

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**Otimização da soroneutralização com diferentes tipos e subtipos de
herpesvírus bovino e sua aplicação à epidemiologia**

Carine Lidiane Holz

Porto Alegre

2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**Otimização da soroneutralização com diferentes tipos e subtipos de
herpesvírus bovino e sua aplicação à epidemiologia**

Autor: Carine Lidiane Holz

Dissertação apresentada como requisito
para obtenção do grau de Mestre em
Ciências Veterinárias, na área de
Microbiologia Veterinária – Virologia

Orientador: Prof. Dr. Paulo Michel
Roehle

Porto Alegre

2008

H762o Holz, Carine Lidiane

Otimização da soroneutralização com diferentes tipos e subtipos de herpesvírus bovino e sua aplicação à epidemiologia. / Carine Lidiane Holz. – Porto Alegre: UFRGS, 2008.

91 f.; il. – Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, RS-BR, 2008. Paulo Michel Roehle, Orient.

1. Herpesvírus bovino 1 2. Herpesvírus bovino tipo 5 3. Herpesvírus bovino: epidemiologia: fatores de risco I. Roehle, Paulo Michel, Orient.
II. Título.

CDD 619.4

Catálogo na fonte: Biblioteca da Faculdade de Veterinária da UFRGS

Carine Lidiane Holz

OTIMIZAÇÃO DA SORONEUTRALIZAÇÃO COM DIFERENTES TIPOS E
SUBTIPOS DE HERPESVÍRUS BOVINO E SUA APLICAÇÃO À
EPIDEMIOLOGIA

Aprovada em 30 julho 2008

APROVADO POR:

Prof. Dr Paulo Michel Roehle
Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Fernando Rosado Spilki
Membro da Comissão

Prof. Dr. Amauri Braga Simonetti
Membro da Comissão

Prof. Dr. Cláudio Wageck Canal
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente ao meu marido Filipe, amor da minha vida, pelo companheirismo, amor, paciência nos meus muitos momentos de estresse e pela grande ajuda. Minha imensa gratidão pela força e apoio emocional durante todo este período.

Agradeço também a minha família por estar sempre ao meu lado, mesmo estando um pouco longe. Agradeço pela vida, pelo amor e por me ensinarem a lutar pelos meus objetivos.

Minha sincera gratidão ao meu orientador Paulo Michel Roehe, pela confiança depositada em mim, pela amizade e pelos constantes estímulos e ensinamentos que foram fundamentais para minha formação.

A todos os colegas de laboratório, que foram muitos durante todos estes anos e que se tornaram grandes amigos e companheiros. Gostaria de agradecer especialmente ao Diogenes, a Thais, a Juliana, a Ana Paula e ao Samuel, que além de serem pessoas maravilhosas foram ótimos companheiros de IPVDF. Meu muito obrigada a vocês por estarem sempre ao meu lado me ajudando, me ensinando e me incentivando. Agradeço também aos colegas de laboratório do ICBS/UFRGS, que foram fundamentais na realização deste trabalho: Fabrício, Helena, Luciana, Martha, Eduardo e todos os demais o meu muito obrigado pela “mãozinha nas SNs”.

Agradeço também aos professores da banca, Fernando Spilki, Cláudio Canal e Amauri Simonetti pela compreensão e por aceitarem minhas “condições”, já que o tempo foi tão curto para elaboração da dissertação.

A todos os familiares e amigos que estão perto ou muito longe, pelo estímulo.

**“Chegará o dia em que os
homens conhecerão a alma dos animais
e, nesse dia, um crime contra um
animal, será considerado um crime
contra a humanidade”**

Leonardo Da Vinci

OTIMIZAÇÃO DA SORONEUTRALIZAÇÃO COM DIFERENTES TIPOS E SUBTIPOS DE HERPESVÍRUS BOVINO E SUA APLICAÇÃO À EPIDEMIOLOGIA

RESUMO

No presente estudo, buscou-se avaliar quais seriam as cepas de herpesvírus bovinos tipos 1 (BoHV-1) e 5 (BoHV-5) seriam mais adequadas para uso como vírus de confrontação em testes de soroneutralização (SN). Oitocentas e dez amostras de soros de duas regiões geograficamente distintas foram avaliadas à SN frente a seis diferentes cepas virais, incluindo tipos e subtipos diversos (BoHV-1.1: EVI123/98 e Los Angeles; BoHV-1.2a: SV265/96; BoHV-5a: EVI88/95; BoHV-5b: A663 e BoHV-5c: ISO95/97). A maior sensibilidade foi revelada pelo somatório de soropositivos identificados com as seis cepas utilizadas no estudo. Uma combinação de quatro vírus (BoHV-1.1: LA e EVI123/98, BoHV-5a: EVI88/95 e BoHV-5b: A663) foi capaz de detectar 99,1% das amostras soropositivas. Estes quatro vírus foram selecionados para serem utilizados em um levantamento soroepidemiológico com o intuito de estimar a prevalência das infecções causadas pelos BoHV-1 e BoHV-5 no Estado do Rio Grande do Sul. Para tanto, soros de 2200 fêmeas bovinas adultas (>24 meses), representativos da população bovina do Rio Grande do Sul, foram submetidos à SN frente às quatro cepas virais escolhidas. Com esta combinação, a soroprevalência média das infecções por BoHV-1 e BoHV-5 encontrada foi de 29,2%. Além disso, analisando outros fatores que pudessem influenciar a prevalência das infecções, foram considerados fatores de risco o tipo de exploração corte, a ausência da prática de ordenha, o contato dos bovinos com ovinos/caprinos e animais silvestres, a venda de animais de reprodução, o uso de piquetes de parto/pós-parto, o uso de assistência veterinária privada e a criação de animais de raças européias de corte. Os resultados obtidos no presente trabalho demonstraram que, para que a SN seja capaz de detectar animais soropositivos ao BoHV-1 e BoHV-5 com a máxima sensibilidade, o teste deve ser realizado com várias amostras de BoHV-1 e BoHV-5, não necessariamente de tipos ou subtipos diferentes, pois amostras do mesmo tipo de vírus apresentaram diferentes sensibilidades. Além disso, as amostras de confrontação podem variar de acordo com a região geográfica de origem dos soros. Os resultados obtidos nesse levantamento revelam que anticorpos anti-BoHV-1 e anti-BoHV-5 encontram-se amplamente distribuídos nos rebanhos gaúchos. No entanto, não foi possível determinar a prevalência tipo-específica destas infecções com os testes realizados. Assim, a proporção de animais que estão infectados com o BoHV-1 ou com o BoHV-5 (ou ambos) na região examinada permanece desconhecida.

Palavras-chave: Herpesvírus bovino tipo 1, Herpesvírus bovino tipo 5, Soroneutralização, Epidemiologia, Fatores de Risco

**SERUM NEUTRALIZATION OPTIMIZATION WITH DIFFERENT
BOVINE HERPESVIRUSES TYPES AND SUBTYPES AND ITS EPIDEMIOLOGY
APPLICATION**

ABSTRACT

In this study a search was carried out to determine which of a number of available strains/isolates of bovine herpesviruses types 1 (BoHV-1) and 5 (BoHV-5) would be more suitable for use as challenge virus in serum neutralization (SN) tests. Eight hundred and ten bovine serum samples collected from two geographically distinct regions were evaluated in SN tests against six BoHVs of different types and subtypes (BoHV-1.1: EVI123/98 and Los Angeles; BoHV-1.2a: SV265/96; BoHV-5a: EVI88/95; BoHV-5b: A663 and BoHV-5c: ISO95/97). The highest sensitivity was achieved when the SN-positive sera obtained with the six different viruses were added. A combination of four viruses (BoHV-1.1 LA, and EVI123/98, BoHV-5a EVI88/95 and BoHV-5b A663), was able to detect 99.1% of the seropositive samples. These four viruses were selected to carry out a seroepidemiological survey to estimate BoHV-1 and BoHV-5 prevalence in the state of Rio Grande do Sul. In order to achieve that, sera from 2,200 bovine female cows (>24 months-old), representative of the bovine population of Rio Grande do Sul state were tested on SN tests against the four selected viruses. With such combination, seroprevalence of BoHV-1 and BoHV-5 infections was 29.2%. After examining potential factors that might affect the prevalence of such infections, the following were considered as significant risk factors: the type of exploitation (beef cattle > dairy), use of milking procedures, concomitant presence of sheep, goats or wild animals in farm; sale of animals for reproductive purposes; use of pre and post-parturition paddocks; use of private veterinary assistance and farming of European beef breeds. The results obtained here indicate that for the SN test to provide the highest sensitivity in detecting BoHV-1 and BoHV-5 seropositive animals, it must be performed against a number of BoHV-1 and BoHV-5 strains, though not necessarily of different types and subtypes as viruses within a same subtype may display different sensitivities. Besides, challenge viruses may vary for geographically distinct areas. The serological survey performed with four distinct bovine herpesviruses reveal that antibodies to BoHV-1 and BoHV-5 are widely distributed among cattle flocks in Rio Grande do Sul. However, it was not possible to determine type-specific prevalence with the tests performed. Thus, the proportion of cattle actually infected with either BoHV-1 or BoHV-5 (or both) in the examined region remains undetermined.

Key-words: Bovine herpesvirus type 1, Bovine herpesvirus type 5, Serum neutralization, Epidemiology, Risk factors.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	9
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
1.1. Herpesvírus	11
1.1.1. Nomenclatura e Classificação	11
1.1.2. Estrutura	11
1.1.3. Tipos de Herpesvírus Bovinos.....	13
1.1.3.1. Herpesvírus Bovino Tipo 1 (BoHV-1).....	13
1.1.3.2. Herpesvírus Bovino Tipo 5 (BoHV-5).....	14
1.1.4. Ciclos Replicativos.....	16
1.1.4.1. Infecção Aguda ou Produtiva	17
1.1.4.2. Infecção Latente	19
1.1.5. Patogenia	21
1.1.5.1. Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR).....	22
1.1.5.2. Vulvovaginite Pustular Infecciosa (IPV)/Balanopostite Pustular Infecciosa (IPB)	23
1.1.5.3. Encefalite.....	24
1.1.6. Diagnóstico.....	25
1.1.6.1. Soroneutralização (SN)	27
1.1.7. Medidas de Controle e Erradicação.....	28
OBJETIVOS	31
1.2. Objetivos gerais	31
1.3. Objetivos específicos.....	31
CAPÍTULO 1	32
Soroneutralização (SN) frente a diferentes tipos e subtipos de herpesvírus bovinos tipos 1 (BoHV-1) e 5 (BoHV-5)	32
CAPÍTULO 2	49

Prevalência e fatores de risco associados à infecção por herpesvírus bovinos tipo 1 e 5 no Estado do Rio Grande do Sul – Brasil	49
DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

INTRODUÇÃO

Os herpesvírus bovinos tipo 1 (BoHV-1) e tipo 5 (BoHV-5) são membros da família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*, gênero *Varicellovirus*. O BoHV-1 é o agente causador da Rinotraqueíte infecciosa bovina/Vulvovaginite pustular infecciosa (IBR/IPV), além de estar associado a diversas síndromes em rebanhos bovinos. Já o BoHV-5 é o agente responsável pela Encefalite herpética bovina.

Os BoHV-1 podem ser divididos em três diferentes genótipos: BoHV-1.1, BoHV-1.2a e BoHV-1.2b com base em características genômicas e antigênicas. Já o BoHV-5 foi subdividido em BoHV-5a, BoHV-5b e BoHV-5 “não a-não b”, ou “c”, de acordo com estudos baseados no perfil eletroforético de clivagens utilizando enzimas de restrição e em análises com anticorpos monoclonais.

O diagnóstico presuntivo da infecção por herpesvírus bovino é feito com base no histórico da propriedade, sinais clínicos e lesões observadas ao exame clínico. No entanto, a suspeita clínico-patológica não deve ser baseada apenas nessas características, pois elas são sugestivas, mas não patognômicas, devendo então, ser a mesma confirmada por exames laboratoriais.

O teste de soroneutralização (SN) é uma técnica amplamente utilizada como padrão para a detecção de anticorpos para os BoHV-1 e 5. No entanto, ela não é capaz de diferenciar os anticorpos produzidos contra o BoHV-1 daqueles contra o BoHV-5, devido às amplas reações sorológicas cruzadas encontradas entre estes dois vírus. Desta forma, infecções pelo BoHV-5 podem se confundir sorologicamente com aquelas causadas pelo BoHV-1, impedindo ou dificultando o controle de ambas. Além disso, embora haja ampla reação sorológica cruzada entre estes dois agentes, a SN frente a apenas um dos vírus pode levar a resultados “falsos-negativos”, cujos níveis percentuais são suficientes para manter a infecção nos rebanhos.

A SN tem sido amplamente utilizada em inquéritos epidemiológicos, certificação de rebanhos, triagem de reprodutores destinados à coleta e comercialização de sêmen, além de dar suporte à investigação clínica. Uma abordagem possível de controle e erradicação de BoHV-1 dos rebanhos é baseada em testes sorológicos periódicos e descarte de animais positivos.

No Brasil, trabalhos envolvendo isolamento viral e estudos soroepidemiológicos revelam que boa parte dos rebanhos bovinos do país estão infectados por BoHV-1, ou por BoHV-5, ou talvez, ambos. Na verdade, esses estudos sempre buscaram anticorpos

contra BoHV-1 e não BoHV-5. Os levantamentos epidemiológicos referentes ao Brasil indicam que a infecção encontra-se presente em todo o território, mas com diferentes taxas de soropositividade dependendo da região analisada. Os relatos referentes ao Estado do Rio Grande do Sul, indicam grandes disparidades no valor da prevalência encontrada de um estudo para o outro, mesmo aqueles que utilizaram a mesma cepa viral.

Para tanto, um teste capaz de reconhecer eficientemente os animais portadores da infecção é essencial para os programas de erradicação e controle da enfermidade. Os testes que têm sido utilizados para sorologia de BoHV-1 são vários. Entretanto, o teste padrão que baliza todos os demais permanece sendo a soroneutralização (SN). Por outro lado, a SN é feita usualmente utilizando uma cepa “clássica” de BoHV-1.1, como recomendado inclusive pela Organização Internacional de Epizootia (OIE). Entretanto, a técnica de SN para diagnóstico de infecções pelo vírus IBR/IPV baseia-se em trabalhos realizados antes do acúmulo de novos conhecimentos sobre tipos e subtipos de BoHV-1.

Em virtude da necessidade de realizar um levantamento soropidemiológico para buscar determinar a real prevalência de infecções por BoHV-1 e BoHV-5 em bovinos no Rio Grande do Sul, surgiu à tona a necessidade de definir qual a cepa de vírus – ou quais as cepas- que seria(m) capaz(es) de detectar com maior sensibilidade a presença de anticorpos no soro de animais infectados. Nesse mesmo contexto, buscou analisar-se se esta(s) cepa(s) seria(m) a(s) mesma(s) para regiões geograficamente distintas do nosso País.

Buscando resolver essa questão, o presente estudo foi realizado com vistas a avaliar a sensibilidade da SN quando realizada frente a diferentes cepas de tipos e subtipos distintos de BoHV-1 e BoHV-5. Complementando essa avaliação prévia, foi realizado um levantamento soropidemiológico buscando determinar a atual soroprevalência de infecções por BoHV-1 e BoHV-5 em vacas no Estado do Rio Grande do Sul, além de avaliar alguns possíveis fatores de risco relacionados a infecção por BoHV-1 e BoHV-5.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Herpesvírus

1.1.1. Nomenclatura e Classificação

Os herpesvírus são membros da família *Herpesviridae*, a qual possui em torno de 200 espécies de vírus isolados de diferentes hospedeiros (THIRY et al., 2007). Na natureza, os herpesvírus costumam estar intimamente associados a uma espécie hospedeira. A maioria dos animais investigados até o momento suportam infecções por pelo menos um herpesvírus (DAVISON, 2002).

Com base em suas características biológicas e moleculares, a família *Herpesviridae* encontra-se dividida em três subfamílias: *Alpha*, *Beta* e *Gammaherpesvirinae* (ROIZMANN & PELLETT, 2007; THIRY et al., 2007). No entanto, existem vários herpesvírus que ainda não foram definitivamente classificados (ROIZMANN & PELLETT, 2007). Os membros da subfamília *Alphaherpesvirinae* têm como características um amplo espectro de hospedeiros, um ciclo de replicação curto, a rápida disseminação em cultivo com destruição eficiente das células *in vitro* e o estabelecimento de latência *in vivo*, a qual ocorre principal - mas não exclusivamente - em neurônios de gânglios sensoriais (VOGEL et al., 2003; ZAJAC et al., 2006; MUYLKENS et al., 2007; ROIZMANN & PELLETT, 2007). Dentro desta subfamília, encontram-se os gêneros *Simplexvirus*, *Varicellovirus*, *Mardivirus* e *Iltovirus* (FRANCO & ROEHE, 2007; ROIZMANN & PELLETT, 2007).

