

TÍTULOS DE ANTICORPOS ANTI-HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 1 (BoHV-1) DE BEZERRAS EM TRÊS REBANHOS LEITEIROS DO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL

**ANTIBODIES TITERS AGAINST BOVINE HERPESVIRUS TYPE 1 (BoH-1) FROM CALVES
ON THREE DAIRY FARMS IN SÃO PAULO STATE, BRAZIL**

**S. P. GATTI, I. B. AFFONSO, F. C. DIAS, A. S. R. MEDEIROS,
F. FERREIRA, S. I. SAMARA**

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar os títulos de anticorpos de bezerras de zero a doze meses de idade, em três propriedades de baixa, média e alta prevalência de BoHV-1. Os soros colhidos periodicamente foram analisados e titulados pelo teste de vírus-neutralização. Em rebanho de baixa prevalência de BoHV-1, não existiu diferença nos títulos de anticorpos colostrais entre filhas de vacas vacinadas e não vacinadas contra o BoHV-1. Em rebanhos de média e alta prevalência de BoHV-1, os títulos de anticorpos foram mais elevados nas bezerras nascidas de vacas positivas e vacinadas contra BoHV-1. A avaliação zootécnica demonstrou que quando as bezerras são manejadas corretamente e mantidas com cuidados de higiene sanitária e alimentação balanceada, não sofrem infecção em quaisquer circunstâncias de prevalência de BoHV-1. Assim, o manejo é fundamental quando se tem por objetivo controlar e/ou erradicar o BoHV-1 do rebanho.

PALAVRAS-CHAVE: Bezerras. BoHV-1. Manejo. Título de anticorpos. Vírus-neutralização. Vacinação.

SUMMARY

This study aimed to evaluate the antibody titers of calves from zero to twelve months in three properties, with low, medium and high prevalence of BoHV-1. Sera were collected periodically, analyzed and titrated by virus neutralization test. In herd with low BoHV-1 prevalence, there was not difference in antibody titers from colostrum in calves born from cows vaccinated or not against BoHV-1. In herds with medium and high BoHV-1 prevalence, antibody titers were greater in calves born from cows positive and vaccinated against BoHV-1. The zootechnical evaluation showed that calves well-managed in relation to hygiene and quality of feed do not get infected in any type of BoHV-1 situation prevalence. Thus, the management is essential when it aims to control or eradicate the BoHV-1 from the herd.

KEY-WORDS: Calves. BoHV-1. Management. Antibody titers. Virus-neutralization. Vaccination.

INTRODUÇÃO

O hpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) é um agente patogênico pertencente à família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae* e está associado com rinotraqueite infecciosa bovina, conjuntivite, abortamento e vulvovaginite e balanopostite pustular infecciosa, ocasionando perdas expressivas na pecuária (GIBBS & RWEYEMAMU, 1977, HAGE et al., 1996).

Depois de infectados, os animais tornam-se portadores vitalícios do vírus e este permanece em latência nos gânglios nervosos do hospedeiro, até que ocorra a reativação viral, induzida principalmente por mecanismos de estresse que diminua a resistência imunológica do hospedeiro (ACKERMANN et al., 1982, STRAUB, 1990).

Para recomendar procedimentos de controle da enfermidade em nosso país, incluindo o uso de vacinas, em propriedades com até 20% de animais positivos para BoHV-1, consideradas de baixa prevalência, a melhor estratégia a ser aplicada seria a realização de testes nos animais e descarte dos que estiverem infectados. No caso de rebanhos com 20% a 50% de animais positivos, considerados de prevalência média, recomenda-se o uso de vacinas convencionais nos animais doentes, o que permite o convívio destes com animais sadios, e ainda, o descarte gradual e em tempo mais longo dos animais positivos. Em rebanhos com alta prevalência da infecção (acima de 50%), o controle com uso de vacinas em todo o rebanho é o procedimento indicado para o controle do vírus (DEL FAVA, 1996, 2002).

Outro ponto a ser tratado para o controle da enfermidade é o fornecimento de colostro para animais recém nascidos. Mesmo declinando gradativamente os anticorpos contra BoHV-1 de origem materna se mantêm dos 3 aos 7 meses de idade nos bezerros, para depois desaparecerem caso os animais não sofram infecção intercorrente (LEMAIRE et al., 1994). Segundo Mechor et al. (1987) os anticorpos contra BoHV-1 transferidos pelo colostro podem proteger neonatos da forma clínica sistêmica da infecção.

