

EVOLUÇÃO DA INFECÇÃO PELO HERPESVÍRUS BOVINO TIPOS 1 E 5 E DO VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA EM REBANHOS INFECTADOS E VACINADOS COM UMA VACINA INATIVADA A PARTIR DE CEPAS AUTÓCTONES

ALICE SILVEIRA BECKER¹; PAULO RICARDO CENTENO RODRIGUES²; IVE
FRANCESCA TROCCOLI HEPPEL²; MARCELO DE LIMA³

¹Universidade Federal de Pelotas – asilveirabecker@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – priccenteno@hotmail.com; ivehepper@yahoo.com.br

³Universidade Federal de Pelotas – mdelima.ufpel@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O herpesvírus bovino (BoHV) e o vírus da diarreia viral bovina (BVDV) são patógenos de distribuição mundial e causadores de graves prejuízos à bovinocultura brasileira. Dentre diversas manifestações clínicas decorrentes da infecção, destacam-se as perdas na reprodução, ponto relevante no desempenho econômico da atividade (JUNQUEIRA et al., 2006).

O BoHV pertence à família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*, gênero *Varicellovirus*. Esse vírus possui uma capacidade de permanecer em latência em gânglios nervosos do hospedeiro, fator que dificulta a identificação da doença nos animais e impulsiona estudos acerca do diagnóstico e controle da enfermidade (FINO et al., 2012). O subtipo 1 (BoHV-1) é o agente causador da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR), Vulvovaginite Pustular Infecciosa e Balanopostite Pustular Infecciosa. Já o subtipo 5 (BoHV-5), cursa geralmente com doença nervosa, conhecida como Meningoencefalite Herpética Bovina (ANZILIERO et al., 2015). O diagnóstico direto de tais enfermidades é realizado principalmente através do isolamento viral em cultivo celular. Pode ser realizado ainda de forma indireta, pela pesquisa de anticorpos por ELISA e soroneutralização. O controle da enfermidade visa reduzir as perdas econômicas, especialmente de cunho reprodutivo, através da vacinação de animais suscetíveis (FRANCO et al., 2012), medida facilitada pela alta reatividade sorológica cruzada entre os subtipos virais (ANZILIERO et al., 2011). Vacinas atenuadas e inativadas estão comercialmente disponíveis, sendo que a maioria destas contém apenas o BoHV-1. É importante ressaltar que em fêmeas gestantes preconiza-se o uso de vacinas inativadas visto que as vacinas vivas apresentam grande risco aos fetos (FRANCO et al., 2012).

O BVDV pertence à família *Flaviviridae* e gênero *Pestivirus*. É o agente causador da diarreia viral bovina e da doença das mucosas (DIAS; SÂMARA, 2010). Uma grande variedade de manifestações clínicas estão associadas a este agente, sendo as perdas reprodutivas as mais relevantes. A maior preocupação em relação ao BVDV seria a identificação e eliminação de animais persistentemente infectados (PI), principais responsáveis pela disseminação do vírus dentro rebanho (LIMA et al., 2005). O diagnóstico pode ser realizado por exames indiretos como soroneutralização ou ELISA indireto, ou pela identificação do agente por exames diretos, como isolamento viral seguido de imunofluorescência (IFA) ou imunoperoxidase (IPX). Como forma de controle, preconiza-se a vacinação de rebanhos considerados de alto risco, ou seja, que possuem alta rotatividade de animais ou histórico de doença clínica. É possível encontrar diversos tipos de

vacinas no exterior, incluindo formas monovalentes e polivalentes, e inativadas ou atenuadas. Por outro lado, em território brasileiro somente vacinas inativadas têm comercialização permitida (RIDPATH et al., 2012).

O presente trabalho tem como objetivo realizar o monitoramento sorológico de rebanhos bovinos provenientes da região sul do Rio Grande do Sul, além de avaliar um rebanho em particular, imunizado com vacinas inativadas monovalentes contendo isolados locais do BoHV-5 e do BVDV, produzidas no Laboratório de Virologia e Imunologia (Labvir) da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas (UFPel).