1.1.2. Estrutura

Os membros da família *Herpesviridae* caracterizam-se por apresentarem como material genético uma fita dupla linear de DNA, envolta por um capsídeo icosaédrico de aproximadamente 100 a 110 nm de diâmetro, contendo 162 capsômeros (THIRY et al., 2006; ROIZMANN & PELLETT, 2007). Entre o capsídeo e o envelope viral está o tegumento, composto por um material amorfo e assimétrico. Na superfície, encontra-se

o envelope que contém as glicoproteínas, alvos preferenciais para a resposta imune do hospedeiro (MUYLKENS et al. 2007; ROIZMANN & PELLETT, 2007). Todo este conjunto forma um vírion pleomórfico de 150-200 nm de diâmetro (TIKOO et al., 1995) (Figura 1).

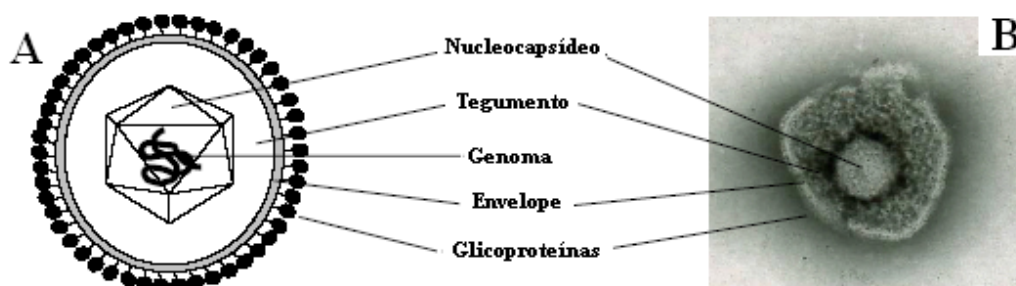


Figura 1 Morfologia esquemática dos herpesvírus. A) Ilustração simplificada de uma partícula vírica com seus principais componentes. B) Fotografia de microscopia eletrônica (THIRY et al., 2006).

Os genomas dos BoHV-1 e BoHV-5 consistem em uma fita dupla linear de DNA de 136 mil pares de bases (136 Kpb) (MUYLKENS et al., 2007) que pode ser dividida em um segmento longo único (UL: *unique long*) de aproximadamente 102 a 104 Kpb e um segmento curto único (US: *unique short*) de aproximadamente 10,5 a 11 Kbp. Estas duas regiões encontram-se flanqueadas por dois segmentos repetidos invertidos de aproximadamente 24 Kpb, denominados de região de repetição interna (IR) e de repetição terminal (TR) (Figura 2) (ROIZMANN et al., 2007). Essas características fazem com que esses agentes estejam classificados na classe D dos genomas de herpesvírus. Nessa classe genômica, o segmento UL encontra-se predominantemente fixo em uma orientação (THIRY et al., 2006). Esse arranjo permite ainda que a região US apresente duas possíveis orientações, possibilitando a geração de duas formas isoméricas equimolares do genoma (TIKOO et al., 1995; ROIZMANN & PELLETT, 2001; THIRY et al., 2006).

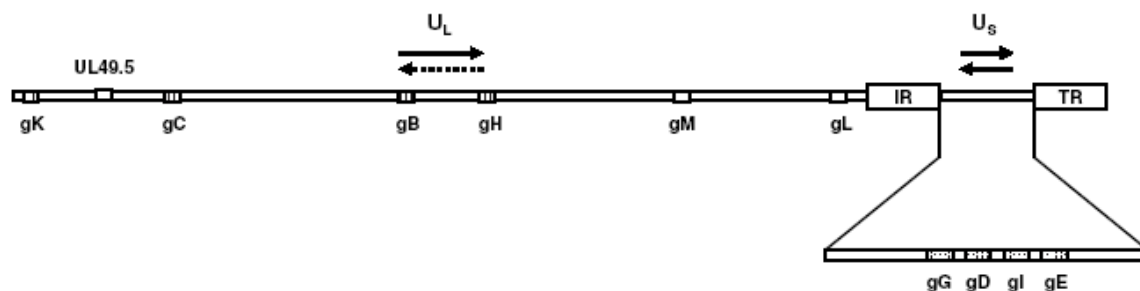


Figura 2 Organização genômica de um alfaherpesvírus de ruminante. O genoma se constitui de uma fita dupla linear de DNA. Ele é dividido em um segmento longo único (UL) e um segmento único curto (US) flanqueado por duas seqüências repetidas invertidas, denominados repetição interna (IR) e terminal (TR). O genoma inclui dez genes que codificam para diferentes glicoproteínas: seis estão localizados no segmento UL e quatro no segmento US. O segmento US pode apresentar duas possíveis orientações (demonstrado pelas flechas), no entanto o segmento UL apresenta-se predominantemente em uma única orientação. Calcula-se que apenas 5% dos genomas apresentam-se com o segmento UL na orientação invertida (THIRY et al., 2006).

1.1.3. Tipos de Herpesvírus Bovinos

1.1.3.1. Herpesvírus Bovino Tipo 1 (BoHV-1)

O BoHV-1 é um importante patógeno dos rebanhos bovinos e está disseminado pelo mundo todo (ROS & BELÁK, 1999; ACKERMANN & ENGELS, 2006), com excessão de alguns países europeus de onde a infecção foi erradicada através da identificação e eliminação de animais soropositivos (VAN OIRSCHOT et al., 1996; SILVA et al., 2007). O BoHV-1 tem sido associado com diversas manifestações clínicas em bovinos, que incluem a Rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), Vulvovaginite pustular/Balanopostite pustular infecciosa (IPV/IPB), abortos e infecções generalizadas em neonatos (GIBBS & RWEYEMAMU, 1977; WYLER et al., 1989). Tem-se também demonstrado que o BoHV-1 pode ser encontrado no sistema nervoso central (SNC) de bovinos, podendo ou não estar relacionado a casos de doença neurológica (SILVA et al., 2007).

Com base em características genômicas e antigênicas, os BoHV-1 podem ser divididos em três diferentes genótipos: BoHV-1.1, BoHV-1.2a e BoVH-1.2b

(METZLER et al., 1985; D'ARCE et al., 2002; FRANCO & ROEHE, 2007). O BoHV-1.1 e o BoHV-1.2a são os mais patogênicos e estão normalmente associados, respectivamente, a casos de doença respiratória clássica e abortos (MILLER et al., 1991). O BoHV-1.2b possui patogenicidade moderada (METZLER et al., 1985) e causa vulvovaginite ou balanopostite, não estando normalmente relacionado a casos de aborto (MILLER, 1991; SMITH et al., 1995). Dados epidemiológicos sugerem que o BoHV-1.1 e o BoHV-1.2 diferem na indução da doença clínica, no entanto, a base para estas diferentes relações parasito-hospedeiro necessita ser ainda esclarecida (RIJSEWIJK et al., 1999; SPILKI et al., 2004). Ambos subtipos são hábeis a infectar os tratos genital e respiratório, mas tem sido sugerido que cada um dos subtipos está melhor adaptado ou ao trato respiratório (BoHV-1.1) ou ao genital (BoHV-1.2) (EDWARDS et al., 1991; RIJSEWIJK et al., 1999; SPILKI et al., 2004).

Os isolados dos diferentes subtipos apresentam extensa reatividade sorológica cruzada, que pode ser evidenciada por testes de soroneutralização (SN). Nesses testes, o anti-soro produzido contra o vírus de um subtipo reage em títulos semelhantes ou iguais tanto contra o vírus homólogo, como contra o vírus heterólogo (TEIXEIRA et al., 1998). No entanto, o uso de um ELISA de bloqueio monoclonal pode permitir a diferenciação entre subtipos (SPILKI et al., 2005).

No Brasil, o BoHV-1 foi isolado pela primeira vez, de um caso de vulvovaginite na Bahia, em 1977 (ALICE, 1977). Vários relatos posteriores demonstraram que grande parte das propriedades brasileiras apresentam animais sorologicamente positivos para o BoHV-1. Enquetes sorológicas demonstram que a média da prevalência de infecções por BoHV-1 nos rebanhos gaúchos situa-se ao redor de 30%, com grande parte das propriedades apresentando animais sorologicamente positivos (RAVAZZOLO et al., 1989; LOVATO et al., 1995; VIDOR et al., 1995).

1.1.3.2. Herpesvírus Bovino Tipo 5 (BoHV-5)

O BoHV-5 é o agente etiológico da Encefalite herpética bovina (MURPHY et al., 1999). No entanto, o BoHV-5 também pode infectar o trato genital de bovinos (ESTEVEZ et al., 2003; GOMES et al., 2003) e sinais de doença respiratória também podem estar presentes (SCHUDEL et al., 1986; HÜBNER et al., 2005). Amostras de BoHV-5 eram consideradas “variantes encefalitogênicas” de BoHV-1, sendo chamadas

de BoHV-1.3 (BRATANICH et al., 1991). Estudos comparativos subsequentes, baseados no perfil eletroforético pós-clivagem com enzimas de restrição e na reatividade frente a anticorpos monoclonais, indicaram que os vírus diferiam em suas propriedades antigênicas e genômicas (D'OFFAY et al., 1993; WHETSTONE et al., 1993). Em 1992, o BoHV-5 foi reconhecido como um vírus de tipo distinto ao BoHV-1 pelo Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus (ROIZMANN et al., 1992). Posteriormente, com estudos baseados no perfil eletroforético de clivagens utilizando enzimas de restrição e na reação frente a anticorpos monoclonais foi possível demonstrar que o BoHV-5 podia ser subdividido em BoHV-5a, BoHV-5b e BoHV-5 “não a-não b”, ou “c” (METZLER et al., 1985; ROIZMANN et al., 1992; D'ARCE et al., 2002).

A doença causada pelo BoHV-5 é caracterizada como uma meningoencefalite não purulenta que afeta normalmente bovinos jovens (animais até oito meses de idade) (SCHUDEL et al., 1986; RISSI et al., 2007), mas pode também acometer, ocasionalmente, animais mais velhos, provocando uma doença de baixa morbidade e alta mortalidade (D'ARCE et al., 2002). A Encefalite herpética bovina é, juntamente com a Raiva bovina, uma das principais causas de encefalites virais de bovinos no Brasil (SALVADOR et al., 1998) e ela já foi descrita como a segunda causa mais freqüente de meningoencefalite viral em bovinos no Sul do Brasil (SANCHES et al., 2000).

Meningoencefalites fatais associadas ao BoHV-5 têm sido relatadas em diversos países, como Austrália, Hungria, Estados Unidos, Argentina e Itália (ROS & BELÁK, 1999). No entanto, a doença ainda possui uma distribuição geográfica restrita, sendo aparentemente rara no hemisfério norte (D'OFFAY et al., 1993; D'ARCE et al., 2002). No entanto, a infecção é bastante comum no hemisfério sul, particularmente no Brasil e na Argentina, onde estes vírus têm sido mais estudados (FRENCH, 1962; SALVADOR et al., 1998; D'ARCE et al., 2002). A ampla distribuição da infecção pelo BoHV-1, além do uso de vacinação em larga escala, tem sido utilizada para explicar a baixa ocorrência da infecção pelo BoHV-5 na Europa e na América do Norte. Reforçando essa hipótese, a infecção pelo BoHV-5 tem sido descrita principalmente em países onde a prevalência do BoHV-1 é relativamente baixa e que não utilizam vacinação em grande escala (VOGEL et al., 2002). No entanto, no trabalho de Silva et al. (2006) foi demonstrado que animais vacinados com uma vacina de BoHV-1 não foram suficientemente protegidos ao desafio frente ao BoHV-5.

Relatos clínicos-patológicos, com ou sem confirmação virológica, têm demonstrado que a disseminação do BoHV-5 nos rebanhos brasileiros é ampla e crescente. No Rio Grande do Sul, o BoHV-5 tem sido freqüentemente associado com surtos de meningoencefalite (RIET-CORREA et al., 1989; WEIBLEN et al., 1989; VASCONCELOS et al., 1993; SCHILD et al., 1994). Com base em evidências clínicas (posteriormente confirmadas através do isolamento do agente), a prevalência da infecção nos estados do Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e São Paulo parece elevada. Suspeita-se que a incidência de BoHV-5 seja significativamente maior do que os casos reportados, devido a possível confusão com o BoHV-1, pela reatividade sorológica cruzada, e também devido às manifestações clínicas da infecção serem semelhantes com a Raiva bovina (FRANCO & ROEHE, 2007).

Infecções pelo BoHV-5 podem se confundir sorologicamente com aquelas causadas pelo BoHV-1, impedindo ou dificultando o controle de ambas. A dificuldade em quantificar os prejuízos advindos de infecções pelo BoHV-1 ou BoHV-5 reside na grande semelhança antigênica e genômica (85%), não podendo ser diferenciadas com testes de diagnóstico laboratorial de rotina voltados a detecção de anticorpos (MAYFIELD et al., 1983; DELHON et al., 2003). Pode-se especular que alguns estudos epidemiológicos sobre o BoHV-1, realizados no passado, tenham confundido infecções causadas por esse vírus com àquelas causadas pelo BoHV-5. Assim, estudos adicionais são necessários para poder se avaliar com precisão a verdadeira amplitude das infecções pelo BoHV-1 e BoHV-5 na população bovina (FRANCO & ROEHE, 2007).

1.1.4. Ciclos Replicativos

Dois ciclos replicativos com características distintas podem ser reconhecidos na biologia dos alfaherpesvírus: a infecção aguda ou produtiva (ciclo lítico) e a infecção latente (Figura 3) (FRANCO & ROEHE, 2007).

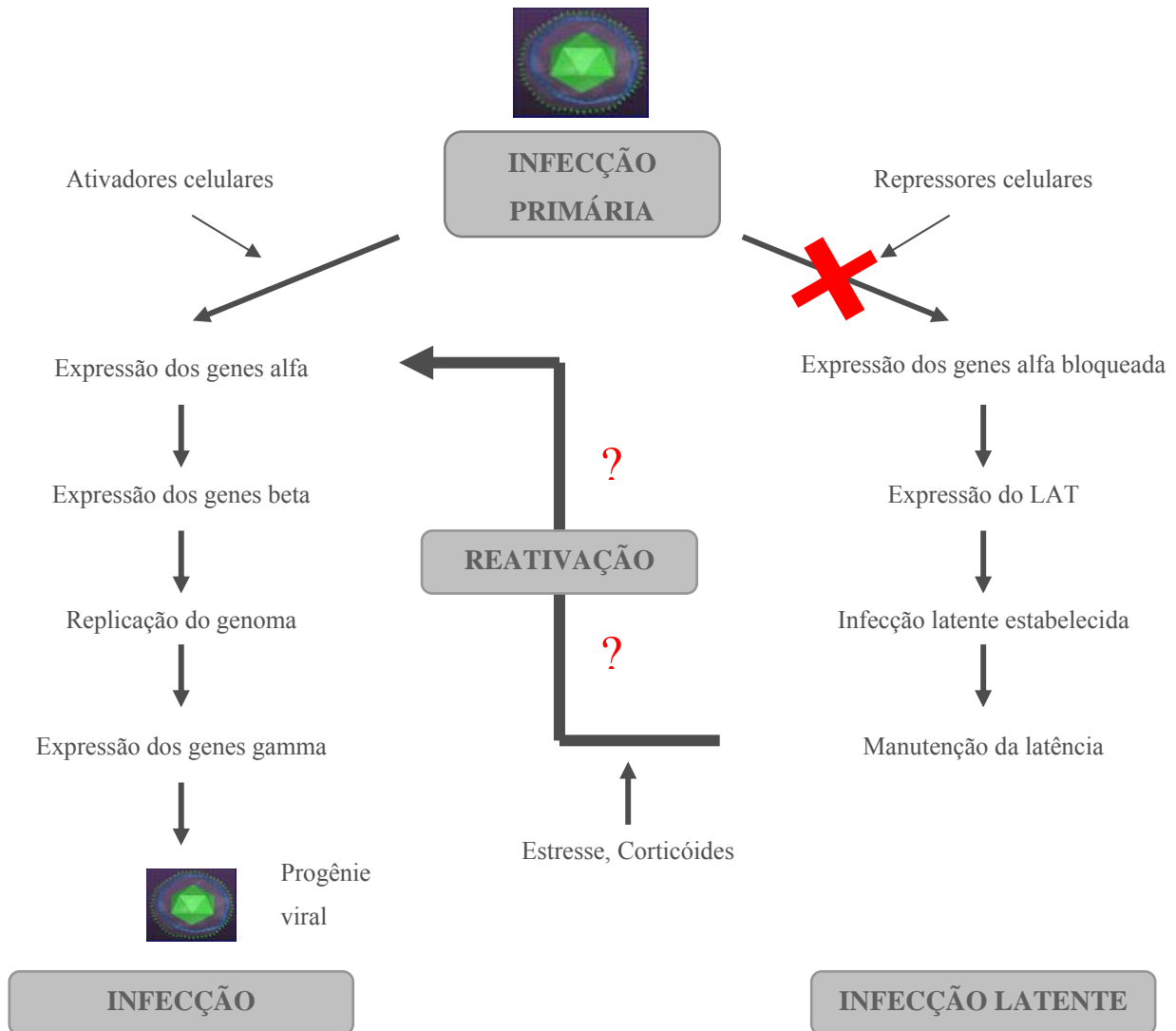


Figura 3 Etapas dos ciclos de infecção produtivo (lítico) e latente dos alfa herpesvírus. O ciclo replicativo lítico ocorre em células totalmente permissivas à replicação e resulta na produção de progênie infecciosa. A infecção latente ocorre em células semipermissivas, principalmente neurônios, e resulta na manutenção do genoma viral sem expressão gênica ou produção de progênie viral. Em determinadas situações, a infecção latente pode ser reativada e o vírus reassume a replicação produtiva (adaptado de FLINT et al., 2000).