Como a infecção pelo BoHV-1 é uma enfermidade cosmopolita, é irrefutável que este vírus encontra-se disseminado entre bovinos de todos os continentes (STRAUB, 1990). Sua capacidade de manter-se em latência podendo ser reativado mesmo em animais vacinados (LEMAIRE et al., 1994) tem facilitado a disseminação viral em rebanhos cujo estado sanitário ainda não é uma preocupação primordial, como é o caso específico de grande parte das criações nacionais.

Este estudo teve por objetivo avaliar os títulos de anticorpos contra o BoHV-1 em bezerras nascidas e criadas ao longo de 12 meses em três rebanhos naturalmente infectados, que apresentavam baixa, média e alta prevalência de BoHV-1.

MATERIAL E MÉTODOS

Selecionou-se sete fazendas que criam bovinos para produção leiteira em regime de confinamento com semelhanças de condições de manejo nutricional e

sanitário, frequência de abortamentos, presença de casos clínicos da forma respiratória da enfermidade, trânsito de animais e de forma obrigatória, a ausência de vacinação contra o BoHV-1. Por meio de amostragens representativas dos animais dessas propriedades, foram determinadas as prevalências sorológicas de BoHV-1, e dentre elas, três propriedades localizadas em Jaboticabal (A), Altinópolis (B) e Viradouro (C), Estado de São Paulo, foram selecionadas para o estudo e classificadas em rebanhos de baixa, média e alta prevalência, respectivamente, segundo critérios definidos por Del Fava (1996).

Por meio da técnica de vírus-neutralização (VN) preconizada pela OIE (2005) foram determinadas as seguintes prevalências de BoHV-1: 1,6%, 40,0% e 78,6%, para as propriedades A, B e C, respectivamente.

Definida a situação epidemiológica do BoHV-1, vacas prenhes foram selecionadas em cada fazenda, das quais 50% foram vacinadas utilizando vacina monovalente contendo BoHV-1 inativado, com aplicação de reforço trinta dias após a primeira vacinação. Essas fêmeas estavam no terço final da prenhez possibilitando assim a realização da vacinação e revacinação, 60 e 30 dias antes do parto, respectivamente.

Após o parto, os bezerros recém-nascidos permaneceram com suas mães somente nas primeiras 24 horas, sendo posteriormente os machos descartados e as fêmeas alocadas em bezerreiros individuais até o desmame que ocorreu aos 60 dias de idade. Durante esse período, as bezerras foram aleitadas artificialmente com quatro litros ao dia, divididos em dois períodos, além do fornecimento de água a vontade. Após o desmame, as bezerras foram transferidas para piquetes, onde foram adotados controle sanitário, como a vermifugação e observação dos animais com exame físico periódico; controle zootécnico, como a qualidade e quantidade da alimentação; e, também, o controle de manejo, separando os lotes de animais por idade. Os grupos experimentais foram assim constituídos:

GRUPO 1B (baixa prevalência) – 5 filhas de vacas negativas e não vacinadas

GRUPO 2B (baixa prevalência) – 5 filhas de vacas negativas e vacinadas

GRUPO 1M (média prevalência) – 9 filhas de vacas negativas e não vacinadas

GRUPO 2M (média prevalência) – 9 filhas de vacas negativas e vacinadas

GRUPO 3M (média prevalência) – 10 filhas de vacas positivas e não vacinadas

GRUPO 4M (média prevalência) – 9 filhas de vacas positivas e vacinadas

GRUPO 2A (alta prevalência) – 9 filhas de vacas negativas e vacinadas

GRUPO 3A (alta prevalência) – 10 filhas de vacas positivas e não vacinadas

GRUPO 4A (alta prevalência) – 10 filhas de vacas positivas e vacinadas

As amostras de sangue, tanto das vacas como das bezerras, foram colhidas por punção da veia jugular

externa ou caudal mediana em frascos tipo Vacutainer® de 10 mL sem aditivos, utilizando-se de agulhas hipodérmicas descartáveis. O sangue foi levado ao laboratório, centrifugado a 1.800 G por 15 minutos, o soro separado em alíquotas de 1 mL em tubos tipo Eppendorf® os quais foram posteriormente inativados em banho-maria à temperatura de 56°C durante 30 minutos, e armazenados à temperatura de -20°C até o momento de serem testados. As colheitas de amostras de sangue foram realizadas quando as bezerras completaram 1, 2, 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 330 e 360 dias de vida.

