença respiratória clássica e abortos. O BoHV-1.2b possui patogenicidade moderada e causa vulvovaginite ou balanopostite, não tendo sido, até o presente, relacionado a casos de aborto. Já com relação ao BoHV-5, de acordo com estudos baseados no perfil eletroforético de clivagens utilizando enzimas de restrição e na reação frente a anticorpos monoclonais, foi possível demonstrar que amostras desse tipo podiam ser subdivididas em BoHV-5a, BoHV-5b e BoHV-5 “não a-não b”, ou “c” (Franco & Roehe 2007).

Os diferentes tipos e subtipos de BoHV-1 e BoHV-5 apresentam extensa reatividade sorológica cruzada, que pode ser evidenciada por testes de soroneutralização (SN). Assim, o anti-soro produzido contra o vírus de um determinado subtipo reage com vírus heterólogos. Desta forma, infecções pelo BoHV-5 podem se confundir sorologicamente com aquelas causadas pelo BoHV-1 e vice-versa, impedindo a discriminação entre estas.

Em função da necessidade de realizar um amplo levantamento sorológico buscando avaliar a soroprevalência de BoHV-1 e BoHV-5 e, face à existência de diferentes tipos e subtipos de vírus, a questão que se impôs foi: qual seria a cepa viral mais apropriada para uso em análises soro-epidemiológicas em nossa região? Para resolver esse problema, foi realizado um estudo comparando a sensibilidade de amostras de BoHV-1 e BoHV-5 de diferentes tipos e subtipos em testes de SN, na busca daquela(s) capaz(es) de detectar o maior número possível de soros positivos, o que forneceria uma medida mais próxima da real prevalência dessas infecções. Extendendo ainda mais estes estudos e tendo em vista que vários laboratórios utilizam diferentes cepas de BoHV-1.1 em testes de SN, buscou-se determinar se haveria variações na sensibilidade apresentada por duas cepas distintas deste mesmo sorotipo. Além disso, para avaliar a possibilidade de variação entre os resultados em função da origem dos soros a serem testados,

foram utilizados soros provenientes de duas regiões geograficamente distantes do País. O presente estudo descreve os achados destes experimentos.

Material e Métodos

Células

Foram utilizadas células de rim de bovino “*Madin Darby Bovine Kidney*” (MDBK, ATCC CCL-22) cultivadas em meio mínimo essencial de Eagle (Gibco) suplementadas com 10% de soro fetal bovino (Soral) e antibióticos.

Vírus

Foram utilizadas as amostras: Los Angeles, ou LA (BoHV-1.1), EVI123/98 (BoHV-1.1), SV265/96 (BoHV-1.2a), EVI88/95 (BoHV-5a; Roehe et al. 1997, Souza et al. 2002), A663 (BoHV-5b) e ISO95/97 (BoHV-5c). A multiplicação e titulação dos vírus foram realizadas em células MDBK seguindo métodos usuais.

Soros

Foram examinadas 802 amostras de soro bovino, sendo 502 coletadas na região Sul do Brasil (Rio Grande do Sul) e 308 amostras coletadas na região Centro-Oeste (Goiás). A população bovina analisada nesse estudo era constituída de fêmeas e machos de diferentes idades e tipos de exploração, não vacinadas contra o BoHV-1 e 5.

Todas as amostras de soro foram inativadas em banho-maria a 56° C por 30 minutos e em seguida foram estocadas a -20° C até o momento do uso.

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. Os soros foram diluídos em duplicata nas diluições 1/2 e 1/4 e as misturas soro-vírus foram incubadas por uma hora antes do acréscimo das células. Os testes foram repetidos frente a cada uma das seis cepas virais, utilizando-se em cada teste 100 doses infectantes para 50% dos cultivos celulares (DICC₅₀). O termo “sensibilidade máxima” foi usado para referir-se ao conjunto de soros que foram positivos em pelo menos um dos testes de SN.

Análise estatística

A comparação das SN foi estabelecida pelo teste estatístico de McNemar para populações relacionadas, adotando-se o nível de significância de 5% de probabilidade. A comparação entre as concordâncias observadas e esperadas empregou o coeficiente Kappa. As análises foram realizadas através do *software* SPSS, versão 12.0.