2. METODOLOGIA

Durante os anos de 2013 e 2014, foi realizado um levantamento sorológico de rebanhos bovinos, vacinados e não vacinados contra o BoHV e/ou BVDV de diversas propriedades da região sul do estado. Neste período, foram coletadas amostras de sangue de 2.303 bovinos de corte e leite de 93 propriedades da região e encaminhadas ao Laboratório de Virologia e Imunologia da Faculdade de Veterinária da UFPel para realização do teste de soroneutralização (SN), para a detecção de anticorpos específicos contra o BoHV-1 e BVDV.

Além disto, está sendo avaliado um rebanho em particular de 36 fêmeas bovinas provenientes da Fazenda da Palma, localizada no município de Capão do Leão (RS). Os animais tinham histórico de problemas reprodutivos e serão imunizados com 3 doses de vacinas monovalentes (BoHV e BVDV) produzidas no Labvir. Amostras de sangue serão coletadas previamente a vacinação e após cada imunização (30 dias de intervalo) para a avaliação da resposta sorológica.

As vacinas utilizadas para imunização dos animais foram produzidas através da inoculação de suspensões virais de isolados locais do BoHV-5 e BVDV em cultivo celular. Os cultivos permaneceram em estufa a 37°C para amplificação viral e após foram submetidos ao congelamento. Para a inativação viral, adicionou-se 1% do volume total presente na garrafa, previamente descongelada, de solução de inativação, composta por brometo de 2-brometilamônio (BEI) e hidróxido de sódio (NaOH). Confirmada a inativação, foi então realizada a emulsificação de partes iguais da solução viral e de óleo mineral (composto por 10% de marcol e 90% de montanide).

Para realização dos testes de diagnóstico, as amostras de sangue coletadas foram processadas e armazenadas a -20°C até a realização do teste sorológico. A técnica de soroneutralização foi realizada, conforme descrita por FISCHER et al. (2007), para a pesquisa de anticorpos neutralizantes. Foram utilizadas microplacas de 96 cavidades onde os soros foram distribuídos e diluídos em proporções de 1:2 a 1:256. Após, adicionou-se suspensões virais de cepas padrão do BoHV-1 (Cooper) e do BVDV (NADL), na concentração de 100 DICC₅₀ (doses infectantes para 50% dos cultivos celulares) e as placas foram armazenadas durante 1h em estufa de 5% de CO₂ a 37°C. Posteriormente, adicionou-se 50µL de uma suspensão de células MDBK em cada cavidade e as placas foram novamente armazenadas na estufa de CO₂ a 37°C. Os cultivos foram monitorados diariamente e a leitura final realizada após 72-96h. O título de anticorpos específicos presente na amostra foi dado pela recíproca da diluição do soro capaz de prevenir o efeito citopático (ECP) característico de cada um dos vírus na monocamada de células.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos testes sorológicos referentes aos anos de 2013 e 2014 foram analisados e foi possível observar que no primeiro ano, de 396 animais vacinados para o herpesvírus bovino, 332 (83,8%) apresentaram resultado positivo. Já no segundo ano, de 542 animais vacinados, 395 (72,9%) apresentaram resultado positivo. Além disso, dentre os animais vacinados que apresentaram resultados positivos, 58,2% (em 2013) e 62,8% (em 2014) apresentaram títulos inferiores aos considerados protetores (1:32), segundo RIDPATH; BOLIN (1995).

Em relação ao vírus da diarreia viral bovina, ocorreu um resultado semelhante ao anterior, em que no ano de 2013, de 361 animais vacinados, 355 (98,3%) apresentaram resultado positivo. Já em 2014, apesar dos títulos observados apresentarem-se superiores ou iguais a 128 a taxa de animais vacinados que apresentaram resultado positivo foi de 235 animais (59,2%), de um total de 397 animais, evidenciando uma queda considerável em relação ao ano anterior.

Tais resultados demonstram a urgente necessidade da reavaliação dos imunógenos e/ou protocolos vacinais utilizados no país, principalmente contra o vírus da diarreia viral bovina, pelo baixo índice de animais soropositivos detectado nos rebanhos, fato também evidenciado por ANZILIERO et al. (2015), que através da avaliação de oito vacinas comerciais diferentes, identificou títulos protetores em somente duas, sendo uma composta por vírus vivo atenuado. Das outras seis, cinco não induziram resposta em nenhum animal, especialmente contra o BVDV-2.

