

DIFERENÇAS EM NÍVEIS DE ANTICORPOS NEUTRALIZANTES CONTRA HERPESVÍRUS BOVINOS TIPOS 1 (BHV-1) E 5 (BHV-5)

MARJORIE F. BECK TEIXEIRA¹, PAULO AUGUSTO ESTEVES², CYNTHIA SOFIA SCHMIDT COELHO³, TAMIR CALCAGNOTTO da SILVA⁴, LILIANE GUIMARÃES OLIVEIRA⁵, PAULO MICHEL ROEHE⁶

RESUMO – Com o objetivo de comparar os anticorpos neutralizantes induzidos por infecções por herpesvírus bovinos, 508 soros bovinos foram testados pela prova de soroneutralização (SN) frente aos Herpesvírus Bovinos tipo 1 (BHV-1) e tipo 5 (BHV-5). Duzentos e quarenta e nove (49%) foram negativos para ambos os vírus, enquanto que 290 (57%) foram positivos para BHV-1 e 288 (57%) foram positivos para BHV-5. No entanto, 41 (8%) dos soros positivos para BHV-1 foram negativos para anticorpos anti-BHV-5. Por outro lado, 39 (7,7%) dos soros positivos para BHV-5, foram negativos para BHV-1. Estes resultados indicam que, se a SN for utilizada com a finalidade de avaliar o status sorológico de infecções por BHV-1 e BHV-5, os testes devem ser realizados frente aos dois tipos de vírus, uma vez que eles não induzem reatividade cruzada em todos os animais.

Palavras-chave: herpesvírus, bovino, BHV-1, BHV-5.

DIFFERENCES IN NEUTRALIZING ANTIBODY LEVELS TO BOVINE HERPESVIRUSES TYPES 1 (BHV-1) AND 5 (BHV-5)

ABSTRACT – In order to compare the neutralizing antibody response after natural bovine herpesvirus infections, 508 cattle sera were tested by serum neutralization (SN) against bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) and bovine herpesvirus type 5 (BHV-5). Two hundred and forty-nine (49%) sera were negative for antibodies to both viruses, whereas 290 (57%) were positive for BHV-1 and 288 (57%) were positive for BHV-5 antibodies. However, 41 (8%) of the BHV-1-positive sera were negative for BHV-5 antibodies. On the other hand, 39 (7.7%) of the BHV-5-positive sera were negative for BHV-1 antibodies. These results indicate that, if SN is to be used to evaluate the serological status of herds to these two types of viruses, tests must be performed against both BHV-1 and BHV-5, since they do not induce fully crossreactive neutralizing antibodies.

Key words: Serum neutralization, Bovine Herpesviruses, BHV-1, BHV-5.

INTRODUÇÃO

Os principais herpesvírus bovinos identificados, no Brasil, são o Vírus da Rinotraqueíte Infecçiosa Bovina ou Herpesvírus Bovino tipo 1 (BHV-1) e o Vírus da Encefalite Bovina ou Herpesvírus Bovino tipo 5 (BHV-5), este último previamente considerado um subtipo de BHV-1, denominado BHV-1.3 (ROIZMAN et al. 1992). Ambos são membros da família *Herpesviridae*, subfamília *Alfaherpesvirinae*, sendo responsáveis por várias enfermidades que afetam os sistemas reprodutivo, respiratório e nervoso. Estima-se que 30% da população bovina do Brasil (cerca de 50 milhões de animais) esteja contaminada com o BHV-1, sendo que 50% a 70% das propriedades apresentam animais sorológica-

mente reativos perante o vírus (RAVAZZOLO et al., 1989; PITUCO et al., 1993; LOVATO et al., 1995; VIDOR et al., 1995). Por outro lado, a prevalência de infecções pelo BHV-5, até há pouco tempo considerado um subtipo do BHV-1, ainda é desconhecida. Igualmente, desconhece-se qual a proporção dentre os animais supostamente infectados com BHV-1 que, de fato, foram infectados por BHV-5. Isto tem ocorrido, porque a diferenciação entre BHV-1 e BHV-5 é difícil, tanto virológica como sorologicamente, devido às extensas reações sorológicas cruzadas induzidas por ambos. Como consequência, até o momento não existe nenhum teste sorológico capaz de diferenciar infecções por BHV-1 e BHV-5 com a praticidade necessária para sua aplicação em levantamentos epidemiológicos. Embora uma

1. Méd. Vet., Mestranda do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da UFRGS.

2. Biól.- FEPAGRO/Centro de Pesquisa Veterinária Desidério Finamor, Estrada do Conde 6000, 92990-000 Eldorado do Sul – RS/BRASIL. Bolsista de Aperfeiçoamento CNPq.