Resultados e Discussão

Ao utilizarmos seis diferentes cepas de vírus de confrontação na SN, sendo duas de BoHV-1.1 (LA e EVI123/98), uma de BoHV-1.2a (SV265/96) e três de diferentes subtipos de BoHV-5 (EVI123/95, BoHV-5a; A663, BoHV-5b e ISO95/97, BoHV-5c) encontramos um total de 327 (40,4%) amostras positivas em pelo menos um dos testes. No entanto, comparando-se os resultados frente a cinco diferentes cepas virais este valor diminuiu, ficando entre 326 (99,7%) e 307 (93,9%) amostras positivas detectadas. O valor de detecção foi ainda menor utilizando-se quatro (entre 324, 99,1% e 288, 88,1%), três (entre 309, 94,5% e 273, 83,5%), duas (entre 289, 88,4% e 244, 74,6%) e uma (entre 250, 76,4% e 194, 59,3%) cepa viral na detecção de animais

soropositivos. Percebe-se que a sensibilidade na detecção de bovinos positivos frente ao BoHV-1 e BoHV-5 reduz à medida que o número de cepas virais utilizadas é diminuído.

Com relação às análises estatísticas, as SN realizadas com cada cepa viral foram comparadas entre si (duas a duas), assim como os dados referentes às comparações dos resultados das SN realizadas com cepas de BoHV-1 (LA, EVI123/98 e SV265/96) e BoHV-5 (EVI88/95, A663 e ISO95/97) para podermos determinar se os testes de SN, como estão sendo utilizados atualmente (com utilização de uma única amostra “clássica” de BoHV-1), estão obtendo níveis satisfatórios de sensibilidade na detecção de animais soropositivos. A concordância entre os resultados dos testes realizados com as diferentes cepas virais variou de moderado a excelente, como pode ser constatado na Tabela 1. Os índices Kappa encontrados para as diversas comparações realizadas demonstram que existe grande variação entre os resultados encontrados nas diferentes SN. Na análise estatística da concordância entre positivos das provas de SN (Teste de McNemar) observou-se diferenças significativas ($P < 0,05$) nas comparações dos resultados da maioria das SN. Este fato também demonstra que existem grandes variações na detecção de amostras positivas de um teste em comparação com o outro.

Tabela 1. Resultado e interpretação do valor Kappa na comparação dos resultados das SN frente a diferentes cepas virais.

Tipo das cepas	SN comparadas	Kappa	Concordância
BoHV-1.1 X BoHV-1.1	LA X EVI123*	0,645	Boa
BoHV-1.1 X BoHV-1.2a	LA X SV265**	0,704	Boa
BoHV-1.1 X BoHV-5a	LA X EVI88***	0,627	Boa
BoHV-1.1 X BoHV-5b	LA X A663	0,772	Boa
BoHV-1.1 X BoHV-5c	LA X ISO95****	0,779	Boa
BoHV-1.1 X BoHV-1.2a	EVI123 X SV265	0,628	Boa
BoHV-1.1 X BoHV-5a	EVI123 X EVI88	0,595	Moderada
BoHV-1.1 X BoHV-5b	EVI123 X A663	0,663	Boa
BoHV-1.1 X BoHV-5c	EVI123 X ISO95	0,608	Moderada
BoHV-1.2a X BoHV-5a	SV265 X EVI88	0,674	Boa
BoHV-1.2a X BoHV-5b	SV265 X A663	0,753	Boa
BoHV-1.2a X BoHV-5c	SV265 X ISO95	0,764	Boa
BoHV-5a X BoHV-5b	EVI88 X A663	0,671	Boa
BoHV-5a X BoHV-5c	EVI88 X ISO95	0,71	Boa
BoHV-5b X BoHV-5c	A663 X ISO95	0,83	Excelente
BoHV-1 X BoHV-5	BoHV-1 X BoHV-5	0,804	Boa

* refere-se à amostra EVI123/98; ** refere-se à amostra SV265/96; *** refere-se à amostra EVI88/95; **** refere-se à amostra ISO95/97/95 (vide métodos para detalhes). Kappa entre 0,41 e 0,6 = moderada; entre 0,61 e 0,8 = bom; Kappa > 0,81 = excelente

Tabela 2. Comparação da concordância entre os resultados positivos obtidos à SN frente às seis diferentes cepas virais utilizadas no estudo.

	LA (BoHV-1.1)	EVI123/98 (BoHV-1.1)	SV265/96 (BoHV-1.2a)	EVI88/95 (BoHV-5a)	A663 (BoHV-5b)	ISO95/97/95 (BoHV-5c)
LA (BoHV-1.1)	231 (100%#)	166 (71,9%)	166 (71,9%)*	158 (68,4%)*	202 (87,4%)*	190 (82,3%)
EVI123/98 (BoHV-1.1)	166 (76,9%)	216 (100%)	148 (68,5%)*	147 (68,1%)	177 (81,9%)*	156 (72,2%)
SV265/96 (BoHV-1.2a)	166 (85,6%)*	148 (76,3%)*	194 (100%)	150 (77,3%)	182 (93,8%)*	171 (88,1%)*
EVI88/95 (BoHV-5a)	158 (77,5%)*	147 (72,1%)	150 (73,5%)	204 (100%)	173 (84,8%)*	167 (81,9%)
A663 (BoHV-5b)	202 (80,8%)*	177 (70,8%)*	182 (72,8%)*	173 (69,2%)*	250 (100%)	207 (82,8%)*
ISO95/97/95 (BoHV-5c)	190 (86%)	156 (70,6%)	171 (77,4%)*	167 (75,6%)	207 (93,7%)*	221 (100%)