1.1.4.1. Infecção Aguda ou Produtiva

A infecção produtiva lítica ocorre nos locais de penetração do vírus no hospedeiro (epitélio e tecidos subjacentes) e, provavelmente, também em neurônios, antes do estabelecimento e durante a reativação da infecção latente. O ciclo lítico

caracteriza-se pela expressão de todos os genes virais, replicação do genoma e produção de progênie viral infecciosa (FRANCO & ROEHE, 2007).

O mecanismo de entrada do BoHV-1 e do BoHV-5 em células hospedeiras requer a ligação à superfície celular; fusão das membranas; sinalização para o processo de invaginação; perfuração da membrana plasmática, sem a perda substancial de material citoplasmático, e restauração desta após a completa entrada viral (WILD et al., 1998). O ciclo replicativo se inicia pela interação entre proteínas de adesão (glicoproteínas) dos vírions com receptores das membranas plasmáticas das células-alvo (LIANG et al., 1991; LI et al., 1995; SPEAR et al., 2000; ROIZMANN et al., 2007). A adesão inicial para os alphaherpesvírus é mediada pela interação da molécula de glicoproteína C (gC) com a glicosaminoglicana celular e sulfato de heparina (HEROLD et al., 1994; LI et al., 1995; LI et al., 1996). As glicoproteínas B, D, H e L atuam separadamente, porém a combinação de seus efeitos é essencial para o processo de entrada viral (KLUPP et al., 1991).

A penetração ocorre pela fusão do envelope viral com a membrana plasmática (SPEAR et al., 2000). A adsorção de BoHV-1 à célula hospedeira é um processo complexo no qual o vírus usa a gC na interação inicial com os receptores celulares, seguido por interações entre gB e gD aos seus receptores (LIANG et al., 1991). Karger e Mettenleiter (1993) demonstraram que a ligação do BoHV-1 a células permissivas pode ser dividida em dois estágios, um inicial, sensível à inibição por heparina, e um subsequente, resistente à heparina. A gC é importante para manter a eficiência da replicação viral no hospedeiro (LIANG et al., 1992), mediando a ligação a receptores presentes na superfície celular, tais como a heparina (OKAZAKI et al., 1991).

Após a fusão, algumas proteínas do tegumento se dissociam do nucleocapsídeo e permanecem no citoplasma, enquanto outras são transportadas ao núcleo (HUSHUR et al., 2003). O nucleocapsídeo é transportado ao núcleo através de microtúbulos celulares, onde associam-se aos complexos dos poros nucleares, ocorrendo a sua desintegração e a liberação do genoma no interior do núcleo (FRANCO & ROEHE, 2007). A transcrição do genoma viral acontece logo após sua penetração no núcleo pela ação da RNA polimerase II (RNAPol II) celular, com o auxílio de fatores celulares e virais. No núcleo, os processos de transcrição iniciam-se de maneira temporalmente regulada por três classes de mRNA (RNA mensageiro) denominadas alfa (transcrição imediata precoce ou *immediate early*), beta (precoce ou *early*) e gama (tardios ou *late*) que são transcritas pela RNAPol II celular (FENNER et al., 1993; TIKOO et al., 1995). Os

genes alfa e beta são expressos abundantemente antes da replicação do genoma, enquanto os genes gama somente são expressos em quantidades significativas após a replicação do DNA viral (ROIZMANN et al., 2007).

Após a expressão gênica e a síntese de DNA viral, as proteínas do capsídeo são translocadas do citoplasma ao núcleo onde ocorre o agrupamento autocatalítico em capsídeos pré-formados (GRANZOW et al., 1997). A seguir, os nucleocapsídeos podem realizar o brotamento através da membrana nuclear interna (METTENLEITER, 2002) e em seguida podem perder o envelope ao atravessarem a membrana nuclear externa e então, serem reenvelopados no aparelho de Golgi (FRANCO & ROEHE, 2007). A seguir da adição do envelope, os vírions são liberados das células infectadas por fusão de vacúolos, contendo os vírions com a membrana plasmática, ou pela fusão entre células infectadas e não-infectadas (METTENLEITER, 2002).

As células infectadas com os alfaherpesvírus não sobrevivem à infecção na sua forma lítica, devido a severas alterações estruturais e bioquímicas que ocorrem em consequência da replicação viral (FRANCO & ROEHE, 2007).

1.1.4.2. Infecção Latente

Uma característica marcante das infecções pelo BoHV-1 e pelo BoHV-5, a exemplo de outros alfaherpesvírus, é a capacidade de estabelecerem infecções latentes em neurônios sensoriais (PASTORET & THIRY, 1985). A latência pode ser definida como uma persistência viral na qual o vírus mantém-se dentro das células em uma forma não infecciosa, apresentando períodos intermitentes de reativação e eliminação (AHMED et al., 1996). Essa característica está relacionada com a capacidade desses vírus se adaptarem aos hospedeiros de forma a mantê-los vivos e, periodicamente, utilizá-los para disseminarem-se para novos hospedeiros (FRANCO & ROEHE, 2007).

A infecção latente ocorre nos neurônios sensoriais, geralmente nos gânglios trigêmeo ou sacral, dependendo do local da primo-infecção (JONES, 2003). Evidências mostram que o BoHV-1, o BoHV-5 e outros alfaherpesvírus também estabelecem latência em outros locais como os centros germinativos das tonsilas faríngeas (WINKLER et al., 2000).

O ciclo de latência dos herpesvírus tem sido dividido em três passos: estabelecimento, manutenção e reativação. O estabelecimento da latência inclui, durante

a infecção aguda, a entrada do genoma viral no neurônio sensorial, primeiramente como epissoma circular e depois associado com histonas celulares, ou seja, como cromatina nas células latentemente infectadas. A expressão de genes virais é então extinta, com exceção do gene que codifica o transcrito associado à latência (LAT) (JONES, 2003).

A manutenção da latência é uma fase que permanece por toda a vida do hospedeiro e pode ser definida como um período em que as partículas virais infecciosas não são detectadas por procedimentos padrões de isolamento viral. Em geral, não ocorre a expressão de genes virais que são necessários na infecção produtiva e apenas o LAT é abundantemente expresso durante este estágio (JONES, 2003). Obviamente, a ausência de replicação viral resulta na absoluta ausência de sinais clínicos, caracterizando uma infecção totalmente subclínica e de difícil detecção (FRANCO & ROEHE, 2007).

A latência viral pode, periodicamente, ser interrompida em resposta a certos estímulos naturais ou induzidos, como por exemplo em situações de estresse (Castrucci et al., 1983; Edwards & Roeder, 1983; Msolla et al., 1983; PASTORET & THIRY, 1985; THIRY et al., 1985) ou de administração prolongada de corticosteróides, levando à reativação viral.

Os novos vírions produzidos nos gânglios são transportados via axônios até a periferia, infectando o epitélio e produzindo partículas infecciosas, que podem levar ao desenvolvimento de sinais clínicos e à transmissão para outros hospedeiros (TOMISHIMA & ENQUIST, 2001). A ocorrência de sinais clínicos associada com a reativação é denominada recrudescência e, geralmente, é caracterizada por sinais mais brandos do que aqueles resultantes da infecção aguda (FRANCO & ROEHE, 2007).

Uma vez tendo sofrido infecção primária, o animal será portador do vírus ao longo de sua vida, atuando como potencial fonte de infecção para indivíduos susceptíveis, estabelecendo a permanência da infecção no rebanho (LEMAIRE et al., 1994). O estabelecimento e reativação da latência representam pontos-chave na biologia dos herpesvírus, pois permitem a permanência indefinida do vírus nos hospedeiros, acompanhada de episódios esporádicos de reativação e excreção viral (THIRY et al., 1985).

Ao contrário do que ocorre durante a infecção produtiva, durante a latência não deve haver destruição celular. Sendo assim, tanto a indução de apoptose como a destruição das células infectadas através do mecanismo de resposta imune deve ser bloqueada. Para tal, não deve haver síntese de proteína viral durante a latência ou a

proteína deve ser tolerada pelo sistema imune do hospedeiro (ENGELS & ACKERMANN, 1996).

1.1.5. Patogenia

Dentre os fatores de risco associados aos BoHV-1 e BoHV-5 nos rebanhos pode-se destacar a idade, sexo (machos são mais freqüentemente soropositivos do que as fêmeas) e tamanho do rebanho (SOLIS-CALDERON et al., 2003; BOELAERT et al., 2005). O contato direto dos animais, assim como a compra de bovinos ou a participação em feiras de animais, devem ser levados em consideração como importantes fatores de risco (VAN SCHAIK, 2001; VAN SCHAIK et al., 2002).

A transmissão do BoHV-1 e do BoHV-5 pode ocorrer de forma direta através de aerossóis e contato com secreções (respiratórias, oculares, genitais) de animais infectados (WYLER et al., 1989; MARS et al., 2000) e de forma indireta através da fômites, inseminação artificial e transferência de embriões (VAN OIRSCHOT et al., 1993; WYLER et al., 1989; BIELANSKI & DUBUC, 1994). Além disso, o vírus tem sido eventualmente detectado no leite de vacas, chamando a atenção para mais este possível veículo de transmissão (FRANCO & ROEHE, 2007). Portanto, as portas de entrada do vírus no organismo dos bovinos são a mucosa oro-nasal, genital e ocular (ENGELS & ACKERMANN, 1996).

Logo após a penetração no organismo, o vírus realiza uma replicação primária nas células epiteliais locais, provocando lise celular e levando ao aparecimento dos primeiros sinais clínicos da infecção (congestão local, presença de secreções, lesões vesiculares ou erosivas). A infecção sistêmica acontece quando partículas virais invadem linfonodos e vasos linfáticos seguida de uma viremia associada a linfócitos disseminando-se pelo organismo (ENGELS & ACKERMANN 1996).

O período de incubação dos herpesvírus bovinos varia entre 2 e 6 dias, dependendo da dose e via de inoculação (KAHRS, 1977) e os maiores títulos virais são produzidos e excretados no estágio agudo da infecção (ENGELS & ACKERMANN, 1996), principalmente entre o quarto e o sexto dia pós-infecção (BELKNAP et al., 1994; THIRY et al., 1999; MEYER et al., 2001). A disseminação da infecção provavelmente acontece por três diferentes vias: sangue, sistema nervoso e célula-a-célula (HALL et al., 1966; BAGUST & CLARK, 1972; PASTORET et al., 1982; MEYER et al., 2000).

Bovinos de todas as idades e raças são susceptíveis à infecção pelo BoHV-1, no entanto, geralmente a enfermidade ocorre em animais acima de seis meses de idade e isto deve-se, provavelmente, à presença de anticorpos maternos em animais mais novos, podendo assim, reduzir a gravidade da infecção (DONKERSGOED & BABIUK, 1991). Quanto ao BoHV-5, ele afeta normalmente bovinos jovens (animais até oito meses de idade), mas pode também acometer, ocasionalmente, animais mais velhos (D'ARCE et al., 2002).

Devido a uma pronunciada resposta imune estas infecções são geralmente auto-limitantes, sendo comum a recuperação do animal entre 1 e 2 semanas. As lesões locais podem facilitar infecções secundárias gerando outros quadros clínicos como pneumonias, enterites, mastites, metrites, dermatites e tonsilites (BLOOD et al., 1988).

1.1.5.1. Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR)

A forma respiratória da infecção por BoHV-1, conhecida como Rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), está geralmente associada ao BoHV1.1, a qual acomete o sistema respiratório superior, é contagiosa e aguda (FENNER et al., 1992, RIET-CORREA et al., 1996). No entanto, o BoHV-5 também pode causar sinais de doença respiratória (SCHUDEL et al., 1986; HÜBNER et al., 2005). Este tipo de infecção pode apresentar-se de forma subclínica, leve ou severa, podendo resultar em morbidade de até 100%, com mortalidade geralmente ausente ou baixa (<5%) (FRANCO & ROEHE, 2007).

As manifestações clínicas caracterizam-se por febre (40,5-42° C), depressão geral, anorexia, dispnéia, taquipnéia, tosse, corrimento nasal seroso ou sero-hemorrágico e posteriormente purulento (FENNER et al., 1992; RIET-CORREA et al., 1996). Além disso, alguns animais podem desenvolver conjuntivite uni ou bilateral com fotofobia e lacrimejamento, sialorréia e ulcerações na mucosa oral (FENNER et al., 1992, RIET-CORREA et al., 1996). À auscultação pulmonar, identifica-se aumento do murmúrio vesicular, em conseqüência da obstrução parcial das vias respiratórias altas (KAHRS, 1981). Em animais em lactação, ocorre queda na produção de leite. Em machos, podem haver prejuízos temporários à qualidade do sêmen, como anomalias morfológicas e funcionais dos espermatozóides (FRANCO & ROEHE, 2007).

Em vacas prenhes soronegativas, a infecção pode causar abortos após um período de incubação de três a seis semanas, principalmente entre o 5° e 8° mês de gestação (WYLER et al., 1989). Quando as fêmeas são infectadas nos primeiros sete dias após a monta, o vírus pode atravessar o epitélio uterino, infectar as membranas embrionárias e causar a morte do embrião, sendo que a morte ocorre em poucos dias após a infecção e o único sinal clínico de falha na prenhez é um ciclo estral prolongado. Esta situação é freqüentemente interpretada erroneamente, como falha na concepção e não como gestação interrompida (MILLER, 1991).

Surtos de IBR são mais freqüentemente observados em animais jovens e estão geralmente associados a situações de estresse e aglomeração de animais, incluindo eventos de transporte e confinamento (RIET-CORREA et al., 1996).

O curso da enfermidade é rápido e a recuperação clínica ocorre em até dez dias, caso não ocorram infecções bacterianas secundárias graves ou outras infecções virais associadas (ENGELS & ACKERMANN, 1996; PIDONE et al., 1999).

1.1.5.2. Vulvovaginite Pustular Infecciosa (IPV)/Balanopostite Pustular Infecciosa (IPB)

A forma reprodutiva da infecção por BoHV-1 é denominada Vulvovaginite pustular infecciosa (IPV) na fêmea e Balanopostite pustular infecciosa (IPB) no macho (WYLER et al., 1989) e esta forma está geralmente associada a amostras de BoHV-1.2b (MILLER, 1991; SMITH et al., 1995; FRANCO & ROEHE, 2007). No entanto, o BoHV-5 também pode infectar o trato genital de bovinos atingindo o sêmen (ESTEVES et al., 2003; GOMES et al., 2003) ou causando abortos (CARRILLO et al., 1983).

Em vacas, caracteriza-se por edemas na vulva onde se observam pequenas pústulas disseminadas na superfície da mucosa, acompanhadas de descarga vaginal mucopurulenta (WYLER et al., 1989). Em touros, a sintomatologia clínica também inclui inflamações nas áreas genitais do pênis e prepúcio (THIELSCHER & HUTH, 1986), sendo que, às vezes as lesões são coalescentes e aparecem cobertas por um exsudato amarelado. Também podem ocorrer lesões ulcerativas e a micção é freqüentemente dolorosa (KAHRS, 1981; FENNER et al., 1992; RIET-CORREA et al., 1996; ROCHA et al., 1999; PUENTE, 2003). Febre, anorexia e depressão podem estar

presentes e podem ser agravadas por infecções bacterianas secundárias (FRANCO & ROEHE, 2007).

A infecção assume importância maior em touros utilizados na inseminação artificial, já que o vírus é eliminado pelo sêmen e, desta forma, pode ser transmitido para fêmeas susceptíveis causando além de vulvovaginite, endometrite, salpingite e outros problemas reprodutivos como infertilidade temporária. Um dos efeitos mais sérios provocado pelo BoHV-1 em fêmeas é o prolapso uterino, produzido pela intensa dor devido à gravidade das lesões da mucosa vaginal (MILLER, 1991; FENNER et al., 1992; RIET-CORREA et al., 1996; ROCHA et al., 1999; PUENTE, 2003).

A enfermidade progride até o 7º e 8º dia pós-infecção e, não havendo complicações, o animal apresenta cura clínica ao redor dos dias 10-14 pós-infecção (WYLER et al., 1989; PIDONE et al., 1999).

1.1.5.3. Encefalite

A doença neurológica causada pelo BoHV-5 pode ocorrer em forma de surtos ou acometer animais isolados. A enfermidade é mais frequente em bezerros, sobretudo aqueles submetidos ao estresse da desmama e confinamento (GARDINER et al., 1964; RIET-CORREA et al., 1989; RIET-CORREA, et al., 2006; RISSI et al., 2006). Tem-se também demonstrado que o BoHV-1 pode ser encontrado no sistema nervoso central (SNC) de bovinos, podendo ou não estar relacionado a casos de doença neurológica (ROELS et al., 2000; SILVA et al., 2007).