3. Estudante de Biologia – Departamento de Microbiologia do Centro de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (DM-ICBS/UFRGS), Porto Alegre – RS/BRASIL. Bolsista de Iniciação Científica.

4. Méd. Vet., M.Sc.- IRFA Química e Biotecnologia Industrial Ltda.

5. Méd. Vet.- FEPAGRO/Centro de Pesquisa Veterinária Desidério Finamor, Estrada do Conde 6000, 92990-000 Eldorado do Sul – RS/BRASIL.

6. Méd. Vet., Ph.D.- FEPAGRO/Centro de Pesquisa Veterinária Desidério Finamor, Caixa Postal 2076, 90001-970 Porto Alegre – RS/BRASIL. E-mail: proche@vortex.ufrgs.br, e DM-ICBS/UFRGS. Autor para correspondência.

Recebido para publicação em 25/11/1997.

variedade de ensaios imunoenzimáticos venham sendo aplicados ao diagnóstico sorológico de BHV-1, na maioria dos laboratórios do País a prova utilizada para este diagnóstico ainda é o teste de soroneutralização (SN), prova esta usualmente realizada frente a uma amostra de BHV-1, e aceita universalmente como prova sorológica padrão para o diagnóstico sorológico de BHV-1 (BITSCH, 1978).

O objetivo do presente estudo foi avaliar o nível de anticorpos neutralizantes induzidos por amostras de BHV-1 e BHV-5 em bovinos naturalmente infectados e avaliar a extensão das reações cruzadas entre ambos utilizando a técnica de SN.

MATERIAL E MÉTODOS

CÉLULAS

Foram utilizadas células da linhagem de rim de bovino "Madin Darby Bovine Kidney" (MDBK) cultivadas em meio mínimo essencial de Eagle (MEM; INLAB) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB; Nutricell). Todos os meios e soros foram previamente testados para assegurar a inexistência de pestívirus e anticorpos contra herpesvírus bovinos. As células foram tripsinizadas a cada 2 dias e cultivadas seguindo métodos usuais (PAUL, 1970).

AMOSTRAS DE VÍRUS E MULTIPLICAÇÃO VIRAL

Foram utilizadas as amostras Los Angeles (LA) de BHV-1, obtida do Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuária (INTA), Castelar, Argentina, e a amostra EVI 88 de BHV-5 citada em estudo prévio (ROEHE et al. 1997). A multiplicação das amostras virais foi realizada em células MDBK, como descrito (ROEHE et al. 1997). As amostras de vírus foram tituladas por métodos usuais (BITSCH, 1978).

SOROS

Quinhentas e oito amostras de soros bovinos foram obtidas do estoque de soros enviados ao CPVDF para diagnóstico.

SORONEUTRALIZAÇÃO

Os testes de soroneutralização (SN) foram realizados essencialmente como descrito por HOUSE e BAKER (1971), em placas de microtécnica, frente a 100 DICC₅₀ de cada uma das amostras virais LA (BHV-1) e EVI 88 (BHV-5), utilizando um período de incubação da mistura soro/vírus de uma hora a 37°C, antes do acréscimo de células MDBK. A leitura das placas foi feita 48, 60 e 72 horas após o início do teste. Todas as amostras de soros bovinos foram testadas em quadruplicata frente aos dois vírus. Os títulos dos soros foram determinados pelo método de Reed e Muench (LORENZ e BÖGEL, 1973).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos testes de SN das 509 amostras de soros bovinos frente aos dois herpesvírus bovinos (BHV-1 e BHV-5) encontram-se nas Tabelas 1 e 2. Na Tabela 1 observa-se que, das amostras de soros examinadas, 290 (57%) apresentaram anticorpos neutralizantes frente à amostra de BHV-1 e 288 (56,6%) frente à amostra de BHV-5. Cento e oitenta (35,4%) foram negativas frente a ambos os vírus. Quarenta e um (8%) soros testados foram positivos somente para BHV-1, ao passo que 39 (7,7%) foram positivos somente para BHV-5. A tabela de distribuição de frequências dos títulos de anticorpos (Tabela 2) revela que a maioria (38/39) dos soros positivos somente para anticorpos anti-BHV-5 apresentaram títulos até 1:8. Por outro lado, 37 dos 41 soros positivos somente para anticorpos anti-BHV-1 apresentavam títulos até 1:8. Estes resultados indicam que os soros que deram margem a reações tipo-específicas (isto é, somente contra um dos dois vírus testados) são soros que possuem títulos baixos de anticorpos. Quando os títulos de anticorpos neutralizantes foram maiores do que 1:8, somente em 5 casos (1 soro positivo para BHV-5 com título 1:16 e 4 soros positivos para BHV-1 com títulos iguais ou maiores do que 1:16) dentre os 80 soros com anticorpos tipo-específicos, não houveram reações cruzadas.

