

ESTUDO RETROSPECTIVO (2018 – 2019) DA PRESENÇA DE ANTICORPOS NEUTRALIZANTES CONTRA O *ALPHAHERPESVIRUS BOVINO 1* EM REBANHOS NO SUL DO BRASIL

LARIANE DA SILVA BARCELOS¹; RODRIGO BOZEMBECKER DE ALMEIDA², CRISTINA MENDES PETER²; NADÁLIN YANDRA BOTTON², PAULO RICARDO CENTENO RODRIGUES², GEFERSON FISCHER³

¹Universidade Federal de Pelotas – larianebarcelos@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – rodrigobozembecker@gmail.com, cristina_peter@hotmail.com, nadalinyb@gmail.com, priccenteno@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – geferson.fischer@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A bovinocultura ocupa uma posição de grande importância na economia brasileira, contando com mais de duzentos milhões de cabeças em todo o país (IBGE, 2017). Deste modo, compreender as enfermidades que afetam a produção, bem como identificá-las, é essencial para o seu controle. Dentre as enfermidades que afetam a produção bovina, está a rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), causada pelo *Alphaherpesvirus bovino 1* (BoHV-1). O BoHV-1 é um vírus de genoma DNA fita dupla, envelopado, pertencente à família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae* e gênero *Varicellovirus* (ICTV, 2018). Possui reatividade sorológica cruzada com o *Alphaherpesvirus bovino 5*, agente causador de menigoencefalite herpética (ROEHE et al., 1997).

Característico dos vírus da subfamília *Alphaherpesvirinae*, o BoHV-1 direciona-se às terminações nervosas e permanece em latência nos gânglios nervosos. Quando o animal passa por imunossupressão, ocorre o transporte anterógrado para o local de infecção e o vírus volta a ser excretado, culminando com a manifestação dos sinais clínicos (JONES, 2003). Apesar da denominação “rinotraqueíte”, o maior impacto da doença em um rebanho bovino está relacionado ao trato reprodutivo. Com alta taxa de morbidade, o BoHV-1 causa sinais como dispneia, tosse, descarga nasal serosa, assim como uma alta taxa de retorno ao cio, retenção de placenta, abortos, vulvovaginite pustular infecciosa (IPV) em fêmeas e balanopostite pustular infecciosa (IPB) em machos (LEMAIRE et al., 1994).

A soroneutralização (SN) é o teste diagnóstico considerado padrão-ouro para mensurar anticorpos neutralizantes contra o BoHV (HOLZ et al., 2010). A enfermidade pertence a lista de doenças de notificação obrigatória mensal de qualquer caso confirmado de IBR/IPV do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2013). É importante ressaltar que a latência viral, a presença de animais assintomáticos, a falta de diagnóstico e de medidas de controle são fatores que contribuem para permanência do vírus nos rebanhos. O presente trabalho teve como objetivo realizar um estudo retrospectivo da presença de anticorpos neutralizantes contra o BoHV-1 em amostras de sangue provenientes de bovinos do sul do Brasil, recebidas no Laboratório de Virologia e Imunologia (LabVir) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) nos anos de 2018 e 2019.

2. METODOLOGIA

No período de março de 2018 a agosto de 2019, foram encaminhadas ao LabVir/UFPel, 779 amostras de sangue bovino, sendo 385 de animais vacinados e 394 de não vacinados contra o BoHV-1, para análise da presença de anticorpos

neutralizantes contra esse agente, advindas de 38 propriedades rurais, dos seguintes municípios do Rio Grande do Sul: Pelotas, Capão do Leão, Bagé, Bom Jesus, Pedro Osório, São João da Urtiga, Dom Pedrito, São José do Norte, Santa Vitória do Palmar, Piratini, Candiota, Morro Redondo, Rio Grande, Tupanci do Sul, Arroio Grande e Cacique Doble; e de Santa Catarina: Arabutã. Todas as amostras foram submetidas ao teste de SN em microplacas de 96 cavidades.