A titulação de anticorpos foi realizada por meio da técnica de VN, recomendada pela OIE (2005). Para tanto, o soro dos animais foram descongelados e diluídos em microplacas de 96 cavidades, a partir da diluição 1:2 até 1:1024. Como antígeno, foi utilizada a amostra padrão de vírus BoHV-1, proveniente da Universidade de Campinas (UNICAMP 9 MDBK), ajustada a uma concentração de 200 TCID50 por cavidade. A mistura soro-vírus foi incubada por 24 horas e após este período, foram adicionadas células de linhagem contínua de rins de bovino - Madin & Darby bovine kidney (MDBK), mantidas em frascos de poliestireno (TTP®), em meio essencial mínimo (Eagle-MEM), adicionado de 10% de soro fetal bovino (SFB). As microplacas foram acondicionadas em estufa com tensão de CO₂ controlada a 5%, em temperatura de 37°C por um período de 72 horas. Em todas as placas foram utilizadas como controle de células duas colunas com células não inoculadas.

Para a leitura, a amostra de soro considerada positiva pela presença de anticorpos foi aquela que neutralizou o vírus a partir da diluição 1:2. O cálculo da Dose Neutralizante Cultura de Células 50% (DNCC50%), ou seja, o título de anticorpos neutralizantes foi realizado pelo método de Reed & Muench (1938) e expresso em logaritmo decimal.

Os dados foram submetidos ao teste de homogeneidade de variância e a dois testes de normalidade, o teste de Kolmogorov-Smirnov e o de Shapiro-Wilk. Para a análise dos títulos de anticorpos colostrais, a avaliação comparativa dos grupos de estudo ao longo do tempo (na mesma propriedade e

entre as propriedades) foi realizada a partir de testes não paramétricos. O teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis definiu em quais colheitas havia diferença estatisticamente significativas entre os grupos, e o teste não-paramétrico de Mann-Whitney mostrou quais os grupos que diferiram entre si.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 mostra graficamente as médias dos títulos de anticorpos dos animais do Grupo 1B (filhas de vacas negativas e não vacinadas) e dos animais do Grupo 2B (filhas de vacas negativas e vacinadas). Os animais do grupo 1B (filhas de vacas negativas e não vacinadas) permaneceram negativos à prova de VN durante todo o período de estudo, enquanto que os animais do grupo 2B (filhas de vacas negativas e vacinadas) apresentaram baixos títulos de anticorpos até os 30 dias de idade. Pela análise estatística da característica sorológica apresentada, constatou-se que não houve diferença significativa entre os dois grupos.

Nesse primeiro modelo experimental (ambiente com baixa prevalência da enfermidade) há indícios de que não houve a introdução do BoHV-1 na propriedade, durante todo o período do estudo, já que as bezerras nascidas de vacas não vacinadas em nenhum momento soroconverteram e as filhas de vacas vacinadas, em concordância com as informações de Lemaire et al. (1994) tornaram-se soronegativas depois de queda rápida dos títulos de anticorpos de origem colostrar.

O fato dos títulos de anticorpos de origem materna nas bezerras nascidas de vacas vacinadas (2B), serem similares ($p < 0,05$) às bezerras nascidas de vacas não vacinadas (1B), difere dos resultados obtidos por Moreira et al. (2001), quando observaram que bezerros nascidos de vacas vacinadas, infectadas ou não pelo BoHV-1, apresentavam médias de títulos de anticorpos maiores que as médias demonstradas por bezerros provenientes de vacas não vacinadas, provavelmente em decorrência de maior risco de infecção dos animais, já que a propriedade naquele estudo possuía alta prevalência da infecção.