*McNemar <0,05; # percentagem refere-se ao total de positivos detectados isoladamente pela cepa viral da linha de referência.

Através deste estudo, foi possível perceber que a cepa que isoladamente mostrou-se mais sensível à detecção dos soros positivos foi a amostra de BoHV-5b A663. Ainda assim, esta cepa detectou apenas 76,4% (250/327) do total de amostras soropositivas (sensibilidade máxima).

Outro ponto analisado foi o referente à distribuição geográfica das populações que originaram os soros componentes da amostragem testada. Essa variável foi examinada em função de que a possível exposição da população a vírus diferentes poderia levar a diferenças na sensibilidade dos testes realizados. A sensibilidade máxima alcançada nas amostras do RS foi 163 soros positivos. Nas amostras de GO, a sensibilidade máxima foi de 164 soros positivos. A cepa viral que apresentou isoladamente maior sensibilidade tanto para o RS, quanto para GO foi a A663, sendo que ela detectou 71,1% (116/163) e 81,7% (134/164) da sensibilidade máxima encontrada para o RS e GO, respectivamente. No entanto, a cepa que detectou menor número de positivos diferenciou-se em relação à origem das amostras analisadas, sendo que para o RS a amostra em questão foi a SV265/96 (BoHV-1.2a; 41,7%; 68/163) e para GO foi a EVI123/98 (BoHV-1.1; 67,1%; 110/164) (Tabela 2). Analisando os resultados de detecção de animais soropositivos frente às três cepas de BoHV-1 (LA, EVI123/98 e SV265/96), a sensibilidade (em relação à sensibilidade máxima) foi de 88,9% (145/163) para o RS e 89,6% (147/164) para GO. Os resultados frente às três cepas de BoHV-5 (EVI88/95, A663 e ISO95/97) foram de 84,7% (138/163) para o RS e 92,1% (151/164) para GO.

A SN frente a uma cepa dita “clássica” é utilizada como técnica padrão para detecção de BoHV-1 e 5, devido ao alto grau de reatividade sorológica cruzada encontrado entre estes vírus. Acreditava-se que o anti-soro produzido contra o vírus de um subtipo reagiria em títulos semelhantes ou iguais tanto contra o vírus homólogo, quanto contra o vírus heterólogo (Teixeira et al. 1998) a níveis que não pudessem comprometer os programas de erradicação e controle desses agentes. No entanto, pelos índices Kappa e pelo teste de McNemar encontrados nesse trabalho, fica evidenciado que nem sempre existe concordância nos resultados obtidos na comparação dos resultados das SN realizadas com diferentes cepas virais.

Conclusões

A SN frente a uma cepa “clássica” de BoHV-1, como vem sendo realizada na detecção de anticorpos contra esse vírus, não permite a detecção de todos os animais potencialmente soropositivos frente ao BoHV-1 e ao BoHV-5. Quando a SN for utilizada com a finalidade de avaliar o estado sorológico de infecções por BoHV-1 e BoHV-5, esta idealmente deveria ser realizada frente a uma combinação de cepas virais que apresentasse a maior sensibilidade possível. Isso minimizaria a chance de ocorrência de amostras “falso-negativas”, que poderiam comprometer seriamente os programas de controle e erradicação dessas infecções. Não obstante, a prevalência real de BoHV-1 e BoHV-5 nos rebanhos permanecerá indeterminada.

Diversas combinações utilizando diferentes cepas virais apresentaram-se como boas candidatas na detecção de um número satisfatório de animais soropositivos. No entanto, cabe a cada laboratório e a cada região do País avaliar qual seria a combinação ideal a ser utilizada, levando-se em conta o custo-benefício e os objetivos dos testes que venham a ser empregados.

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

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(2):26.

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

Teixeira M.F.B., Esteves P.A.E., Coelho C.S.S., Silva T. C., Oliveira L.G. & Roehe P.M. 1998. Diferenças em níveis de anticorpos contra herpesvírus bovinos tipos 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5). *Pesquisa Agropecuária Gaúcha* 4(1):61-65.