Os sinais neurológicos caracterizam-se por depressão, anorexia, incoordenação, tremor muscular, andar em círculos, opistótono, cegueira, bruxismo, protusão da língua, incapacidade de deglutir, pressionamento da cabeça contra anteparos, rigidez da mandíbula, aumento da temperatura (40-42,5º C), decúbito, convulsões e, eventualmente, morte (WYLER et al., 1989; SANCHES et al., 2000; MEYER et al., 2001; PEREZ et al., 2002; RISSI et al., 2006; RIET-CORREA et al., 2006). Frequentemente esses sinais manifestam-se em crises, cujos espaçamentos e intensidades intensificam-se gradativamente (FRANCO & ROEHE, 2007). Sinais respiratórios (hiperemia, corrimento nasal, dificuldade respiratória) e abortos também têm sido relatados. O curso clínico da enfermidade dura de 1 a 15 dias e culmina com

decúbito, convulsões e morte (SALVADOR et al., 1998; RIET-CORREA et al., 2006; RISSI et al., 2006).

Embora o BoHV-5 esteja mais relacionado com o desenvolvimento de encefalites, infecções por BoHV-1 também parecem estar envolvidas com esta enfermidade (FRENCH, 1962; CARRILLO et al., 1983; SCHUDEL et al., 1986; WEIBLEIN et al., 1989; SILVA et al., 2007), uma vez que o SNC possui receptores para todas as variantes de BoHV, incluindo os tipos 1 e 5.

1.1.6. Diagnóstico

O diagnóstico presuntivo da infecção por herpesvírus bovino é feito com base no histórico da propriedade, sinais clínicos e lesões observadas ao exame clínico (FRANCO & ROEHE, 2007). No entanto, a suspeita clínico-patológica não deve ser baseada apenas nessas características, pois elas são sugestivas, mas não patognomônicas devendo, então, ser confirmadas por exames laboratoriais (DONKERSGOED & BABIUK, 1991).

Durante infecções agudas, devem ser realizados testes para detecção de vírus, antígenos ou DNA viral de amostras clínicas. As amostras geralmente utilizadas são suabes nasais e oculares, vaginais, de prepúcio ou coletadas das áreas com lesões evidentes; tecidos (traquéia, pulmões), fetos inteiros ou tecidos de fetos abortados (pulmões, fígado e rins) e sêmen. Em casos de suspeita de encefalite por herpesvírus o material a ser enviado ao laboratório é o cérebro e bulbo olfatório (FRANCO & ROEHE, 2007).

Caso não tenha sido possível obter amostras de tecidos ou secreções na fase aguda, a infecção pode ser diagnosticada por meio de testes sorológicos. Para isto, duas coletas de soro devem ser realizadas: a primeira durante a fase aguda e a segunda três a quatro semanas após. Um aumento de quatro vezes nos títulos de anticorpos entre as duas coletas é indicativo da infecção e pode confirmar o diagnóstico (PASTORET & THIRY, 1985). Em fêmeas em reprodução, é conveniente fazer uma coleta de soro antes da gestação e caso houver algum problema reprodutivo de ordem infecciosa suspeita, uma nova coleta deve ser realizada, sendo ambas amostras remetidas ao laboratório (FRANCO & ROEHE, 2007).

O diagnóstico laboratorial das infecções pelos BoHV-1 e BoHV-5 pode ser etiológico ou sorológico. Atualmente, as técnicas sorológicas mais utilizadas na detecção de anticorpos específicos incluem a soroneutralização (SN) e os ensaios imunoenzimáticos (ELISA) (DEL FAVA et al., 2006). A prova de soroneutralização é amplamente utilizada como padrão para a detecção de anticorpos específicos para o BoHV (BITSCH, 1978; DEL FAVA et al., 1998; ROCHA et al., 2001; VIEIRA et al., 2003), no entanto, a técnica de ELISA é considerada mais sensível e rápida e tem substituído largamente outras provas sorológicas mais tradicionais (COLLINS et al., 1985).

O isolamento do vírus em cultivos celulares é o principal método de diagnóstico da infecção pelo BoHV (HALFEN & VIDOR, 1998; FLORES, 1999; SCHYNTS et al., 1999). Suspensões de tecidos ou secreções são preparadas e inoculadas em cultivos celulares visando o isolamento do agente (MADIN et al., 1956). *In vitro*, a infecção pelo BoHV causa efeito citopático (ECP) característico, isto é, ruptura do tapete celular com células arredondadas e agrupadas, formando placas virais entre 24 e 72 horas após a inoculação (FLORES, 1999). O isolamento do vírus deve ser cautelosamente interpretado, pois isto não significa necessariamente que o vírus é a causa do aparecimento da doença, mas talvez possa ser apenas um vírus latente que foi reativado devido a condições de estresse. Se houver ECP compatível com herpesvírus, a identidade do agente deve ser confirmada (PASTORET & THIRY, 1985).

A técnica de imunoperoxidase (IPX) também pode ser utilizada na identificação de isolados de BoHV, bem como na análise sorológica de animais suspeitos da infecção. O uso de anticorpos monoclonais na IPX, tem demonstrado uma maior especificidade na detecção de antígenos virais, facilitando o diagnóstico correto (ROEHE et al., 1997; SOUZA et al., 2002).

Diversas provas de PCR têm sido desenvolvidas utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores para genes específicos de BoHV, devido à sua rapidez, sensibilidade e especificidade (ROS et al., 1999; ALEGRE et al., 2001). Essa técnica, no entanto, tem aplicação restrita para o diagnóstico de infecções agudas pelo BoHV, mas tem sido importante na detecção da infecção latente, quando a presença do DNA viral, nos sítios de latência, pode ser o único e mais seguro indicativo da infecção (FRANCO & ROEHE, 2007). Além disso, a técnica de PCR aliada ao uso de enzimas de restrição tem sido amplamente utilizada como ferramenta para diagnóstico, bem como na

caracterização dos isolados de BoHV, devido à estabilidade do genoma destes vírus (ENGELS et al., 1986; LYAKU et al., 1996; ROS & BELÁK, 1999).

1.1.6.1. Soroneutralização (SN)

A soroneutralização é uma técnica amplamente utilizada como padrão ouro para a detecção de anticorpos específicos para o BoHV (BITSCH, 1978; DEL FAVA et al., 1998; ROCHA et al., 2001; VIEIRA et al., 2003). No entanto, ela não é capaz de diferenciar os anticorpos produzidos contra o BoHV-1 daqueles contra o BoHV-5 (FRANCO & ROEHE, 2007). Além disso, a SN pode não detectar anticorpos em alguns animais que apresentem a infecção viral em estado de latência prolongada ou naqueles recentemente infectados (DEL FAVA et al., 2006). Nestas duas situações, os animais podem apresentar títulos basais de anticorpos neutralizantes que não são detectáveis por meio deste procedimento sorológico, originando com isto resultados “falso-negativos” (WYLER et al., 1989). Fatores como o tempo de incubação entre o vírus e os soros antes da adição das células influenciam na sensibilidade do teste. O teste convencional preconiza um tempo de incubação de uma hora (HOUSE & BAKER, 1971; DEREGT et al., 1993). No entanto, estudos têm demonstrado que o aumento deste tempo para 24h é recomendado quando uma sensibilidade máxima é desejada como, por exemplo, para o comércio internacional de animais (BITSCH, 1978; VIEIRA et al., 2003; OIE, 2004).

A prova é baseada na reação de neutralização, *in vitro*, de uma quantidade fixa de partículas virais infecciosas pelos anticorpos presentes no soro do animal infectado (HOUSE & BAKER, 1971). Caso o soro contenha anticorpos neutralizantes, o vírus é impedido de infectar o cultivo celular. O título de anticorpos presentes no soro corresponde à recíproca da última diluição do soro capaz de neutralizar o efeito citopático causado pelo vírus. Embora haja ampla reação sorológica cruzada entre o BoHV-1 e o BoHV-5, a SN frente a apenas um dos vírus pode levar a resultados “falso-negativos”, cujos níveis percentuais detectados já seriam suficientes para manter a infecção nos rebanhos (TEIXEIRA et al., 1998).

A SN tem sido amplamente utilizada em inquéritos epidemiológicos, certificação de rebanhos, triagem de reprodutores destinados à coleta e comercialização de sêmen, além de dar suporte a investigações clínicas (FRANCO & ROEHE, 2007). Mesmo sendo um teste relativamente simples para execução e interpretação e de

permitir a titulação dos soros positivos, a soroneutralização tem a desvantagem de ser uma reação que demanda tempo e exige a produção e manutenção de cultivos celulares (CHO & BOHAC, 1984; DONKERSGOED & BABIUK, 1991).

1.1.7. Medidas de Controle e Erradicação

Os programas de controle e erradicação dos BoHV-1 e 5 devem levar em consideração a situação específica de cada rebanho, com relação a severidade da infecção, práticas de manejo e prevalência da infecção (NOORDEGRAAF et al., 2000). Em geral, podem se adotar duas estratégias principais de controle, de acordo com o histórico clínico e a situação epidemiológica dos rebanhos: controle com ou sem vacinação (FRANCO & ROEHE, 2007).

Rebanhos com histórico comprovado de infecção, com sorologia elevada, sistemas de recria e confinamento que agregam novilhos de várias procedências, além de propriedades com alta rotatividade de animais (compra-venda-transporte, etc.) são recomendados a implementar a vacinação. Nessas situações, a vacinação contínua e regular pode reduzir a circulação de vírus e a ocorrência de doença clínica, reduzindo, conseqüentemente, as perdas econômicas (FRANCO & ROEHE, 2007).

Rebanhos com sorologia alta, mas sem histórico clínico da doença e sem problemas reprodutivos, podem ser mantidos sem vacinação, porém com monitoramento contínuo dos parâmetros produtivos e clínicos (FRANCO & ROEHE, 2007).

As vacinas disponíveis atualmente no mercado brasileiro não impedem o estabelecimento de infecções com o vírus de campo, nem tampouco evitam a indução de latência em animais vacinados, ou seja, seu papel se limita a minimizar os prejuízos decorrentes de manifestações clínicas da doença (DONKERSGOED & BABIUK, 1991; CASTRUCCI et al., 2002; GUNGOR & OZKUL, 2007; MUYLKENS et al., 2007). Portanto, as vacinas tradicionais contra o BoHV-1 têm se mostrado incompatíveis com programas de erradicação. Com isso, surgiu a necessidade de se elaborar vacinas que permitissem a diferenciação de animais infectados (portadores da infecção latente) dos animais vacinados, as chamadas vacinas diferenciais, que ao serem utilizadas em conjunto com testes de diagnóstico que detectam anticorpos contra a proteína ausente na cepa vacinal, permitem a diferenciação entre estes animais (VAN OIRSCHOT et al.,

1996). O uso destas vacinas tem constituído a base de programas de controle e erradicação do BoHV-1 em vários países europeus, mas ainda estão em fase de desenvolvimento no Brasil (KRAMPS et al., 2004; MUYLKENS et al., 2007). Estudos têm demonstrado que essas vacinas diferenciais não são re-excretadas após tratamento com corticosteróides e que, conseqüentemente, vírus vacinal reativado não é disseminado no rebanho (MARS et al., 2000; HÜBNER et al., 2005).

Além da vacinação, outras medidas de controle dos BoHV incluem a utilização de touros não reagentes, sêmen negativo, vigilância constante dos rebanhos com exame clínico adequado, descarte de fêmeas soropositivas com problemas reprodutivos e quarentena de animais recém adquiridos antes da introdução junto ao rebanho (LAMBERTO, 2003).

Em relação ao BoHV-5, não existem medidas específicas para o controle ou profilaxia de tais infecções (GEORGE, 1991). Devido às semelhanças biológicas e epidemiológicas, as medidas indicadas para o controle do BoHV-5 são as mesmas utilizadas para o BoHV-1. Além disso, a maioria das vacinas disponíveis não são elaboradas especificamente contra o BoHV-5. A campo, vacinas contra BoHV-1 vêm sendo utilizadas no controle de meningoencefalites causadas pelo BoHV-5 (RISSI et al., 2007), no entanto, esta possível proteção cruzada não parece conferir proteção adequada (SILVA et al., 2007).

Dentre as estratégias de controle ou erradicação propostas, a mais freqüentemente recomendada envolve a testagem sorológica periódica e descarte de eventuais animais soropositivos. Este método pode ser efetivo (ACKERMANN et al., 1990; DEL FAVA et al., 1998), mas apresenta como inconveniente seu alto custo e demora para se atingir os objetivos iniciais (ACKERMANN et al., 1990). Rebanhos de baixo risco, sem histórico da enfermidade/infecção, devem ser encorajados a implementar tais medidas (ACKERMANN et al., 1990).

Esforços para eliminar o BoHV-1 das populações de ruminantes têm sido implementados principalmente na Europa. A Suíça foi o primeiro país a introduzir um programa de erradicação sem vacinação de IBR/IPV no ano de 1978. O sucesso de países como a Dinamarca, Áustria, Suíça e, mais recentemente, a Finlândia, na aquisição do estatus “livre de IBR” tem pressionado ainda mais os outros países a tentarem erradicar o vírus dos seus territórios (SIEBERT et al., 1995; CASTRUCCI et al., 2002). Países como Suíça e Dinamarca, que tinham baixa prevalência da infecção e que nunca permitiram o uso de vacinas, foram capazes de erradicar o BoHV-1 através

de testes sorológicos para detecção de anticorpos contra o vírus, aliados a programas de remoção de animais positivos. Na Suíça, por exemplo, o programa foi baseado em pesquisas sorológicas anuais no rebanho nacional e restrição do comércio para animais soropositivos. Inicialmente, foi dada prioridade de erradicação às fazendas com animais de reprodução e depois para rebanhos de engorda, culminando com a eliminação de 50.000 animais soropositivos (ACKERMANN et. al., 1990).

No Brasil, o controle da infecção tem sido realizado através de diferentes estratégias. Del Fava et al. (1998) obtiveram sucesso em um programa de erradicação do BoHV em uma propriedade leiteira do Estado de São Paulo, sem vacinação, efetuando medidas sanitárias adequadas, tais como monitoramento sorológico constante, isolamento e descarte dos animais positivos, controle do trânsito de animais na propriedade e utilização de sêmen negativo para o BoHV-1. Pituco et al. (1997), também no Estado de São Paulo, observaram queda na prevalência da infecção em rebanhos onde foi utilizada uma hiperimunização (vacinação semestral de animais soropositivos), associada à eliminação gradual dos animais soropositivos, monitoramento sorológico dos negativos, quarentena e utilização de sêmen livre de BoHV-1.

Para a completa erradicação dos BoHV-1 e 5 dos rebanhos bovinos é necessário buscar-se testes eficazes no reconhecimento de animais latentemente infectados, pois esses podem ter sido imunizados passivamente através do colostro e, como consequência, podem apresentar-se negativos em testes sorológicos de rotina. No entanto, esses animais serão os grandes responsáveis pela disseminação da infecção nos rebanhos (BRADSHAW & EDWARDS, 1996; LEMAIRE et al., 2000). Além disso, outro fator que pode prejudicar os programas de erradicação e controle da infecção é o fato de que os BoHV-1 e BoHV-5 possuem a capacidade de infectar diversas espécies de ruminantes, dentre elas cabras, ovelhas, cervos, entre outros. Essas outras espécies podem apresentar-se como um reservatório alternativo para esses vírus (SIX et al., 2001; KEUSER et al., 2004; THIRY et al., 2006; MUYLKENS et al., 2007). No entanto, este fato é ainda contraditório, pois já foi comprovado que as ovelhas não apresentam grande importância na transmissão do BoHV-1 (HAGE et al., 1997). Além disso, muitos testes de diagnóstico baseiam-se na detecção de anticorpos específicos em soro, mas sua especificidade pode ser comprometida pela existência de reações sorológicas cruzadas entre o BoHV-1 e outros alfa herpesvírus de ruminantes (Keuser et al., 2004; THIRY et al., 2006).

OBJETIVOS

1.2. Objetivos gerais

Contribuir para o aperfeiçoamento dos testes para a detecção de anticorpos contra BoHV-1 e BoHV-5 e determinação de dados sobre a sua epidemiologia.

1.3. Objetivos específicos

- Verificar possíveis diferenças na sensibilidade de testes de SN quando executados utilizando-se diferentes tipos e subtipos de BoHV-1 e BoHV-5 como vírus de confrontação;
- Determinar a melhor combinação de cepas virais a serem utilizadas nos testes de SN para duas regiões geograficamente distantes, no intuito de aumentar a sensibilidade na detecção de animais soropositivos;
- Uma vez determinada(s) qual(is) a(s) cepa(s) mais eficaz(es), realizar um levantamento soroepidemiológico para determinar a soroprevalência de infecções por BoHV-1 e BoHV-5 no Estado do Rio Grande do Sul e avaliar possíveis fatores de risco a essas infecções.

CAPÍTULO 1

Soroneutralização (SN) frente a diferentes tipos e subtipos de herpesvírus bovinos tipos 1 (BoHV-1) e 5 (BoHV-5)

Autores:

Holz, C.L.¹; Cibulski, S.P.¹; Teixeira, T.F.¹; Caixeta, S.P.M.B.¹; Batista, H.B.C.R.²; Campos, F.S.²; Roehle, L.R.²; Oliveira, M.T.²; Silva, J.R.¹; Dezen, D.¹; Varela, A.P.M.¹; Cenci, A.¹; Brito, W.M.E.D.³; Franco, A.C.²; Roehle, 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 Sarmiento Leite 500 sala 208, CEP 90050-170.