Figura 01 – Médias dos títulos de anticorpos neutralizantes (log) para o BoHV-1, determinadas em amostras sanguíneas de bezerras pertencentes ao rebanho de baixa prevalência no município de Jaboticabal, Estado de São Paulo.

A Figura 2 retrata as médias dos títulos de anticorpos contra o BoHV-1 dos quatro grupos experimentais da fazenda de média prevalência. Observa-se que os animais nascidos de vacas negativas e não vacinadas (grupo 1M) não soroconverteram durante o experimento.

Nessa fazenda com prevalência média de 40%, foi possível constatar que o vírus não estava circulando entre as bezerras. Apesar da existência de animais adultos infectados, não houve soroconversão dos animais nascidos de vacas negativas e não vacinadas (grupo 1M) em nenhum momento da avaliação, como também das bezerras nascidas de vacas negativas e vacinadas (grupo 2M), de vacas positivas e não vacinadas (grupo 3M), assim como daqueles oriundos de vacas positivas e vacinadas (grupo 4M), mesmo após o declínio dos anticorpos de origem colostrálica. Deste modo, uma vez que se tornaram negativos na VN, assim permaneceram até o final do período de observação.

Observa-se que as médias de títulos de anticorpos de origem colostrálica foram maiores no grupo de bezerras nascidas de vacas positivas e vacinadas contra BoHV-1 (grupo 4M) quando comparadas às médias dos títulos de anticorpos de origem materna observadas nas bezerras nascidas de vacas negativas e não vacinadas (grupo 1M) e das bezerras nascidas de vacas negativas e vacinadas (grupo 2M). Uma provável causa deste fator é que as fêmeas positivas ao serem vacinadas foram conduzidas a um estado de hiperimunização no qual segundo Lemaire et al. (1994), o antígeno vacinal é capaz de reforçar a resposta de memória imunológica provocada pelo vírus de campo nas vacas e consequentemente transferir para as bezerras uma melhor imunidade com maior persistência dos anticorpos de origem colostrálica.

Na colheita aos 15 dias de vida, além das diferenças citadas acima, a média do título de anticorpos de origem colostrálica das bezerras nascidas de vacas negativas e não vacinadas (grupo 1M) foi significativamente menor que a média de títulos apresentada pelas bezerras nascidas de vacas positivas e não vacinadas (grupo 3M). Nessa ocasião foi possível perceber a influência da infecção prévia nas vacas pelo BoHV-1 na resposta imune que se refletiu em uma maior transferência de anticorpos pelo colostro.

Para a propriedade de C, a prevalência encontrada de BoHV-1 foi 78,6%. Observa-se pela Figura 3 que após o declínio dos títulos de anticorpos de origem colostrálica, independentemente do grupo, os animais permaneceram negativos no teste de VN. Provavelmente, após o declínio dos anticorpos colostrálicos, os animais não se infectaram mesmo em condições ambientais com alta prevalência de BoHV-1, porém com manejo sanitário que impediu a infecção das bezerras. Esses resultados são diferentes dos obtidos no estudo conduzido por Moreira et al. (2001),

no qual foi constatado que apesar de apresentarem elevados títulos de anticorpos de origem colostrálica, os bezerrões se infectaram pois eram mantidos em ambiente de alta prevalência da infecção.

Quanto à persistência dos anticorpos colostrálicos, as bezerras nascidas de vacas negativas e vacinadas (grupo 2A) apresentaram-se sorologicamente negativas aos 90 dias de idade. Portanto, muito diferente do tempo citado por Lemaire et al. (1994) no qual bezerrões mantiveram na corrente sanguínea os anticorpos contra BoHV 1 de origem materna até os 210 dias de vida, para depois tornarem-se negativos, caso não sofressem infecção intercorrente. No entanto, as bezerras nascidas de vacas positivas e não vacinadas (grupo 3A) e das filhas de vacas positivas e vacinadas (grupo 4A) apresentaram resultados diferentes, pois tiveram maior persistência dos anticorpos colostrálicos se aproximando mais das informações de Lemaire et al. (1994).

O grupo de filhas de vacas positivas e vacinadas (grupo 4A) apresentou médias de títulos de anticorpos significativamente maiores que as médias de títulos das filhas de vacas negativas e vacinadas (grupo 2A) nas colheitas do dia 1, 2, 15 e 30. A média dos títulos de filhas de vacas positivas e vacinadas (grupo 4A) só foi significativamente maior que a média das filhas de vacas positivas e não vacinadas (grupo 3A) na colheita realizada no dia 1.