As amostras, refrigeradas, foram recebidas em tubos de coleta sem anticoagulante. Primeiramente, retirou-se o soro das amostras (separado naturalmente ou por centrifugação), colocando-os, na sequência, em um banho-maria a 56 °C por 30 minutos, para inativação do sistema complemento. Em uma capela de fluxo laminar, procedeu-se o teste de SN, utilizando microplacas de 96 cavidades. Por cavidade, foram adicionados 25 µl de MEM (meio essencial mínimo) com 10% de SFB (soro fetal bovino), com exceção das 6 cavidades de controle celular, que receberam 50 µl. Na linha A ($A_1 - A_n$) da microplaca, adicionou-se 25 µl das amostras de soro a serem testadas, que foram diluídas, de forma seriada, na base 2, ao longo da placa (colunas de A-H). Na sequência, colocou-se 25 µl do vírus (BoHV-1 cepa *Los Angeles*), com título conhecido, sob 100 DICC₅₀ (doses infectantes para 50% dos cultivos celulares) em cada cavidade, com exceção do controle celular. A microplaca foi submetida a incubação em estufa a 37 °C com 5% de CO₂ por 1 hora, para formação do complexo antígeno-anticorpo. Em seguida, adicionou-se 50 µl de células MDBK (*Madin-Darby bovine kidney*), numa concentração de 30.000 células/cavidade, em todas as cavidades da microplaca e incubou-se novamente em estufa a 37 °C com 5% de CO₂, até realização das leituras.

O controle utilizado na execução do teste de SN baseou-se no controle celular e na retrotitulação. A retrotitulação foi realizada em 12 cavidades da microplaca com diluições controle do vírus (com título conhecido), sendo 4 cavidades na diluição 10 DICC₅₀, 4 cavidades na diluição 1 DICC₅₀ e 4 cavidades na diluição 0,1 DICC₅₀. O teste foi validado quando houve efeito citopático nas 4 cavidades com diluição 10 DICC₅₀ e em 2 das cavidades com diluição 1 DICC₅₀. As leituras para determinar a presença – ou ausência - de efeito citopático foram realizadas em 48 e 72h, quando houve confirmação da diluição do vírus em 100 DICC₅₀ na retrotitulação. Foram consideradas negativas as amostras que apresentaram efeito citopático em todas as diluições do soro. O título corresponde a maior diluição na qual não foi observado efeito citopático.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As 779 amostras de soro foram submetidas ao teste de SN, utilizando a cepa *Los Angeles* de BoHV-1, para titulação de anticorpos neutralizantes contra o vírus. Dos animais não vacinados, 334 (84,77%) foram negativos (título 0) ao teste de SN, semelhante aos dados encontrados por BECKER et al. (2015), ao analisarem a prevalência de anticorpos contra BoHV-1 em bovinos do sul do Brasil, nos anos de 2013 e 2014. Dentre os animais vacinados, 92 (23,89%) foram negativos, resultados semelhantes aos encontrados por ANZILIERO et al (2015), ao analisarem a resposta de bovinos submetidos a vacinas comerciais contra BoHV-1. Animais negativos, mesmo vacinados, deve-se, possivelmente, a queda do título de anticorpos após passado algum tempo da vacinação, o que ocorre naturalmente, razão pela qual há necessidade de reforços periódicos da vacinação no rebanho, ou, ainda, possíveis falhas vacinais. Um total de 353 amostras foram positivas na SN, com títulos variando de 2 a ≥ 256 . A Tabela 1 demonstra os títulos de anticorpos contra o BoHV-1 encontrados na SN de animais vacinados e não vacinados.

**Tabela 1.** Resultados do teste de soroneutralização de animais vacinados e não vacinados contra o *Alphaherpesvirus bovino* 1.

Título	Vacinados	Não vacinados
0	92	334
2	34	7
4	35	6
8	31	5
16	44	14
32	44	10
64	40	11
128	32	6
≥256	33	1
Total	385	394

Um resultado positivo na SN pode ser utilizado para observar a eficácia de vacinas, dado que ele aponta o título de anticorpos circulantes, que são o objetivo da vacinação. Logo, um resultado positivo na SN pode ser apenas devido aos anticorpos vacinais, principalmente se a vacinação for recente (há cerca de 1 mês) (ANZILIERO et al., 2015). As vacinas comerciais disponíveis no Brasil não permitem diferenciação de anticorpos vacinais de imunidade adquirida, sendo impossível, ao exame, determinar sua origem (FLORES, 2017).