3. Laboratório de Virologia Animal, Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Goiás, Goiania, Rua 235 s/n / 3o andar, sala 418, CEP 74605-050.

*Endereço para correspondência: Caixa Postal 2076, Porto Alegre, RS, Brasil, CEP 90 001 970. Tel.: 51. 3481 37 11. Fax: 51.3481 33 37

*E-mail: proehe@gmail.com

Trabalho em preparação

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). However, little is known about possible variations in the sensitivity of the SN when different virus strains or distinct types or subtypes of a particular virus are used as challenge virus in the assays. In addition, viruses circulating in a particular geographic region can present different levels and types of immune stimuli, that can interfere in the serological analysis. 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 (Los Angeles - LA and EVI123/98), a BoHV-1.2a strain (SV265/96) and three samples of different BoHV-5 subtypes (BoHV-5a strain EVI88/95, BoHV-5b strain A663 and BoHV-5c strain ISO95/97). SN results were compared in a 2x2 table using McNemar test and the agreement was analysed using the Kappa correlation coefficient. The agreement of the assays ranged from moderate to excellent for samples. The agreement between of seropositive samples (test McNemar) detected in the SN tests varied according to the evaluated comparisons. 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. To aim a high level of sensitivity, SN tests should be performed with different BoHV-1 and BoHV-5 subtypes. In addition, cattle from distinct geographical areas may give rise to different results in SN tests against different BoHV-1 and BoHV-5 strains.

Index terms: 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). No entanto, pouco se sabe sobre possíveis variações na sensibilidade da SN quando diferentes cepas virais de distintos tipos ou subtipos são usados como vírus de confrontação nestes testes. Adicionalmente, os vírus que circulam em uma região geográfica particular podem apresentar diferentes graus e tipos de resposta imune, que podem interferir nas análises sorológicas. 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 (Los Angeles – LA e EVI123/98), uma de BoHV-1.2a (SV265/96) e três de diferentes subtipos de BoHV-5 (BoHV-5a EVI88/95, BoHV-5b A663 e a amostra de BoHV-5c ISO95/97). Os testes de SN foram comparados, dois a dois, pelo teste de McNemar e a concordância foi analisada pelo coeficiente de correlação Kappa. A concordância dos testes variou de moderada a excelente. A concordância de positivos (teste de McNemar) detectados nos testes de SN também variou dependendo das comparações avaliadas. 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. Se o objetivo for o aumento dos níveis de sensibilidade, os testes de SN necessitam ser realizados frente a diferentes subtipos de BoHV-1 e BoHV-5. Adicionalmente, soros de bovinos de distintas regiões geográficas podem apresentar variada sensibilidade nas SN frente a diferentes cepas destes agentes virais.

Termos de indexação: 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* (Roizmann & Pellett 2007, 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 BoHV-1.2b (Metzler et al. 1985, D'Arce et al. 2002, Souza et al. 2002, Franco & Roehe 2007). Os subtipos 1.1 e 1.2a são os mais patogênicos e estão normalmente associados, respectivamente, a casos de doença respiratória clássica e abortos (Miller et al. 1991). O BoHV-1.2b possui patogenicidade moderada (Metzler et al. 1985) e causa vulvovaginite ou balanopostite, não tendo sido, até o presente, relacionado a casos de aborto (Miller 1991, Smith et al. 1995). 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” (Metzler et al. 1985, D'Arce et al. 2002).

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 (Franco & Roehe 2007). Desta forma, infecções pelo BoHV-5 podem se confundir sorologicamente com aquelas causadas pelo BoHV-1 e vice-versa, impedindo a discriminação entre estas (Teixeira et al. 1998).

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 (MEM; Gibco) suplementadas com 10% de soro fetal bovino (SFB; Soraly) e antibióticos (Penicilina e Estreptomicina) em concentrações usuais (Paul, 1970). Todos os meios e soros foram previamente testados por tentativa de isolamento viral em cultivos celulares (Halfen & Vidor 1998, Flores 1999, Franco & Roehe 2007) para assegurar a ausência de vírus da diarréia viral bovina (BVDV) e herpesvírus bovinos. As células foram tripsinizadas a cada 3-4 dias e cultivadas seguindo métodos usuais (Paul, 1970).

Vírus

Foram utilizadas as amostras: Los Angeles, ou LA (BoHV-1.1; Madin et al. 1956), EVI123/98 (BoHV-1.1; Roehe et al. 1997, D’Arce et al. 2002, Souza et al. 2002), SV265/96 (BoHV-1.2a; Franco et al. 2001, D’Arce et al. 2002, Spilki et al. 2002), EVI88/95 (BoHV-5a; Roehe et al. 1997, Souza et al. 2002), A663 (BoHV-5b; Carrillo et al. 1983, D’Arce et al. 2002) e ISO95/97 (BoHV-5c; Souza et al. 2002). Dentre os subtipos de BoHV-1 e BoHV-5 conhecidos até o momento, somente o subtipo BoHV-1.2b não foi inserido em nosso estudo, pelo fato de não o termos disponível em nosso laboratório. A multiplicação e titulação dos vírus foram realizadas em células MDBK seguindo métodos usuais (Roehe et al. 1997).

Soros

Foram examinadas 802 amostras de soro bovino, sendo 502 coletadas na região Sul do Brasil (Rio Grande do Sul) e 308 amostras coletados 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, como descrito previamente (Deregt et al. 1993). Os soros foram diluídos em duplicata nas diluições $\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{4}$ 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 (Zar 1999) para populações relacionadas, adotando-se o nível de significância de 5% de probabilidade, através do programa Dag Stat (Mackinnon 2000). A comparação entre as concordâncias observadas e esperadas empregou o coeficiente Kappa, com o auxílio do programa Dag Stat (Mackinnon 2000).

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 (Tabela 1).

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 (Kappa entre 0,41 a 0,6) a excelente (Kappa>0,81), como pode ser constatado na Tabela 3. No entanto, somente na comparação entre as cepas A663 e ISO95/97 o índice encontrado foi excelente. 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) (Tabela 2) observou-se diferenças significativas ($P<0,05$) nas comparações dos resultados da maioria das SN. Entretanto, na minoria das comparações não houve diferença significativa ($P>0,05$) na concordância de positivos encontrados nos testes, como foi o caso das comparações entre as SN que utilizaram como vírus de confrontação as amostras LA e EVI123/98; LA e ISO95/97; EVI123/98 e EVI88/95; EVI123/98 e ISO95/97; SV265/96 e EVI88/95 e também EVI88/95 e ISO95/97 (Tabela 2). Este fato também demonstra que existem grandes variações na detecção de amostras positivas de um teste em comparação com o outro. Portanto, percebemos que uma mesma amostra positiva frente a um vírus poderá não ser detectada pelos demais, o que nos leva a concluir que os testes de SN tradicionalmente utilizados deixam muito a desejar quanto ao nível de sensibilidade na detecção destes bovinos positivos

A SN frente a uma cepa dita “clássica” é utilizada como técnica padrão para detecção de BoHV-1 e 5 (Bitsch 1978, Del Fava et al. 1998, Rocha et al. 2001, Vieira et al. 2003), devido ao alto grau de reatividade sorológica cruzada encontrado entre estes vírus (Bitsch 1978). 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.

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). Esta cepa, no entanto, não é usualmente incluída como amostra de confrontação nos laboratórios que utilizam a SN como técnica de rotina. Caso seja feita a opção pelo uso da SN frente a uma única cepa viral, aparentemente a A663 permitiria a detecção do maior número de soropositivos. No entanto, ainda assim, em nosso estudo, ela deu margem a 23,5% de soros falso-negativos. Apesar da A663 ser uma cepa de BoHV-5b, os resultados obtidos não permitem estabelecer quantos animais de fato teriam anticorpos contra BoHV-5 ou BoHV-1. Este resultado está de acordo com um estudo prévio (Teixeira et al. 1998) onde foi demonstrado que a SN tem limitada capacidade de revelar diferenças tipo-específicas na resposta imune neutralizante frente ao BoHV-1 e ao BoHV-5.

Esses resultados revelam que o uso de um único vírus de desafio em testes de SN apresenta uma baixa sensibilidade quando comparada à sensibilidade máxima alcançada frente a seis cepas de vírus. Essa baixa sensibilidade pode comprometer esforços de controle ou erradicação, daí sua importância. Em situações onde a erradicação é a meta, por exemplo, estes animais podem representar uma parcela significativa de animais potencialmente disseminadores dos vírus, os quais não seriam detectados em testes sorológicos. Assim, falhas na sensibilidade da prova utilizada poderiam levar a um comprometimento grave desse objetivo. Provavelmente, o fenômeno aqui detectado pode ter contribuído para ocasionais insucessos em esforços de controle ou erradicação baseados na identificação e eliminação de animais soropositivos. Nesses casos, em função da baixa sensibilidade da prova utilizada para a detecção de soropositivos, a infecção tenderia a perpetuar-se nos rebanhos.

Com relação aos resultados obtidos frente às cepas de BoHV-1.1 (LA e EVI123/98), o somatório das duas foi capaz de reconhecer 281 soros positivos (85,9%) do total de 327 referentes à sensibilidade máxima encontrada (Tabela 1). No entanto, deste total somente 166 (59,1%) das amostras foram reconhecidas concomitantemente como positivas pelos dois vírus em questão. A cepa LA isoladamente detectou 231 (70,6%) e a EVI123/98 216 (66,1%) bovinos positivos. A amostra SV265/96 (BoHV-1.2a) foi a que isoladamente detectou o menor número de amostras positivas 194/327

(59,3%) (Tabela 1). Os resultados obtidos frente às três cepas de BoHV-5 utilizadas no presente estudo (EVI88/95, BoHV-5a; A663, BoHV-5b e ISO95/97, BoHV-5c) demonstram que utilizadas concomitantemente foram capazes de detectar 289/327 amostras positivas (88,4%). Ao utilizar apenas duas cepas de BoHV-5, o número de soros positivos variou de 281 (85,9%) a 258 (78,9%) e utilizando-se apenas uma destas cepas o total variou de 250 (76,4%) a 204 (62,4%) (Tabela 1).

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) (Tabelas 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 (Tabela 1). O uso somatório de cepas virais à SN pode aparentemente sobrepujar diferenças ocasionalmente verificadas nos índices de sensibilidade obtidos com cepas isoladas. Como demonstrado no presente estudo, diferentes cepas de vírus podem apresentar maior ou menor capacidade de detecção de animais soropositivos, se consideradas diferentes regiões geográficas (Tabela 1). É recomendável, portanto, que levantamentos epidemiológicos sejam baseados em testes realizados frente às cepas virais contra as quais a sensibilidade da prova seja mais elevada. Na verdade, em função da alta variabilidade aqui registrada, mais de uma cepa de vírus deveria ser utilizada para que a sensibilidade obtida possa se aproximar da efetiva prevalência de BoHV-1 e BoHV-5. Outro fator a ser ainda investigado é se uma alta variabilidade também seria encontrada se o mesmo tipo de combinações de cepas virais fosse utilizado em outros testes de diagnóstico sorológico de BoHV-1 e 5, como é

o caso de testes de ELISA, que também baseiam-se na detecção de reações antígeno-anticorpo.

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) 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. CLH, é mestranda; TFT, DD, HBCRB são doutorandos do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). FSC é mestrando do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, UFRGS. SPC, LRR, MTO, APMV são estagiários de Iniciação Científica. WMEDB é professora da Universidade Federal de Goiás e ACF da UFRGS. PMR é professor da UFRGS e pesquisador do CNPq.

Referências

Bitsch V. 1978. The P24/37 modification of the infectious bovine rhinotracheitis virus-serum neutralization test. *Acta Veterinaria Scandinavica* 19(1):497-505.

Carrillo B.J., Ambrogi A., Schudel A.A., Vazquez M., Dahme E. & Pospichil A. 1983. Meningoencephalitis caused by IBR virus in calves in Argentina. *Zentralblatt fur Veterinarmedizin B* 30:327-332.

D'Arce R.C.F., Almeida R.S., Silva T.C., Franco A.C., Spilki F.R., Roehe P.M. & Arns C.W. 2002. Restriction endonuclease and monoclonal antibody analysis of Brazilian isolates of bovine herpesviruses types 1 and 5. *Veterinary Microbiology* 88(4):315-324.

Del Fava C., De Stefano E, Pituco E.M., Bilynskyj M.C.V., Okuda L.H., Pozzi C.R., Veríssimo C.J. & Demarchi J.J.A.A. 1998. Erradicação do herpesvírus bovino-1 (BHV-1) de um rebanho bovino leiteiro em manejo semi-intensivo. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 18(2):61-68.

Deregt D., Cho H.J.C. & Kozub G.C. 1993. A comparative evaluation of two sensitive serum neutralization tests for bovine herpesvirus-1 antibodies. *Canadian Journal of Veterinary Research* 57:56-59.

Flores, E. 1999. Diagnóstico virológico. **Apostila**. 62p.

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

Franco A.C., Rijsewijk F., Flores E.F., Weiblein R. & Roehe P.M. 2002. Construction and characterization of a glycoprotein E deletion mutant of bovine herpesvirus type 1.2 strain isolated in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* 33:274-278.

Halfen D.C. & Vidor, T. 1998. Infecção por herpesvírus bovino 1 e herpesvírus bovino 5. In: RIET-CORREA F. Et al. *Doenças de Ruminantes e Equinos*. Universitária/UFPEL:82-91.

Landis J.R. & Koch G.G. 1977. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 33:159-174.

Mackinnon A. 2000. A spreadsheet for the calculation of comprehensive statistics for the assessment of diagnostic tests and inter-rater agreement. *Computers in Biology and Medicine* 30(3):127-134.

Madin S.H., York C.J. & Mckercher D.G. 1956. Isolation of the infectious bovine rhinotracheitis virus. *Science* 129(1):721-722.

Metzler A.E., Matile H., Gassmann U., Engels M. & Wyler R. 1985. European isolates of bovine herpesvirus 1: a comparison of restriction endonuclease sites, polypeptides, and reactivity with monoclonal antibodies. *Archives of Virology* 85:57-69.

Miller J.M. 1991. The effects of IBR virus infections on reproductive function of cattle. *Veterinary Medicine* 86(1):95-98.

Miller J.M., Whetstone C.A. & Van der Maaten M.J. 1991. Abortifacient property of bovine herpesvirus type 1 isolates that represent three subtypes determined by restriction endonuclease analysis of viral DNA, *American Journal of Veterinary Research* 52:458-461.

Paul J. 1970. *Cell and tissue cultures*. 4^a ed.: E.e S. Livingstone, London.

Rocha M.A., Gouveia A.M.G., Lobato Z.I.P. & Leite R.C. 2001. Pesquisa de anticorpos para IBR em amostragem de demanda no Estado de Minas Gerais, 1990-1999. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 53(6):645-647.

Roehe P.M., Silva T.C., Nardi N.B., Oliveira L.G. & Rosa J.C.A. 1997. Diferenciação entre os vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (BHV-1) e vírus da encefalite bovina (BHV-5) com anticorpos monoclonais. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 17(1):41-44.

Roizmann B. & Pellett P.E. 2007. The family Herpesviridae: a brief introduction, p. 2480-2497. In: Knipe, M.D. & Howley, P.M. *Field's Virology*. 5^a ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.

Smith G.A., Young P.L. & Reed K.C. 1995. Emergence of a new bovine herpesvirus 1 strain in Australian feedlots. *Archives of Virology* 140:599-603.

Souza V.F., Melo S.V., Esteves P.A., Schmidt C.S., Gonçalves D.A., Schaefer R., Silva, T.C., Almeida R.S., Vicentini F., Franco A.C., Oliveira E.A., Spilki F.R., Weiblein R., Flores E.F., Lemos R.A., Alfieri A.A., Pituco E.M. & Roehe P.M. 2002. Caracterização de herpesvírus bovinos tipos 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5) com anticorpos monoclonais. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 22(1):13-18.

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.

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.

Vieira S., Brito W.M.E.D., Souza W.J., Alfaia B.T. & Linhares D.C.L. 2003. Anticorpos para o herpesvírus bovino 1 (bhv-1) em bovinos do estado de Goiás. *Ciência Animal Brasileira* 4(2):131-137.

Zar J. H. 1999. *Biostatistical analysis*. 4^a Ed. Upper Saddle River, Prentice Hall.

Anexos

Tabela 1 Detecção de amostras soropositivas frente à combinação dos resultados de diferentes SN realizadas com amostras de soros bovinos (n = 810).