Com base nestas observações, uma alternativa ao uso das vacinas comercialmente disponíveis no mercado nacional, seria a utilização de vacinas inativadas monovalentes contendo isolados locais do BVDV e BoHV como a que foi desenvolvida e vem sendo avaliada periodicamente em nível experimental pelo Labvir. Neste sentido, encontra-se em andamento a avaliação de um rebanho de 36 fêmeas bovinas, provenientes da Fazenda da Palma – UFPEL. Os animais do rebanho apresentavam histórico de doença reprodutiva com sinais clínicos como reabsorção fetal e perdas no final da gestação. No dia 02/06/2015, foi realizada a primeira vacinação dos animais com a vacina experimental produzida pelo Labvir e a primeira coleta de amostras de sangue para teste sorológico. As amostras foram encaminhadas ao Labvir para realização do teste de soroneutralização, a fim de detectar se os animais já possuíam anticorpos contra o BoHV e BVDV resultantes de possível exposição prévia aos vírus e/ou vacinação anterior. No dia 03/07/2015 foi realizada a 2ª dose das vacinas monovalentes e coleta de amostras de sangue de todos os animais para avaliação da resposta sorológica após a primeira imunização. Amostras de sangue serão ainda coletadas no momento da 3ª dose vacinal e 30 dias após para o monitoramento da resposta sorológica específica contra o BoHV e BVDV. Os resultados observados serão avaliados criteriosamente e posteriormente discutidos.

4. CONCLUSÕES

Os resultados do estudo sorológico realizado nos anos de 2013 e 2014 indicam que uma parcela importante dos animais imunizados contra o BVDV e ou BoHV permanecem soronegativos ou com títulos baixos de anticorpos neutralizantes.

Em virtude da avaliação específica de um rebanho de fêmeas bovinas da Fazenda da Palma encontrar-se em andamento, os resultados e conclusões após o

protocolo de vacinação com as vacinas experimentais monovalentes contra o BVDV e BoHV serão posteriormente apresentados e discutidos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANZILIERO, D.; et al. Resposta sorológica aos herpesvirus bovino tipos 1 e 5 e vírus da diarreia viral bovina induzida por vacinas comerciais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.45, n.1, p.58-63, 2015.

ANZILIERO, D.; et al. A recombinant bovine herpesvirus 5 detective in thymidine kinase and glycoprotein E is immunogenic for calves and confers protection upon homologous challenge and BoHV-1 challenge. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.154, p.14-22, 2011.

DIAS, F.C.; SÂMARA, S.I. A. Aspectos relevantes da infecção pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV). **Biológico**, São Paulo, v.72, n.1, p.1-9, 2010.

FINO, T.C.M.; et al. Infecções por herpesvirus bovino tipo 1 (BoHV-1) e suas implicações na reprodução bovina. **Revista brasileira de reprodução animal**, Belo Horizonte, v.36, n.2, p.122-127, 2012.

FISCHER, G.; et al. Immunomodulation produced by a green propolis extract on humoral and cellular responses of mice immunized with SuHV-1. **Vaccine**, n.25, p.1250-1256, 2007.

FRANCO, A.C.; ROEHE, P.E.; VARELA, A.P.M. *Herpesviridae*. In: FLORES, E.F. (Org.). **Virologia Veterinária**. Santa Maria: Editora UFSM, 2012. Cap.18, p.523-528.

JUNQUEIRA, J.R.C.; et al. Avaliação do desempenho reprodutivo de um rebanho bovino de corte naturalmente infectado com o BoHV-1, BVDV e *Leptospira hardjo*. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.27, n.3, p.471-480, 2006.

LIMA, M.; et al. Anticorpos neutralizantes contra o vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV): comparação entre um imunógeno experimental atenuado e três vacinas comerciais inativadas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.1, p.230-234, 2005.

RIDPATH, J.F.; BAUERMANN, F.V.; FLORES, E.F. *Flaviviridae*. In: FLORES, E.F. (Org.). **Virologia Veterinária**. Santa Maria: Editora UFSM, 2012. Cap. 23, p.683-685.

RIDPATH, J.F.; BOLIN, S.R. The genomic sequence of a virulent Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) from the type 2 genotype: detection of a large genomic insertion in a noncytopathic BVDV. **Virology**, Iowa, v.212, n.1, p.39-46, 1995.