TABELA 1 – Resultado dos testes de soroneutralização (SN) frente ao Herpesvírus da Encefalite Bovina (BHV-5) e ao Vírus da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (BHV-1); (n=509)

	Anticorpos anti-BHV-5		
	Positivo	Negativo	TOTAL
Anticorpos anti-BHV-1	249 * (48,9%)	41 (8%)	290 (57%)
	39 (7,7%)	180 (35,4%)	219 (43%)
TOTAL	288 (56,6%)	221 (43,4%)	509 (100%)

* Número de soros.

TABELA 2 – Distribuição de freqüências dos títulos de anticorpos neutralizantes frente ao Herpesvírus da Encefalite Bovina (BHV-5) e ao Vírus da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (BHV-1) em 509 soros

		ANTICORPOS NEUTRALIZANTES ANTI-BHV-5																
		<2*	2	3	4	6	8	12	16	24	32	48	64	96	128	192	256	512
ANTICORPOS NEUTRALIZANTES ANTI-BHV-1	<2*	180	22	9	4	2	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	8	6	1	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	1	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	15	17	6	4	4	6	2	1	3	1	-	-	-	-	-	-	-
	6	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	8	14	10	7	9	9	8	6	2	3	2	1	-	-	-	-	-	-
	12	-	-	-	-	-	2	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-
	16	2	5	2	6	9	5	7	9	3	2	-	-	-	-	-	1	-
	24	-	-	-	-	1	-	1	1	2	-	-	1	-	-	-	-	-
	32	1	3	1	1	2	3	5	4	2	3	1	2	-	-	-	-	-
	48	-	-	-	-	-	-	1	2	2	1	1	1	-	-	1	-	-
	64	1	1	-	3	-	-	4	4	4	2	2	1	1	-	-	-	-
	96	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	128	-	1	-	-	-	1	-	1	3	3	-	-	-	-	-	-	-
	192	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	256	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1
512	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	

(*) Títulos expressos como a recíproca da diluição capaz de neutralizar 100 doses infectantes para cultivos celulares (CCID₅₀) de cada uma das amostras de BHV-1 or BHV-5.

Área com fundo preto salienta soros negativos para anticorpos neutralizantes, para ambos vírus. Áreas com hachurado mais intenso salientam soros com anticorpos tipo-específicos somente.

Como, até recentemente, o BHV-5 era considerado um subtipo do BHV-1 (ROIZMAN et al., 1992), não existia a preocupação e, nem a necessidade de diferenciar estes dois tipos de vírus. Além disso, os níveis de reações sorológicas cruzadas entre ambos são amplos (BRATANICH et al., 1991).

Não obstante, existem diferenças importantes entre os dois tipos de vírus, detectáveis não só, através das características clínico-epidemiológicas das enfermidades por eles provocadas, como também nas respostas sorológicas induzidas. Foi aqui demonstrado que a SN, o teste mais frequentemente utilizado para diagnóstico sorológico de infecções por herpesvírus bovinos em nosso meio, e ainda considerada como prova sorológica padrão, detecta a maioria das reações sorológicas cruzadas. Porém, 7,7% dos soros contendo anticorpos tipo-específicos anti-BHV-5 não foram detectados pela SN frente ao BHV-1. Por outro lado, a SN frente ao BHV-5 não foi capaz de detectar 8% dos soros contendo anticorpos tipo-específicos anti-BHV-1. Estes níveis de "falsos-negativos" refletem uma população de animais que não seria identificada em levantamentos soropidemiológicos, caso as provas de SN houvessem sido

realizadas com apenas um dos tipos de vírus. Estes percentuais seriam mais do que suficientes para manter a infecção nos rebanhos, a despeito de qualquer outra medida que viesse a ser tomada buscando sua eliminação. Portanto, em situações onde o objetivo for o controle ou erradicação de herpesvírus bovinos, a SN realizada frente, somente a um desses dois tipos de vírus não deve ser tomada como parâmetro único, uma vez que o rebanho pode apresentar animais contaminados com o outro agente, os quais poderiam não ser detectados. Assim, o controle do BHV-1 poderia levar à manutenção do BHV-5 em determinada população, e vice-versa, com conseqüências imprevisíveis.