Assim, os resultados mostraram que bezerras nascidas de vacas positivas, vacinadas ou não contra o BoHV-1 apresentaram maior concentração de anticorpos colostrálicos que bezerras provenientes de vacas negativas e vacinadas.

Portanto, esse estudo demonstrou que independentemente da pressão de infecção, manejar o rebanho de forma correta pode amenizar a difusão do BoHV-1 e consequentemente diminuir as perdas econômicas, como a morte de animais, abortamentos, diminuição da produção de leite, e menor ganho de peso (JANZEN, et al., 1980, MILLER, 1991, ZHOU et al., 1999).

Enfim, percebe-se que a infecção pelo BoHV-1 está associada com alguns fatores predisponentes relacionados às características do sistema intensivo de confinamento, como o contato de bezerrões com animais adultos na fase em que a imunidade passiva colostrálica terminou ou não apresenta níveis significativos; a constante rotatividade com a introdução de animais suscetíveis ou infectados nas propriedades; e também, a alta densidade de animais, além de outros meios estressantes (GIBBS & RWEYEMAMU, 1977, VAN SCHAİK et al., 1999). Conclui-se que o controle sanitário, controle zootécnico, e também, o manejo contribuiu para eliminar fatores estressantes que evitaram a infecção dos bezerrões criados em qualquer uma das três diferentes situações epidemiológicas de prevalência de BoHV-1.

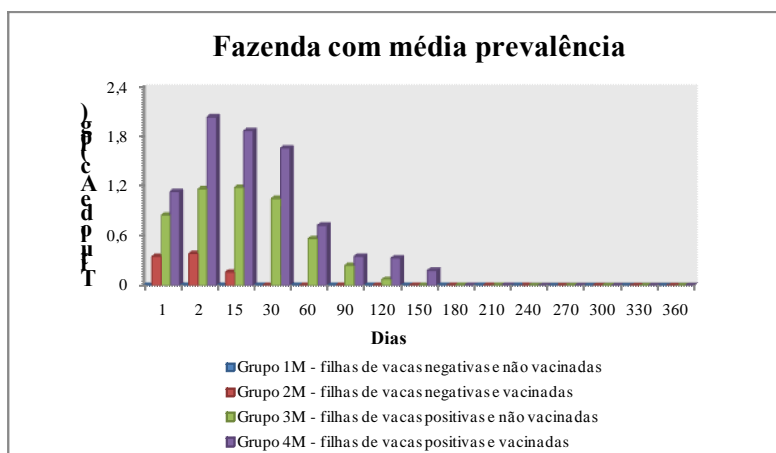


Figura 02 – Médias dos títulos de anticorpos neutralizantes (log) para o BoHV-1, determinadas em amostras sanguíneas de bezerras pertencentes ao rebanho de média prevalência no município de Altinópolis, Estado de São Paulo.

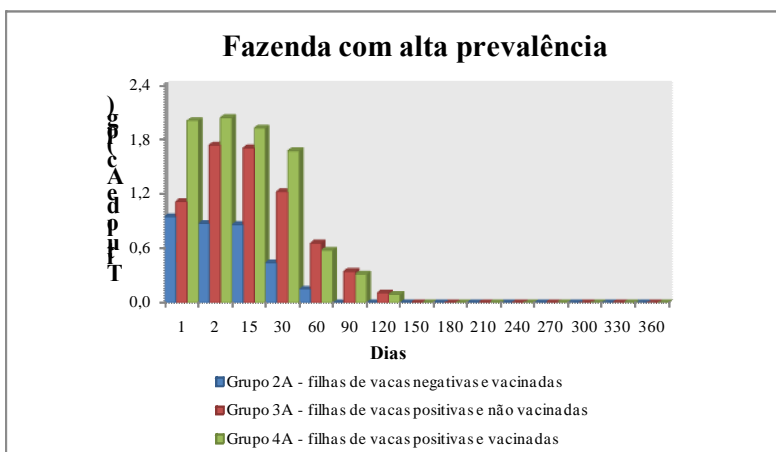


Figura 03 – Médias dos títulos de anticorpos neutralizantes (log) para o BoHV-1, determinadas em amostras sanguíneas de bezerras pertencentes ao rebanho de alta prevalência no município de Viradouro, Estado de São Paulo.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro (Processo nº 00/07750-5).