Cepa viral	Amostras do Rio Grande do Sul	Amostras de Goiás	Total
	Total de positivos e sensibilidade máxima alcançada	Total de positivos e sensibilidade máxima alcançada	Total de positivos e sensibilidade máxima alcançada
LA (BoHV-1.1)	115 (70,5%#)	116 (70,7%)	231 (70,6%)
EVI123* (BoHV-1.1)	106 (65%)	110 (67,1%)	216 (66,1%)
SV265** (BoHV-1.2a)	68 (41,7%)	126 (76,8%)	194 (59,3%)
EVI88*** (BoHV-5a)	80 (49%)	124 (75,6%)	204 (62,4%)
A663 (BoHV-5b)	116 (71,1%)	134 (81,7%)	250 (76,4%)
ISO95/97**** (BoHV-5c)	92 (56,4%)	129 (78,7%)	221 (67,6%)
LA + EVI123	142 (87,1%)	139 (84,8%)	281 (85,9%)
LA + SV265	124 (76%)	135 (82,3%)	259 (79,2%)
LA+ EVI88	136 (83,4%)	141 (86%)	277 (84,7%)
LA + A663	137 (84%)	142 (86,6%)	279 (85,3%)
LA + ISO95/97/95	127 (78%)	135 (82,3%)	262 (80,1%)
EVI123 + SV265	121 (74,2%)	141 (86%)	262 (80,1%)
EVI123 + EVI88	127 (78%)	146 (89%)	273 (83,5%)
EVI123 + A663	140 (85,9%)	149 (90,9%)	289 (88,4%)
EVI123 + ISO95/97	133 (81,6%)	148 (90,2%)	281 (85,9%)
SV265 + EVI88	105 (64,4%)	145 (88,4%)	250 (76,4%)
SV265 + A663	122 (74,8%)	140 (85%)	262 (80,1%)
SV265 + ISO95/97	105 (64,4%)	139 (84,8)	244 (74,6%)
EVI88 + A663	132 (81%)	149 (91%)	281 (85,9%)
EVI88 + ISO95/97	112 (68,7%)	146 (89%)	258 (78,9%)
A663 + ISO95/97	122 (74,8%)	142 (87%)	264 (80,7%)
LA + EVI123 + SV265	145 (88,9%)	147 (89,6%)	292 (89,3%)
LA + EVI123 + EVI88	151 (92,6%)	154 (93,9%)	305 (93,3%)
LA + EVI123 + A663	155 (95%)	154 (93,9%)	309 (94,5%)
LA + EVI123 + ISO95/97	148 (90,8%)	150 (91,5%)	298 (91,1%)
LA + SV265 + EVI88	141 (86,5%)	149 (90,9%)	290 (88,7%)
LA + SV265 + A663	140 (85,9%)	145 (88,4%)	285 (87,2%)
LA + SV265 + ISO95/97	131 (80,4%)	142 (86,6%)	273 (83,5%)
LA + EVI88 + A663	150 (92%)	152 (92,7%)	302 (92,3%)
LA + EVI88 + ISO95/97	140 (85,9%)	148 (90,2%)	288 (88,1%)
LA + A663 + ISO95/97	137 (84%)	145 (88,4%)	282 (86,3%)
EVI123 + SV265 + EVI88	135 (82,2%)	155 (94,5%)	290 (88,7%)
EVI123 + SV265 + A663	143 (87,7%)	151 (92,1%)	294 (89,9%)
EVI123 + SV265 + ISO95/97	135 (82,8%)	150 (91,5%)	285 (87,2%)
EVI123 + EVI88 + A663	148 (90,8%)	159 (97%)	307 (93,9%)
EVI123 + EVI88 + ISO95/97	141 (86,5%)	158 (96,3%)	299 (91,4%)
EVI123 + A663 + ISO95/97	144 (88,3%)	154 (93,4%)	298 (91,1%)
EVI88 + A663 + ISO95/97	138 (84,7%)	151 (92,1%)	289 (88,4%)
LA + EVI123 + SV265 + EVI88	154 (94,5%)	159 (97%)	313 (95,7%)
LA + EVI123 + SV265 + A663	156 (95,7%)	155 (94,5%)	311 (95,1%)
LA + EVI123 + SV265 + ISO95/97	149 (91,4%)	152 (92,7%)	301 (92%)
EVI123 + SV265 + EVI88 + A663	151 (92,6%)	160 (97,6%)	311 (95,1%)
EVI123 + SV265 + EVI88 + ISO95/97	143 (87,7%)	159 (97%)	302 (92,3%)

SV265 + EVI88 + A663 + ISO95/97	140 (85,9%)	153 (93,3%)	293 (89,6%)
LA + SV265 + EVI88 + A663	152 (93,2%)	154 (93,9%)	306 (93,6%)
LA + SV265 + A663 + ISO95/97	140 (85,9%)	148 (90,2%)	288 (88,1%)
EVI123 + SV265 + A663 + ISO95/97	145 (89%)	155 (94,5%)	300 (91,7%)
LA + EVI123 + EVI88 + A663	162 (99,4%)	162 (98,8%)	324 (99,1%)
LA + EVI123 + EVI88 + ISO95/97	155 (95%)	160 (97,6%)	315 (96,3%)
LA + EVI123 + A663 + ISO95/97	155 (95%)	156 (95,1%)	311 (95,1%)
EVI123 + EVI88 + A663 + ISO95/97	152 (93,2%)	161 (98,2%)	313 (95,7%)
LA + EVI123 + SV265 + EVI88 + A663	163 (100%)	163 (99,4%)	326 (99,7%)
LA + EVI123 + SV265 + EVI88 + ISO95/97	156 (95,7%)	163 (99,4%)	319 (97,5%)
LA + EVI123 + SV265 + A663 + ISO95/97	156 (95,7%)	157 (95,7%)	313 (95,7%)
LA + EVI123 + EVI88 + A663 + ISO95/97	162 (99,4%)	163 (99,4%)	325 (99,4%)
LA + SV265 + EVI88 + A663 + ISO95/97	152 (93,3%)	155 (94,5%)	307 (93,9%)
EVI123 + SV265 + EVI88 + A663 + ISO95/97	153 (93,9%)	162 (98,8%)	315 (96,3%)
LA + EVI123 + SV265 + EVI88 + A663 + ISO95/97	163 (100%)	164 (100%)	327 (100%)

* 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).

percentagem de positivos detectados em relação ao total acumulado frente a todas as cepas virais analisadas (163 – 100%)

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.

Tabela 3 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*	0,64	boa
BoHV-1.1 X BoHV-1.2a	LA X SV265**	0,70	boa
BoHV-1.1 X BoHV-5a	LA X EVI88***	0,63	boa
BoHV-1.1 X BoHV-5b	LA X A663	0,77	boa
BoHV-1.1 X BoHV-5c	LA X ISO95****	0,78	boa
BoHV-1.1 X BoHV-1.2a	EVI123 X SV265	0,63	boa
BoHV-1.1 X BoHV-5a	EVI123 X EVI88	0,59	moderada
BoHV-1.1 X BoHV-5b	EVI123 X A663	0,66	boa
BoHV-1.1 X BoHV-5c	EVI123 X ISO95	0,61	boa
BoHV-1.2a X BoHV-5a	SV265 X EVI88	0,67	boa
BoHV-1.2a X BoHV-5b	SV265 X A663	0,75	boa
BoHV-1.2a X BoHV-5c	SV265 X ISO95	0,76	boa
BoHV-5a X BoHV-5b	EVI88 X A663	0,67	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	0,80	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 (Landis & Koch 1977)

CAPÍTULO 2

Prevalência e fatores de risco associados à infecção por herpesvírus bovinos tipo 1 e 5 no Estado do Rio Grande do Sul – Brasil

Autores:

Holz, C.L.¹; Cibulski, S.P.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; Dasso, M.G.³; Cenci, A.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 Sarmiento Leite 500 sala 208, CEP 90050-170.

3. Laboratório de Brucelose, Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), Estrada do Conde 6000, Eldorado do Sul, RS. 92990-000.

*Endereço para correspondência: Caixa Postal 2076, Porto Alegre, RS, Brasil, CEP 90 001 970. Tel.: 51. 3481 37 11. Fax: 51.3481 33 37

*E-mail: proehe@gmail.com

Trabalho em preparação

Abstract

The aim of this study was to estimate the prevalence of bovine with serum antibodies against bovine herpesvirus type 1 and 5 (BoHV-1 and BoHV-5) and the potential risk factors that contribute to the virus spread in the Rio Grande do Sul state, Brazil. The sera here analysed were part of the overall samples collected in the National Program of Animal Brucellosis and Tuberculosis Eradication (NPABTE). All samples were collected from cows of dairy or beef herds, aging 24 months or older and not vaccinated against infectious bovine rhinotracheitis (IBR). The number of samples was calculated based on prevalence of 33%, and with an average standard deviation of $\leq 1\%$ with a limit of agreement of 95%. The serum samples of 2,200 bovines, from 390 farms distributed in 158 cities of Rio Grande do Sul state, were submitted to serum neutralization tests against BoHV-1.1 (EVI123/98 and Los Angeles strain), BoHV-5b (A663 stain) and BoHV-5a (EVI88/95 stain). These strains were chosen since previous experiments revealed that such combination was found most efficacious in detecting seropositive animals. Data about animals and farms sampled were filled in a form and the risk factors were analysed, such as: last year of reported abortion, kind of exploration and management, kind and number of daily milking, artificial insemination, predominant cattle breed, presence of sheep, goats or wild animals, commercialization of animals for reproductive purposes, use of pre and post-parturition paddocks and veterinary assistance. The overall seroprevalence of BoHV-1 and BoHV-5 in the bovine herd of Rio Grande do Sul state was 29.2% (642/ 2,200). The following factors were considered as contributing to spread of the virus (residual adjustment $>+1.96$): the type of exploitation (beef cattle $>$ dairy), milking, concomitant presence of sheep, goats or wild animals in farm, sale of animals for reproductive purposes, use of pre and post-parturition paddocks, use of private veterinary assistance and farming of European beef breeds. The results obtained show that antibody anti-BoHV-1 and anti-BoHV-5 are largely spread in the dairy and beef herds of Rio Grande do Sul state, although the levels of prevalence in distinct geographic regions were different. However, once this assay does not distinguish type-specific antibodies against BoHV-1 or 5, the actual prevalence of type-specific infections remains unknown.

Key-words: bovine herpesvirus type 1, bovine Herpesvirus type 5, epidemiology, risk factors.

Resumo

Este estudo objetivou estimar a prevalência de bovinos com anticorpos contra os herpesvírus bovinos tipos 1 e 5 (BoHV-1 e BoHV-5) e determinar os potenciais fatores de risco para a infecção em rebanhos bovinos no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. As amostras de soro utilizadas no presente estudo foram um extrato da amostragem coletada para o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBTA), correspondendo a soros de bovinos adultos (>24 meses), fêmeas de corte e leite, não vacinadas contra a Rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR). O cálculo amostral foi baseado em uma expectativa de prevalência geral de 33%, considerando-se um erro padrão da média não superior a 1% e um intervalo de confiança de 95%. Amostras de soros de 2200 bovinos, provenientes de 390 propriedades e 158 municípios do Estado do Rio Grande do Sul, foram analisadas na busca de anticorpos contra BoHV-1 e BoHV-5 pela técnica de soroneutralização (SN), executada frente a quatro cepas de vírus distintas EVI123/98 e Los Angeles (BoHV-1.1); EVI88/95 (BoHV-5a) e A663 (BoHV-5b). Estas cepas foram escolhidas, pois em estudo prévio demonstraram detectar grande número de amostras soropositivas. Informações sobre os animais e propriedades amostradas foram registradas em questionários e os seguintes fatores foram avaliados como possíveis fatores de risco para essas infecções: ocorrência de aborto no último ano, tipo de exploração, tipo de criação, tipo e quantidade de ordenhas por dia, uso de inseminação artificial, raça predominante na propriedade, compra e venda de reprodutores, presença de ovinos, caprinos e animais silvestres na propriedade, utilização de piquete de parto/pós-parto e uso de assistência veterinária. A soroprevalência média para BoHV-1 e BoHV-5 nos rebanhos gaúchos foi de 29,2% (642/2200). Os seguintes fatores foram considerados como de risco para essas infecções (ajuste padronizado residual >+1,96): tipo de exploração corte, não ordenhar os animais, presença concomitante dos bovinos com ovinos/caprinos e animais silvestres, venda de animais de reprodução, uso de piquetes de parto/pós-parto, uso de assistência veterinária privada e criação de bovinos de raças européias de corte. Os resultados obtidos demonstram que anticorpos anti-BoHV-1 e anti-BoHV-5 encontram-se presentes nos rebanhos de corte e leite de todo o Estado do Rio Grande do Sul, embora em diferentes níveis de prevalência em distintas mesorregiões. Entretanto, a prevalência verificada ainda não permite discriminar infecções tipo-específicas, pelo que a real prevalência de infecções por BoHV-1 e BoHV-5 permanece desconhecida.

Termos de Indexação: herpesvírus bovino tipo 1, herpesvírus bovino tipo 5, epidemiologia, fatores de risco

Introdução

Os herpesvírus bovinos tipos 1 (BoHV-1) e 5 (BoHV-5) são membros da família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*, gênero *Varicellovirus* (Roizmann & Pellett 2007, Thiry et al. 2007). São importantes agentes infecciosos responsáveis por causarem significativas perdas econômicas na bovinocultura (Hage et al. 1996). O BoHV-1 tem sido associado a diversas manifestações clínicas em bovinos, incluindo Rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), Vulvovaginite pustular/Balanopostite pustular infecciosa (IPV/IPB), abortos e infecções generalizadas em neonatos (Gibbs & Rweyemamu 1977, Franco & Roehe 2007). Ocasionalmente, o BoHV-1 pode ser detectado no sistema nervoso central (SNC) de bovinos, podendo ou não estar relacionado a casos de doença neurológica (Silva et al. 2007). O BoHV-5, por sua vez, é o agente etiológico da Encefalite herpética bovina (Murphy et al. 1999, Roizmann & Pellett 2007), embora possa também induzir sinais de doença respiratória (Schudel et al. 1986, Hübner et al. 2005) e estar igualmente presente no trato genital de bovinos (Esteves et al., 2003; Gomes et al., 2003).

Como todos os alfa herpesvírus, após a infecção aguda, tanto o BoHV-1 como o BoHV-5 permanecem em latência, alojando-se em gânglios sensoriais (Jones 2003). O estabelecimento da latência e eventuais reativações representam pontos-chave na biologia dos herpesvírus, pois permitem a permanência indefinida do vírus nos hospedeiros, com episódios esporádicos de reativação e disseminação viral, determinando assim, a perpetuação da infecção nos rebanhos (Thiry et al. 1985, Franco & Roehe 2007).

O BoHV-1 tem distribuição mundial amplamente avaliada e a sua prevalência em rebanhos bovinos atinge taxas variadas em diferentes regiões (Straub 2001). Já o BoHV-5 possui uma distribuição geográfica aparentemente mais restrita. São raros os relatos de BoHV-5 no hemisfério Norte (D'Offay et al. 1993, D'Arce et al. 2002). No Brasil, as evidências obtidas indicam que é alta a prevalência de infecções por BoHV-1; porém, ainda não é possível determinar que percentagem de animais soropositivos para BoHV-1 foi de fato infectada com BoHV-5, (ou por ambos). Isso se verifica porque, sorologicamente, ainda não é clara a diferenciação entre infecções com BoHV-1 e BoHV-5, pois, a prevalência tipo-específica permanece indeterminada.

Até o presente, que seja do conhecimento dos autores, todos os estudos de soroprevalência de herpesvírus bovinos realizados no País foram executados somente

frente a cepas de BoHV-1. Apesar disso, os diversos trabalhos realizados revelaram taxas de soroprevalência muito variáveis e não se detiveram no exame da parcela de animais soronegativos para BoHV-1, mas potencialmente soropositivos para BoHV-5 (Lovato et al. 1995, Vidor et al. 1995, Lage et al. 1996, Melo et al. 1997, Cerqueira et al. 2000, Vieira et al. 2003, Barbosa et al. 2005)

Além disso, os estudos de soroprevalência para BoHV-1 foram realizados somente frente a uma determinada cepa de vírus, esta normalmente uma amostra “clássica” de BoHV-1 (Cerqueira et al. 2000, Médici et al. 2000, Barbosa et al. 2005, Okuda et al. 2006). No Rio Grande do Sul, os levantamentos realizados indicam grandes diferenças nas taxas de soroprevalência encontradas (Ravazzolo et al. 1989, Lovato et al. 1995, Poletto et al. 2004) e estas diferenças podem estar associadas à cepa viral utilizada para desafio nos testes de diagnósticos; no entanto, este parâmetro nunca foi anteriormente questionado. Entretanto, estudos recentes em nosso laboratório evidenciaram que a soroprevalência pode ser significativamente afetada pelo uso de cepas de vírus distintas (Dados não publicados).

O objetivo desse estudo foi estimar a soroprevalência das infecções por BoHV-1 e BoHV-5 no Estado do Rio Grande do Sul frente a uma combinação de diferentes cepas destes agentes, objetivando detectar animais soropositivos com maior eficácia e maior sensibilidade. Para tanto, foram utilizadas quatro cepas de herpesvírus bovinos, em testes sobre 2200 soros de fêmeas bovinas adultas (>24 meses) não vacinadas contra BoHV-1 ou BoHV-5. Além disso, buscou-se determinar alguns dos potenciais fatores de risco que poderiam estar associados a essas infecções.

Material e Métodos

Amostragem e coleta de dados

O presente estudo foi realizado utilizando amostras coletadas para fins de levantamentos epidemiológicos do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBTA). Amostras de soro de 17528 animais haviam sido colhidas entre dezembro de 2004 e fevereiro de 2005 para os levantamentos epidemiológicos do PNCEBTA. O cálculo amostral havia sido baseado em uma expectativa de prevalência de brucelose de 0,3%, verificada no ano de 1986 (Paulin & Neto 2002, Poester et al. 2002). As amostras foram colhidas de fêmeas

bovinas adultas (>24 meses), de todos tipos de exploração representantes de 490 municípios do Estado do Rio Grande do Sul, perfazendo-se um total de 2054 propriedades. De cada propriedade foram coletadas de 1 a 15 amostras de soro. 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.