A maioria dos soros "falsos-negativos" frente a um dos tipos de vírus apresentou títulos de anticorpos tipo-específicos relativamente baixos, raramente ultrapassando 1:8. É provável, pois, que ensaios imunoenzimáticos que apresentem maior sensibilidade possam dar origem a um menor número de falsos-negativos. No entanto, que seja do conhecimento dos autores, até o presente, nenhum estudo foi feito com ensaios imunoenzimáticos levando em consideração a possibilidade de reações cruzadas entre estes dois agentes. O ideal, para determinar

a verdadeira prevalência de infecções por BHV-1 e BHV-5, deveria ser utilizar testes capazes de diferenciar as respostas sorológicas induzidas por estes dois vírus. Caso estes não se encontrem disponíveis, os testes a serem utilizados devem ser capazes de detectar todos os animais soropositivos, tanto para BHV-1 como BHV-5. Nos casos em que for utilizada a SN como prova sorológica, a mesma deve ser realizada frente a amostras de BHV-1 e BHV-5, a fim de diminuir a chance de ocorrência de falsos-negativos.

A prevalência de infecções pelo BHV-5 é desconhecida, em todo o mundo. A maioria dos relatos de infecções por este vírus referem-se a casos na Argentina (CARRILLO et al., 1983) e Austrália (FRENCH, 1962; STUDDERT, 1990). Nos Estados Unidos da América, poucas amostras do BHV-5 foram isoladas (BELKNAP et al. 1994). No entanto, estudos retrospectivos buscando reavaliar casos antigos têm revelado que, em muitas ocasiões, o vírus isolado no passado tratava-se de BHV-5, e não BHV-1 (d'OFFAY et al., 1993; ELY et al., 1996). No Brasil, casos clínicos de encefalite em bovinos dos quais são isoladas amostras de BHV-5 vem aumentando consideravelmente. A infecção tem sido detectada nos estados do Rio Grande do Sul (RIET-CORREA et al., 1989; WEIBLEN et al., 1989), Mato Grosso do Sul (ROEHE et al. 1997), Paraná (ALFIERI, 1997) e, mais recentemente, no Rio de Janeiro (PITUCO, 1997). A ocorrência nos demais estados do País não é do conhecimento dos autores. Além disso, a encefalite pelo BHV-5 se apresenta com uma morbidade baixa, porém com mortalidade elevada, podendo frequentemente ser confundida com outras causas de encefalite, particularmente a raiva. Em consonância com a patogenia das infecções pelo BHV-1, a maioria das infecções com o BHV-5 provavelmente ocorre de forma subclínica ou assintomática. Portanto, apesar da ausência de informações sobre a ocorrência da infecção em outros estados, o conjunto de fatores citados sugere que o BHV-5 seja enzootico em nosso País. Estas observações reforçam a necessidade de que os testes de SN, quando utilizados em apoio a planos de controle ou erradicação, sejam realizados frente a ambos os tipos de vírus.

CONCLUSÕES

Quando testes de soroneutralização forem utilizados com a finalidade de avaliar o status sorológico de infecções por BHV-1 e BHV-5, os mesmos devem ser realizados frente aos dois tipos de vírus, uma vez que eles não induzem reatividade cruzada em todos os animais.