Além disso, o resultado positivo pode ser causado pela presença de anticorpos maternos ainda circulantes, obtidos principalmente via colostro. Em casos em que há essa possibilidade, recomenda-se repetir o teste passados 30 dias (BACCILI et al., 2018). Animais com resultado positivo ao teste de SN podem, ainda, estar sob infecção ativa (entraram em contato com o vírus de campo e estão gerando anticorpos contra ele), nesses casos teremos, além da presença de anticorpos, sinais clínicos (MÉDICI et al., 2000). As condições de diagnóstico para confirmação de IBR demonstram a importância da relação entre clínica e laboratório, dado que são necessários apontamentos de ambos para determinar a infecção clínica ativa, que deve ser reportada.

Com o conhecimento das enfermidades e de suas peculiaridades, unindo clínica e diagnóstico laboratorial, poderão ser corretamente implementadas medidas de controle (como acompanhamento sorológico do rebanho, adequado manejo, boa nutrição, vacinação periódica e cuidados na introdução de novos animais ao rebanho) (PASQUALOTTO et al., 2015). Dentre as medidas de controle da IBR, o acompanhamento sorológico demonstrou-se de grande importância, pois com dados pareados torna-se possível planificar a situação imunológica do rebanho com relação a agentes patogênicos, de forma a aplicar a medida mais eficiente para cada situação.

4. CONCLUSÕES

Os resultados demonstram a circulação do BoHV-1 no rebanho bovino do sul do Brasil, e que uma parcela dos animais imunizados permanece soronegativo ou com títulos baixos de anticorpos neutralizantes. Isso indica que medidas de controle mais eficazes precisam ser adotadas para o controle da doença.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

BACCILI, C. C.; SILVA, C. P. C. C.; BALDACIM, V. A. P.; et al. Influência da vacinação materna na transferência de imunidade passiva contra as viroses respiratórias dos bovinos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 70, n. 2, p. 391-400, 2018.

BECKER, A. S.; RODRIGUES, M. G.; ORLANDIN, J. R.; et al. Anticorpos neutralizante contra o herpesvírus bovino 1 e o vírus da diarréia viral bovina em bovinos vacinados e não vacinados da região sul do estado do Rio Grande do Sul. **Science and Animal Health**, v. 3, n. 2, p. 209-220, 2015.

FLORES, E. F. **Virologia Veterinária**. Santa Maria: UFSM, 2017.

HOLZ, C. L.; CIBULSKI, S. P.; TEIXEIRA, T. F.; et al. Serum neutralization with different types and subtypes of bovine herpesvirus 1 anDISCd 5. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 7, p. 515-522, 2010.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Efetivo do rebanho bovino no Brasil**. Acessado em 05 set. 2019. Online. Disponível em: sidra.ibge.gov.br.

ICTV - International Committee on Taxonomy of Viruses. **Taxonomy**. Acessado em 08 set. 2019. Online. Disponível em: talk.ictvonline.org.

JONES, C. Herpes Simplex Virus Type 1 and Bovine Herpesvirus 1 Latency. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 1, p. 79-95, 2003.

LEMAIRE, M.; PASTORET, P.P.; THIRY, E. Le contrôle de l'infection pas le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine. **Annales de médecine vétérinaire**, v.138, n.3, p.167-180, 1994.

MAPA- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Lista de doenças animais de notificação obrigatória**. Online. Disponível em: agricultura.gov.br

MÉDICI, K. C.; ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F. Prevalência de anticorpos neutralizantes contra o herpesvírus bovino tipo 1, decorrente de infecção natural, em rebanhos com distúrbios reprodutivos. **Ciência Rural**, v. 30, n. 2, p. 347-350, 2000.

PASQUALOTTO, W.; SEHNEM, S.; WINCK, C. A. Incidência de rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), diarreia viral bovina (BVD) e leptospirose em bovinos leiteiros da região oeste de Santa Catarina – Brasil. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 8, n. 2, p. 249-270, 2015.

ROEHE, P. M.; SILVA, T. C.; NARDI, N. B.; et al. Diferenciação entre os vírus da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (BHV-1) e herpesvírus da encefalite bovina (BHV-5) com anticorpos monoclonais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.17, n. 1, p. 41-44, 1997.