Posteriormente, sobre estas amostras de soro foi efetuado um novo cálculo amostral, baseado em uma expectativa de prevalência de infecções por BoHV-1 e BoHV-5 da ordem de 33%, prevalência esta estimada com base em um estudo piloto prévio (Dados não publicados). Considerando-se um erro padrão não superior a 1% e um intervalo de confiança de 95%, estimou-se um número mínimo de 2178 amostras. Além disso, para que o número de amostras fosse mais representativo do Estado, a partir da amostragem inicial disponível foi preparado um extrato contendo o número de amostras de soro proporcionalizado ao tamanho do rebanho de cada meso/microrregião do RS. Assim, o número de amostras a serem examinadas foi determinado com base nos dados estimados pelo IBGE a respeito da população bovina do RS (IBGE, 2006). Portanto, o RS foi subdividido em 7 mesorregiões e 35 microregiões (Tabela 1), das quais foram selecionadas 2200 amostras, escolhidas aleatoriamente dentre os soros de animais não vacinados contra herpesvírus bovinos. Das 390 propriedades pertencentes a 158 municípios do RS foram selecionados de 1 a 15 soros aleatoriamente.

Os dados constantes nos questionários preenchidos pelos pecuaristas por ocasião da coleta de amostras para o PNCEBTA foram analisados na busca de correlações com a presença ou ausência de infecções por BoHV-1 ou BoHV-5. Os seguintes fatores foram avaliados: ocorrência de aborto nos últimos 12 meses, tipo de exploração, tipo de criação, tipo e quantidade de ordenhas por dia, uso de inseminação artificial (IA), raça predominante na fazenda, presença concomitante de ovinos, caprinos e/ou animais silvestres na propriedade, compra e/ou venda de reprodutores, utilização de piquetes de parto/pós-parto e uso de assistência veterinária.

Vírus e células

As cepas de vírus e células foram obtidas dos estoques do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF). Para a sorologia foram utilizadas células de rim de bovino *Madin Darby Bovine Kidney* (MDBK, originária da ATCC; CCL-22) cultivadas em meio mínimo essencial de Eagle (MEM; Gibco) suplementadas com 10% de soro fetal bovino (SFB; Soraly) e antibióticos (Penicilina e Streptomina) em

concentrações usuais (Paul, 1970). Todos os meios e soros foram previamente testados por tentativa de isolamento viral em cultivos celulares (Halfen & Vidor 1998, Flores 1999, Franco & Roehe 2007) para assegurar a ausência de vírus da diarreia viral bovina (BVDV) e herpesvírus bovinos. As células foram tripsinizadas a cada 3-4 dias e cultivadas seguindo métodos usuais (Paul 1970).

As cepas de vírus utilizadas foram selecionadas em função de haverem sido as que detectaram com maior eficácia e sensibilidade um grande número de animais soropositivos em testes prévios (dados não publicados). Estas foram: Los Angeles – LA (BoHV-1.1; Madin et al. 1956), EVI123/98 (BoHV-1.1; Roehe et al. 1997, Souza et al. 2002), A663 (BoHV-5b; Carrillo et al. 1983, D'Arce et al. 2002) e EVI88/95 (BoHV-5a; Roehe et al. 1997, Souza et al. 2002). A multiplicação e titulação das cepas virais foram realizadas em células MDBK como descrito previamente (Roehe et al. 1997).

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, como descrito previamente (Deregt et al. 1993). Os testes foram repetidos frente a cada uma das quatro cepas virais, utilizando-se em cada teste 100 doses infectantes para 50% dos cultivos celulares (DICC₅₀).

Análise estatística

Para avaliar os fatores de risco potencialmente associados às infecções, os dados foram analisados no programa SPSS, sendo determinadas as frequências para as variáveis trabalhadas, as prevalências e a ocorrência de associações entre possíveis fatores de risco e a soropositividade às infecções. O teste estatístico utilizado foi o teste do qui quadrado (χ^2) (Agresti 1992), complementado pelo teste de resíduo padronizado ajustado (Adj) (Anscombe & Tukey 1963; Oliveira 2000). Como o resíduo padronizado ajustado segue uma distribuição normal padronizada, sempre que o seu valor for maior que +1,96 ou menor do que -1,96 ele determina associação significativa entre a categoria analisada e a de soropositividade ou soronegatividade (Oliveira 2000).

Resultados e Discussão

O presente trabalho, teve como objetivo determinar a prevalência das infecções por BoHV-1 e BoHV-5 no Estado do Rio Grande do Sul levando em conta as diferenças previamente observadas em testes de SN realizados frente a diferentes cepas de vírus, de forma que pudesse ser detectado o maior número possível de animais soropositivos (dados não publicados). Dentre os 2200 soros bovinos examinados, 29,2% (642) foram positivos frente a pelo menos uma das quatro cepas de vírus utilizadas nos testes de SN. Como pode ser observado na tabela 2, a diferença nos resultados dos testes de SN frente às diferentes cepas de vírus mostrou-se bastante importante, variando em até 10,1% dependendo da cepa viral considerada. Esse fato é de importância crítica no delineamento de estratégias de controle ou erradicação, onde, idealmente, a detecção de todos os animais soropositivos deve ser almejada.

No Brasil, levantamentos sorológicos realizados em várias regiões do País têm demonstrado alta frequência de animais e rebanhos soropositivos (Galvão et al. 1963, Wizigmann et al. 1972, Mueller et al. 1981, Ravazzolo et al. 1989, Lovato et al. 1995, Vidor et al. 1995). Da mesma forma, os estudos de prevalência dessas infecções no Estado do Rio Grande do Sul apresentam taxas de soropositividade que variam muito de um estudo para outro, sendo que os índices de prevalência encontrados variam de 18,8% a 81,75% (Wizigmann et al. 1972, Ravazzolo et al. 1989, Lovato et al. 1995, Vidor et al. 1995, Poletto et al. 2004). As diferenças encontradas podem ser apontadas como sendo consequência do tipo de população bovina estudada, como é o caso do trabalho realizado por Lovato et al. (1995) que avaliaram apenas gado de leite, ou do trabalho de Vidor et al. (1995) que testaram apenas amostras de gado de corte de propriedades com histórico de problemas reprodutivos. Além disso, nosso trabalho, diferentemente dos anteriores, baseou seu cálculo amostral em função de dados do IBGE (2006) referentes à população bovina por meso e microrregiões do Estado (Wizigmann et al. 1972, Ravazzolo et al. 1989, Poletto et al. 2004). Portanto, as heterogeneidades regionais de cada estudo podem influenciar nas taxas de prevalência encontradas. Além disso, nosso trabalho refere-se apenas a amostras de fêmeas adultas (>24 meses), pois as amostras foram assim coletadas para o PNCEBTA, além disso, essas infecções têm reflexos importantes na reprodução, através de manifestações como reabsorção embrionária, retorno ao cio, queda na produção leiteira e outros fatores onde a fêmea tem papel

crucial. Quincozes (2005) observou que fêmeas adultas apresentam menores índices de soropositividade do que machos adultos. Dias (2006) verificou que o papel do macho soropositivo é essencial na disseminação da infecção, em particular onde é utilizada a monta natural, ou IA seguida de “repasso” pelo touro. Portanto, os resultados anteriores dos levantamentos epidemiológicos realizados no RS não podem ser considerados como reflexo da situação da infecção no Estado devido ao pequeno número de amostras analisadas ou por representarem grupos populacionais específicos (Wizigmann et al. 1972, Ravazzolo et al. 1989, Lovato et al. 1995, Vidor et al. 1995, Poletto et al. 2004).

No presente estudo foi detectada uma média geral de 29,2% de animais positivos frente a pelo menos uma das cepas virais analisadas. Do total de 390 propriedades testadas contra o BoHV-1 e 5, foram encontrados animais reagentes em 225 (57,7%). Essa taxa de propriedades contendo animais soropositivos aproxima-se de valores encontrados em outros estudos, como o de Lovato et al. (1995), onde 54,5% das propriedades apresentavam animais soropositivos. No entanto, Vidor et al. (1995) e Poletto et al. (2004) encontraram índices mais altos, sendo respectivamente de 80% e 92,85%. Com relação aos municípios analisados, 101 dos 158 (63,9%) municípios apresentavam pelo menos uma propriedade com animais positivos, este índice está abaixo dos encontrados por Lovato et al. (1995) e Vidor et al. (1995) que detectaram 91,9% e 80%, respectivamente. Da mesma forma que para as diferenças nos índices de prevalência, a variação nos valores encontrados para propriedades e cidades positivas pode se dar pela diferença das técnicas, da amostragem e dos rebanhos utilizados nos trabalhos, pois Lovato et al. (1995) avaliaram somente propriedades de gado leiteiro do RS, enquanto Vidor et al. (1995) trabalharam somente com amostras provenientes de rebanhos com problemas reprodutivos e Polleto et al. (2004) avaliaram somente propriedades do município de Passo Fundo.

Como pode-se perceber na tabela 2, ao utilizar-se apenas uma cepa viral a prevalência encontrada foi reduzida. A cepa que isoladamente reconheceu o maior número de soros positivos nesse estudo foi a amostra EVI123/98 (BoHV-1.1), uma cepa autóctone, isolada de um caso de Rinotraqueíte infecciosa bovina (Roehe et al. 1997, Souza et al. 2002). Essa cepa foi capaz de detectar 79,5% (511/642) das amostras de soro que se mostraram positivas frente a pelo menos uma das quatro cepas virais analisadas. Apesar disso, se utilizada como única cepa de teste, não seriam detectados 131 animais (20,4%) que foram soropositivos frente às demais cepas. A não detecção de amostras soropositivas equivale à não detecção de animais potencialmente

disseminadores da infecção, o que pode comprometer seriamente eventuais programas de erradicação e controle. Como tais programas são usualmente baseados em testes sorológicos periódicos e eliminação dos animais positivos, a eficácia na identificação de soropositivos é crítica no processo (Ackermann et al. 1990, Del Fava et al. 1998).

Em estudos sorológicos prévios realizados no Brasil, uma cepa “clássica” de BoHV-1, freqüentemente a amostra LA (Vidor et al. 1995, Cerqueira et al. 2000, Médici et al. 2000, Rocha et al. 2001) era utilizada. No presente estudo, os resultados obtidos com a amostra LA isoladamente revelaram uma soroprevalência de 21,9% (482 amostras positivas). Portanto, 160 animais (24,9%) seriam considerados negativos, embora positivos frente aos demais (Tabela 2). O mesmo problema poderia ser detectado se fosse utilizada somente a amostra A663 (BoHV-5b) ou EVI88/95 (BoHV-5a) (Tabela 2), onde um elevado número de bovinos positivos seriam considerados sorologicamente negativos. Indubitavelmente, esse tipo de fenômeno pode vir a comprometer estratégias de controle e erradicação desses herpesvírus, sejam elas dirigida a controlar a infecção em uma propriedade, uma região, ou em um Estado, ou País.

Nas diferentes mesorregiões do Estado, podem ser percebidas diferenças significativas nas prevalências (Figura 1). A mesorregião que apresentou maior soroprevalência foi a Nordeste Rio-grandense, seguida da Metropolitana de Porto Alegre. A alta taxa encontrada pela mesorregião Sudoeste do RS, que foi de 32,5% (243/747), talvez possa ser em parte explicada, pelo fato dos municípios desta mesorregião fazerem fronteira com a Argentina e o Uruguai. Na Argentina, em estudos soroepidemiológicos realizados em várias regiões do país, determinou-se que 100% das propriedades possuíam animais soropositivos, com prevalência entre 32,3% e 56,7% (Odeon 1998). No Uruguai, uma pesquisa soroepidemiológica revelou uma prevalência de anticorpos para BHV-1 de 37% e determinou que 99% dos rebanhos pesquisados tinham pelo menos a presença de um animal soropositivo (Guarino et al. 2008). Além disso, esses países utilizam vacinação contra IBR e existe facilidade na introdução de produtos biológicos através dessas fronteiras (Lovato et al. 1995). As mesorregiões Noroeste e Centro Oriental, assim como o Sudeste Rio-grandense apresentaram índices abaixo da média do estado (Figura 1). Lovato et al. (1995) ao analisarem a região de Passo Fundo encontraram valores de prevalência em torno de 12%, sendo a região que apresentou os menores índices na ocasião de seu estudo. A região de Passo Fundo situa-se na mesorregião Noroeste Rio-grandense, a qual apresentou coeficiente de

soropositividade de 19,6%, um dos menores índices encontrados em nosso estudo. As diferenças nas taxas de prevalência para as diferentes mesorregiões do RS podem ser explicadas provavelmente devido a forma como os animais são criados e manejados nestas diferentes mesorregiões. Além disso, fatores climáticos e geográficos também podem influenciar nestas diferenças encontradas.

No que diz respeito às variáveis analisadas como prováveis fatores de risco associados à infecção, o tipo de criação, o uso de inseminação artificial, a compra de animais de reprodução e a ocorrência de aborto nos últimos 12 meses não apresentaram significância estatística ($p > 0,05$) na prevalência de BoHV-1 e 5. Os achados em nosso trabalho com relação à IA corroboram com os achados por Van Schaik et al. (1998) que também analisaram esta variável como possível fator de risco para o BoHV-1. No trabalho de Barbosa et al. (2005) que avaliaram os mesmos possíveis fatores de risco para as infecções por BoHV-1 e 5, nenhuma das variáveis analisadas apresentou-se como fator de risco para estes agentes. No entanto, nos trabalhos de Thibier & Guerin (2000) e Quincozes (2005) foi relatado que o uso de IA é um fator de risco para essas infecções. Com relação a ocorrência de aborto, acredita-se que os resultados encontrados tenham sido, em parte, consequência do pequeno número de respostas dadas neste item, além disso, grande parte dos proprietários disseram não saber da ocorrência ou não de abortos nos últimos 12 meses.

Dentre os outros fatores analisados estatisticamente como possíveis fatores de risco ou proteção o tipo e a quantidade de ordenhas por dia, as mesorregiões, o tipo de exploração, o uso de assistência veterinária, a venda de animais de reprodução, o uso de piquetes de parto/pós-parto, a presença concomitante de ovinos/caprinos e de animais silvestres e a raça predominante nas fazendas apresentaram significância estatística ($p < 0,05$) com relação às infecções pelos BoHV-1 e BoHV-5 (Tabela 3). Podemos perceber que as mesorregiões Centro Oriental e Noroeste Rio-grandense, assim como, a ordenha manual de 2 a 3 vezes ao dia, o tipo de exploração leite e mista, o uso de assistência veterinária de veterinários que trabalham para cooperativas, não vender animais de reprodução, não usar piquetes de parto/pós-parto, criar animais zebus, não possuir nas fazendas a criação concomitante de ovinos/caprinos e não permitir o contato dos bovinos com animais silvestres são fatores que apresentaram-se como de proteção para essas infecções (Resíduos ajustados significativos negativos). Por outro lado, a mesorregião Sudoeste Rio-grandense, não ordenhar os animais, o tipo de exploração corte, o uso de assistência veterinária privada, a venda de animais de reprodução, o uso

de piquete de parto/pós-parto, a criação de animais de raças europeias de corte e a presença concomitante de ovinos/caprinos e animais silvestres mostraram-se como fatores de risco (Resíduos ajustados significativos positivos) para as infecções causadas pelo BoHV-1 e 5 (Tabela 3).

Alguns resultados inesperados e até mesmo surpreendentes foram encontrados. O tipo de exploração leite apresentou-se como fator de proteção em nosso trabalho. No entanto, normalmente este tipo de criação propicia maior contato entre os animais, o que poderia facilitar a transmissão dos BoHV-1 e BoHV-5. Assim como, poderíamos esperar que a ordenha fosse um fator de risco para essas infecções, por também propiciar o aglomeramento dos bovinos, aumentando assim, a probabilidade de transmissão dos vírus. No entanto, a ordenha manual realizada de 2 a 3 vezes ao dia mostrou-se como um fator de proteção para os rebanhos, enquanto que o fato dos animais não serem ordenhados foi considerado um fator de risco. Também esperávamos que a separação dos animais em piquetes de parto/pós-parto fosse um fator de proteção para a infecção, já que nesta fase poderiam reativar e excretar o vírus, devido ao estresse, sendo que a separação, neste caso, impediria a disseminação dos vírus para o restante do rebanho. No entanto, mais uma vez os resultados obtidos não foram os mesmos que os esperados.

O contato de bovinos com algumas espécies animais, mesmo que elas não exerçam papel importante na disseminação do vírus, podem atuar como transmissores mecânicos quando se deslocam de um local a outro dentro e entre propriedades (Van Schaik et al. 1998). Além disso, sabe-se que os BoHV-1 e os BoHV-5 possuem a capacidade de infectar diversas espécies de ruminantes, dentre elas cabras, ovelhas, cervos, entre outros. Essas outras espécies podem apresentar-se como um reservatório alternativo para esses vírus (Six et al. 2001, Keuser et al. 2004, Thiry et al. 2006, Muylkens et al. 2007). Nas análises estatísticas, a presença de ovinos e caprinos nas propriedades mostrou-se como um fator de risco para as infecções pelo BoHV-1 e 5 (Resíduos ajustados significativos positivos) da mesma maneira que a presença e contato dos bovinos com animais silvestres (Resíduos ajustados significativos positivos).