BIBLIOGRAFIA CITADA

- ALFIERI, A., 1997 (Comunicação Pessoal)
- BELKNAP, E. B.; COLLINS, J.K.; AYERS, V.K.; SCHULTHEISS, P.C. Experimental infection of neonatal calves with neurovirulent bovine herpesvirus type 1.3. *Veterinary Pathology*, London, n.31, p. 358-365, 1994.
- BITSCH, V. The p³⁷ modification of the infectious bovine rhinotracheitis virus-serum neutralization test. *Acta Veterinaria Scandinavica*, Copenhagen, n. 19, p. 497-505, 1978.
- BRATANICH, A.C.; SARDI, S.I.; SMITSAART, E.N.; SCHUDEL, A.A. Comparative studies of BHV-1 variants by in vivo-in vitro tests. *Journal of Veterinary Medicine B*, Berlin, n. 38, p. 41-48, 1991.
- CARRILLO, B.J.; AMBROGI, A.; SCHUDEL, A.A.; VAZQUEZ, M.; DAHME, E.; POSPICHIL, A. Meningoencephalitis caused by IBR virus in calves in Argentina. *Zentralblatt für Veterinärmedizin B*, Jena, n. 30, p. 327-332, 1983.
- D'OFFAY, J.M.; MOCK, R.E.; FULTON, R.W. Isolation and characterization of encephalitic bovine herpesvirus type 1 isolates from cattle to North America. *American Journal of Veterinary Research*, Chicago, n. 54, p. 534-539, 1993.
- ELY, R. W.; d'OFFAY, J. M.; RUEFER, A. H.; CASH, C.Y. Bovine herpesviral encephalitis: a retrospective study on archived formalin-fixed, paraffin-embedded brain tissue. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, Iowa, n. 8, p. 487-492, 1996.
- FRENCH, E.L. Relationship between infectious bovine rhinotracheitis and a virus isolated from calves with encephalitis. *Australian Veterinary Journal*, Brunswick, n. 38, p. 555-556, 1962.
- HOUSE, J.A.; BAKER, J.A. Bovine herpesvirus IBR-IPV. The antibody virus neutralization reaction. *Cornell Veterinarian*, New York, n. 61, p. 320-335, 1971.
- LORENZ, R.J.; BÖGEL, K. Methods of calculation. In: KAPLAN M.M. and KOPROWSKY H. (Eds.) *Laboratory Techniques in Rabies*. Geneva: World Health Organization, 1973, p. 329-332.
- LOVATO, L.T.; WEIBLEN, R.; TOBIAS, F.L.; MORAES, M.P. Herpesvírus bovino tipo1 (HVB 1): inquérito soropidemiológico no rebanho leiteiro do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 2, n. 3, p. 425-430, 1995.
- PAUL, J. *Cell and tissue cultures*. 4. ed. London: E. e S. Livingstone, 1970.
- PITUCO, E.M.; DE STEFANO, E.; PASSOS, E.C. Diagnóstico sorológico da rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) no período de 1988 a 1992. *Reunião Anual do Instituto Biológico*, São Paulo, p.16, 1993.
- PITUCO, E.M., 1997 (comunicação pessoal)
- RAVAZZOLO, A.P.; PIZZOL, M.P.; MOOJEN, V. Evidências da presença de Anticorpos para o vírus da rinotraqueíte infecciosa dos bovinos em bovinos de alguns municípios do estado do Rio Grande do Sul, Brasil 1986. *Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS*, Porto Alegre, n.17, p. 89-95, 1989.

- RIET-CORREA, F.; VIDOR, T.; SCHILD, A.L.; MÉNDEZ, M.C. Meningoencefalite e necrose da córtex cerebral em bovinos causados por herpesvírus bovino - 1. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Rio de Janeiro, v. 9, n.1-2, p.13-16, 1989.
- ROEHE, P.M.; SILVA, T.C.; NARDI, N.B., OLIVEIRA, L.G.; ROSA, J.C.A. Diferenciação entre os vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (BHV-1) e vírus da encefalite bovina (BHV-5) com anticorpos monoclonais. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Rio de Janeiro, v.17, n.1, p. 41-44, 1997.
- ROIZMAN, B.; DESROSIERS, R.C.; FLECKENSTEIN, B.; LOPEZ, C.; MINSON, A.C.; STUDDERT, A.A. The family *Hesperiidae*: An update. *Archives of Virology*, Viena, n.123, p. 425-449, 1992.
- STUDDERT, M.J. Bovine encephalitis virus. *Veterinary Record*, London, n.125, p.584, 1990.
- VIDOR, T.; HALFEN, D.C.; LEITE, T.E.; COSWIG, L.T. Herpesvírus bovino tipo 1(BHV-1): sorologia de rebanhos com problemas reprodutivos. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 2, n.3, p. 421-424, 1995.
- WEIBLEN, R.; LOMBARDO DE BARROS, C.S.; CANABARRO, T.F.; FLORES, I.E. Bovine meningoencephalitis from IBR vírus. *Veterinary Record*, London, n.124, p. 666-667, 1989.