REFERÊNCIAS

ACKERMANN, M., PETERHANS, E., WYLER, R. DNA of the bovine herpesvirus type 1 in the trigeminal ganglia of latent infected calves. *American Journal of Veterinary Research*, v. 43, n. 1, p. 36-40, 1982.

DEL FAVA, C. **Importância do estudo da epidemiologia e combate das doenças à vírus no atual contexto da pecuária brasileira.** In: REUNIÃO TÉCNICA DA SEÇÃO DE SANIDADE ANIMAL DO INSTITUTO DE ZOOTECNIA, 1, 1996, Nova Odessa. p.41-47.

DEL FAVA, C., PITUCO, E. M., D'ANGELINO, J. L. Herpesvírus Bovino Tipo-1 (HVB-1): revisão e

situação atual no Brasil. *Revista de Educação Continuada*, v.5, n.3, p.300-312, 2002.

GIBBS, E. P. J., RWEYEMAMU, M. M. Bovine herpesviruses. Part I. Bovine herpesvirus 1. *Veterinary Bulletin*, v.47, n.5, p.317-343, 1977.

HAGE, J. J., SCHUKKEN, Y. H., BARKEMA, H. W. Population dynamics of bovine herpes 1 infection in a dairy herd. *Veterinary Microbiology*, v.53, p.317-343, 1996.

JANSEN, E. D., SMART, J. N., NICHOLSONET, H. H. al. Observations on an outbreak of infectious bovine rhinotracheitis in a bull test station. *Canadian Veterinary Journal*, v. 21, p.24-27, 1980.

LEMAIRE, M., PASTORET, P. P., THIRY, E. Le contrôle de l'infection par le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine. *Annales de Médecine Vétérinaire*, v.138, p.167-180, 1994.

MECHOR, G. D., ROUSSEAU, C. G., RADOSTITS, O. M., BABIUK, L. A., PETRIE, L. Protection of newborn calves against fatal multisystemic infectious bovine rhinotracheitis by feeding colostrum from vaccinated cows. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.51, p.452-459, 1987.

MILLER, J. M. The effects of IBR virus infection on reproductive function of cattle. **Veterinary Medicine**, v.86, p.95-98, 1991.

MOREIRA, S. P. G., SAMARA, S. I., ARITA, G. M. M., FERREIRA, F., PEREIRA, G. T. Monitoração de anticorpos neutralizantes para o vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina em bezerros. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.38, n.3, p.127-130, 2001.

OIE. Infectious Bovine Rhinotracheitis/Infectious Pustular Vulvovaginitis, Manual of Standards for Diagnostics Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. 2004. Disponível em: <http://www.oie.int/eng/norms/mmanual/A_00056.htm>. Acesso em: 01 set 2005.

REED, L. J., MUENCH, H. A simple method of estimating 50 per cent end point. **American Journal of Hygiene**, v.27, p.493-497, 1938.

SIEGEL, S. Nonparametric statistics for the behavioral sciences. Tokyo: McGraw-Hill Book Company, 1956. 312p.

STRAUB, O. C. **Infectious bovine rhinotracheitis virus**. In: DINTER, Z., MOREIN, B.(Ed.). Virus infections of vertebrates. Nova Iorque: Elsevier Science, 1990. p.71-108.

VAN SCHAIK, G., SCHUKKEN, Y. H., NIELEN, M., DIJKHUIZEN, A. A., HUIRNE, R. B. M. Application of survival analysis to identify management factors related to the rate of BHV-1 seroconversions in a retrospective study of Dutch dairy farms. **Livestock Production Science**, v.60, p.371-382, 1999.

ZHOU, J., LYAKY, J., FEDRICKSON, R. A., KIBENGE, F. S. Improved detection of bovine herpesvirus 1 in artificially infected bovine semen by protein amplification. **Journal of Virological Methods**, v. 79, p. 181-189, 1999