A venda de animais de reprodução em leilões, feiras, exposições, para comerciantes de gado ou diretamente a outras fazendas também apresentou-se como fator de risco. Um dos fatores que talvez possa explicar esse resultado, é o fato de que muitos desses animais são vendidos em exposições, leilões e feiras, que são lugares que

propiciam o aglomeramento dos animais, facilitando a transmissão desses vírus. Além disso, o transporte dos animais para o local dos eventos, assim como para outras fazendas, pode aumentar o nível de estresse dos animais, o que poderia reativar infecções latentes e aumentar ainda mais a disseminação desses agentes (Thiry et al. 1987).

Veterinários, técnicos e tratadores podem ser capazes de transmitir o BoHV-1 e 5 entre os animais através de fluidos nasais e genitais impregnados nas roupas e calçados (Wentink et al. 1993). O uso de roupas exclusivas, fornecidas pela propriedade, pode minimizar o problema e ainda fazer com que um fator de risco converta-se a um fator de proteção (Van Schaik et al. 1998, Van Schaik et al. 2001, Van Schaik et al. 2002). Relacionado a isto, a assistência veterinária também apresentou significância estatística ($p < 0,05$) sendo que um fator curioso foi encontrado em nosso estudo, os índices apontaram a assistência veterinária privada (Resíduos ajustados significativos positivos) como fator de risco e a assistência prestada por veterinários que trabalham para cooperativas como fator de proteção (Resíduos ajustados significativos negativos) às infecções por BoHV-1 e 5. Este fato demonstra que os veterinários privados necessitam ter maiores cuidados na realização de seus trabalhos a campo.

Os resultados encontrados com relação às variáveis analisadas como possíveis fatores de risco nem sempre apresentaram-se como o esperado ou imaginado. Talvez algumas delas possam ser explicadas porque parte da realidade das propriedades analisadas pode não condizer com o relatado nos questionários, devido a algumas incoerências de dados apresentados como resposta ou pelo pequeno número de respostas obtidos para alguns dados, como é o caso das respostas referentes a presença de animais silvestres e também da ocorrência de abortos nos últimos 12 meses. Além disso, os questionários foram aplicados por pessoas diferentes.

Conclusões

Os herpesvírus bovinos tipos 1 e 5 encontram-se difundidos em todo o Estado do Rio Grande do Sul, sendo que os valores encontrados diferenciam-se dependendo das mesorregiões analisadas.

Os principais fatores de risco associados à positividade para os BoHV-1 e 5 foram: tipo de exploração corte, não ordenhar os animais, contato com ovinos/caprinos

e animais silvestres, venda de animais de reprodução, uso de piquetes de parto/pós-parto, uso de assistência veterinária privada e criação de animais de raças européias de corte.

Baseando-se nesse coeficiente de prevalência encontrado e sabendo-se da importância da latência dos herpesvírus bovinos, como forma de perpetuação da doença no rebanho, recomenda-se que sejam tomadas medidas de prevenção e controle dessas enfermidades nos rebanhos do Estado do Rio Grande do Sul.

Agradecimentos

Agradecimentos ao Núcleo de Estatística da Universidade Federal do Rio Grande do Sul pelo auxílio na análise dos dados e ao Instituto de Pesquisas Veterinárias que cedeu as amostras de soros analisadas. Apoio financeiro CNPq, FEPAGRO, FAPERGS, CAPES. CLH, é mestranda; TFT, DD, HBCRB são doutorandos do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). FSC é mestrando do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. SPC, LRR, MTO, APMV são estagiários de Iniciação Científica. ACF é professora da UFRGS. PMR é professor da UFRGS e pesquisador do CNPq.

Referências

Ackermann M., Müller H.K., Bruckner L. & Kihm U. 1990. Eradication of infectious bovine rhinotracheitis in Switzerland: review and prospects. *Veterinary Microbiology* 23:365-370.

Agresti A. 1992. A survey of exact inference for contingency tables. *Statistical Science* 7(1):131-177.

Anscombe F.J. & Tukey W. 1963. The Examination and Analysis of Residuals. *Technometrics* 5(2):141-160.

Barbosa A.C.V.C., Brito W.M.E.D. & Alfaia B.T. 2005. Soroprevalência e fatores de risco para a infecção pelo herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1) no Estado de Goiás, Brasil. *Ciência Rural* 35(6):1368-1373.

Carrillo B.J., Ambrogi A., Schudel A.A., Vazquez M., Dahme E. & Pospichil A. 1983. Meningoencephalitis caused by IBR virus in calves in Argentina. *Zentralblatt für Veterinärmedizin B* 30:327-332.

Cerqueira R.B., Carminati R., Silva J.M., Soares G.C., Meyer R. & Sardi S. 2000. Serological survey for bovine herpesvirus 1 in cattle from different regions in the state of Bahia, Brazil, *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* 37(6):497-500.

D'Arce R.C.F., Almeida R.S., Silva T.C., Franco A.C., Spilki F.R., Roehe P.M. & Arns C.W. 2000. Restriction endonuclease and monoclonal antibody analysis of Brazilian isolates of bovine herpesviruses types 1 and 5. *Veterinary Microbiology* 88(4):315-324.

Deregt D., Cho H.J.C. & Kozub G.C. 1993. A comparative evaluation of two sensitive serum neutralization tests for bovine herpesvirus-1 antibodies. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 57:56-59.

D'Offay J. M., Mock R.E. & Fulton R.W. 1993. Isolation and characterization of encephalitic bovine herpesvirus type 1 isolates from cattle in North America. *American Journal of Veterinary Research* 54(4):534-539.

Dias M.M. 2006. Avaliação do estresse do desmame em bezerros de corte e sua relação com o performance produtivo. Tese de doutorado – Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Esteves P.A., Dellagostin O.A., Pinto L.S., Silva A.P., Spilki F.R., Ciacci-Zanella J.R., Hübner S.O., Puentes R., Maisonnave J., Franco A.C., Rijsewijk F.A.M., Batista H.B.C.R., Teixeira T.F., Dezen D., Oliveira A.P., David C. Arns C.W. & Roehe P.M. 2007. Phylogenetic comparison of the carboxy-terminal region of glycoprotein C (gC) of bovine herpesviruses (BoHV) 1.1, 1.2 and 5 from South America (SA). *Virus Research* 131(1):16-22.

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

- Gibbs E.P.J. & Rweyemamu M.M. 1977. Bovine herpesvirus. Part I. The Veterinary Bulletin. 47(5):317-343.
- Gomes L.I., Rocha M.A., Souza J.G., Costa E.A. & Barbosa-Stancioli E.F. 2003. Bovine herpesvirus 5 (BoHV-5) in bull semen: amplification and sequence analysis of the US4 gene. Veterinary Research Communication. 27(6):495-504.
- Guarino H., Nuñez A., Repiso M.V., Gil A. & Dargatz D.A.. 2008. Prevalence of serum antibodies to bovine herpesvirus-1 and bovine viral diarrhoea virus in beef cattle in Uruguay. Preventive Veterinary Medicine 85(1-2):34-40.
- Hage J.J., Schukken Y.H., Barkema H.W., Benedictus G, Rijsewijk F.A. & Wentink G.H. 1996. Population dynamics of bovine herpes 1 infection in a dairy herd. Veterinary Microbiology 53:169-180.
- Halfen D.C. & Vidor, T. 1998. Infecção por herpesvírus bovino 1 e herpesvírus bovino 5. In: RIET-CORREA F. Et al. Doenças de Ruminantes e Eqüinos. Universitária/UFPEL:82-91.
- Hübner S.O., Oliveira AP, Franco AC, Esteves PA, Silva AD, Spilki FR, Rijsewijk FA & Roehe PM. 2005. Experimental infection of calves with a gI, gE, US9 negative bovine herpesvirus type 5. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases 28:187-196.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa da Pecuária Municipal 2006. <http://www.ibge.gov.br> (acessado em 25/Nov/2007).
- Jones C. 2003. Herpes simplex virus type 1 and bovine herpesvírus 1 latency. Clinical Microbiology Review 16(1):79-95.
- Keuser V., Schynts F., Detry B., Collard A., Robert B., Vanderplasschen A., Pastoret P.P. & Thiry E. 2004. Improved Antigenic Methods for Differential Diagnosis of Bovine, Caprine, and Cervine Alphaherpesviruses Related to Bovine Herpesvirus. Journal of Clinical Microbiology 42(3):1228–1235.

- Lage A.P., Castro R.S., Melo M.I.V., Aguiar P.H.P., Filho J.B.B. & Leite R.C. 1996. Prevalence of antibodies to bluetongue, bovine herpesvirus 1 and bovine viral diarrhoea/mucosal disease viruses in water buffaloes in Minas Gerais State, Brazil. *Revue d'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux* 49(3): 195-197.
- Lovato L.T., Weiblen R., Tobias F.L. & Moraes M.P. 1995. Herpesvírus bovino tipo 1 (HVB-1): Inquérito soro-epidemiológico no rebanho leiteiro do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Rural* 25(3):425-430.
- Madin S.H., York C.J. & Mckercher D.G. 1956. Isolation of the infectious bovine rhinotracheitis virus. *Science* 129(1):721-722.
- Médici K.C., Alfieri A.A. & Alfieri A.F. 2000. Prevalência de anticorpos neutralizantes contra o herpesvírus bovino tipo 1, decorrentes de infecção natural, em rebanhos com distúrbios reprodutivos. *Ciência Rural* 30(2):347-350.
- Melo C.B., Oliveira A.M., Figueiredo H.C.P., Leite R.C. & Lobato Z.I.P. 1997. Prevalência de anticorpos contra Herpesvírus bovino-1, vírus da diarréia viral bovina e vírus da leucose enzoótica bovina em bovinos do Estado de Sergipe, Brasil. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 21(2):160-161.
- Murphy F.A., Gibbs E.P., Horzinek M.C. & Studdert M.J. 1999. *Veterinary Virology*. 3ª ed. New York: Academic Press; New York.
- Muylkens B., Thiry J., Kirten P., Schynts F. & Thiry E. 2007. Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. *Veterinary Research* 38:181-209.
- Odeon A.C. 1998. Herpesvirus Bovino, p. 103-111. In: Simpósio Internacional Sobre Herpesvírus Bovino (Tipo 1 e 5) e Vírus Da Diarréia Viral Bovina (BVDV). Anais, Santa Maria.
- Okuda L. H., Aguias D.M., Cavalcante G.T., Stefano E., Del Fava C., Pituco E. M., Labruna M.B., Camargo L.M.A. & Gennari S.M. 2006. Inquérito soro-epidemiológico do Herpesvírus Bovino tipo 1 (BoHV-1) no município de Monte Negro, Estado de Rondônia, Brasil. In: XIX Reunião Anual do Instituto Biológico, São Paulo.

Oliveira C. 2000. Análise de resíduos em tabelas de contingência. Dissertação de mestrado – Instituto de Matemática, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Paulin L.M. & Neto J.S.F. A. 2002. experiência brasileira no combate à brucelose bovina. *Arquivos do Instituto Biológico* 69(2):105-112.

Paul J. 1970. *Cell and tissue cultures*. 4^aed. London: E.e S., Livingstone.

Poester F.P., Gonçalves V.S.P. & Lage A.P. 2002. Brucellosis in Brazil. *Veterinary Microbiology* 90:55-62.

Poletto R., Kreutz L.C., Gonzales J.C. & Barcellos L.J.G. 2004. Prevalência de tuberculose e infecções víricas em bovinos leiteiros do município de Passo Fundo, RS. *Ciência Rural* 34(2):595-598.

Quincozes C. 2005. Prevalência e fatores de risco associados às infecções pelos herpesvírus bovino tipo 1 e tipo 5 (BoHV-1 e 5) e pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV) nos rebanhos dos municípios de Santa Vitória do Palmar e Chuí. Dissertação de mestrado – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Ravazzolo A.P., Dal Pizzol M. & Moojen V. 1989. Evidência da presença de anticorpos para o vírus da rinotraqueíte infecciosa dos bovinos em alguns municípios do Estado do Rio Grande do Sul. *Arquivos da Faculdade de Veterinária-UFRGS* :98-95.

Rocha M.A., Gouveia A.M.G., Lobato Z.I.P. & Leite R.C. 2001. Pesquisa de anticorpos para IBR em amostragem de demanda no Estado de Minas Gerais, 1990-1999. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 53(6):645-647.

Roehe P.M., Silva T.C., Nardi N.B., Oliveira L.G. & Rosa J.C.A. 1997. Diferenciação entre os vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (BHV-1) e vírus da encefalite bovina (BHV-5) com anticorpos monoclonais. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 17(1):41-44.

- Roizmann B. & Pellett P.E. 2007. The family Herpesviridae, a brief introduction, p. 2480-2497. In: Knipe, M.D. & Howley, P.M. *Field's Virology*. 5^aed. Ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia-USA.
- Schudel A.A., Carrillo B.J., Wyler R. & Metzler N.L. 1986. Infections of calves with antigenic variants of bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) and neurological disease. *Zentralblatt für Veterinärmedizin B* 33:303-310.
- Silva M.S., Brum M.C.S., Loreto E.L.S., Weiblein R. & Flores E.F. 2007. Molecular and antigenic characterization of Brazilian bovine herpesvirus type 1 isolates recovered from the brain of cattle with neurological disease. *Virus Research* 129:191-199.
- Six A., Banks M., Engels M., Ros Bascuñana C. & Ackermann M. 2001. Latency and reactivation of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) in goats and of caprine herpesvirus 1 (CapHV-1) in calves. *Archives of Virology* 146:1325-1335.
- Souza V.F., Melo S.V., Esteves P.A., Schmidt C.S., Gonçalves D.A., Schaefer R., Silva, T.C., Almeida R.S., Vicentini F., Franco A.C., Oliveira E.A., Spilki F.R., Weiblein R., Flores E.F., Lemos R.A., Alfieri A.A., Pituco E.M. & Roehle P.M. 2002. Caracterização de herpesvírus bovinos tipos 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5) com anticorpos monoclonais. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 22(1):13-18.
- Straub O.C. 2001. Advances in BHV1 (IBR) Research. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 108:419-422.
- Thibier M. & Guerin B. 2000. Hygienic aspects of storage and use of semen for artificial insemination. *Animal Reproduction. Science* 62:233-251.
- Thiry E., Saliki J., Bublot M. & Pastoret P.P. 1987. Reactivation of infectious bovine rhinotracheitis virus by transport. *Comparative Immunology, microbiology and infectious diseases* 10(1):59-63.
- Thiry E., Saliki J., Schwers A. & Pastoret P.P. 1985. Parturition as a stimulus of IBR virus reactivation. *The Veterinary Record* 116:599-600.

Thiry J., Keuser V., Muylkens B., Meurens F., Gogev S., Vanderplasschen A. & Thiry E. 2006. Ruminant alphaherpesvirus related to bovine Herpesvirus 1. *Veterinary Research* 37:169-190.

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(26).

Van Schaik G., Dijkhuizen A.A., Huirne R.B., Schukken Y.H., Nielen M. & Hage H.J. 1998. Risk factors existence of bovine herpesvirus 1 antibodies on nonvaccinating Dutch dairy farms. *Preventive Veterinary Medicine* 34(2-3):125-136.

Van Schaik, G.; Schukken, Y.H.; Nielen, M.; Dijkhuizen, A.A. & Benedictus, G. 2001. Risk factors for introduction of BHV1-free farm Dutch dairy farms: a case-control study. *Veterinary Quartely* 23(2):71-76.

Van Schaik G., Schukken Y.H., Nielen M., Dijkhuizen A.A., Barkema H.W. & Benedictus G. 2002. Probability of and risk factors for introduction of infectious diseases into Dutch SPF dairy farms: a cohort study. *Preventive Veterinary Medicine* 54(3):279-289.

Vidor T., Halfen D.C., Leite T.E. & Coswig L.T. 1995. Herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1): sorologia de rebanhos com problemas reprodutivos. *Ciência Rural* 25(3):420-424.

Vieira S., Brito W.M.E.D., Souza W.J., Alfaia B.T. & Linhares D.C.L. 2003. Anticorpos para o herpesvírus bovino 1 (bhv-1) em bovinos do estado de Goiás. *Ciência Animal Brasileira* 4(2):131-137.

Wentink G.H., Van Oirschot J.T. & Verhoeff J. 1993. Risk of infection with bovine herpes virus 1 (BHV-1): A review. *Veterinary Quartely* 15(1):30-33.

Wizigmann G., Vidor T. & Ricci Z.M.T. 1972. Investigações sorológicas sobre a ocorrência e incidência dos vírus PI-3, IBR e diarreia a vírus - Enfermidade das Mucosas dos bovinos no Estado do Rio Grande do Sul. Boletim do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor 1:52-58.

Anexos

Tabela 1 Dados da população bovina do Rio Grande do Sul em relação às meso e microrregiões (IBGE, 2006) e total de amostras analisadas no estudo.

Meso e microrregiões do RS	População bovina	% da população bovina total do RS	Total amostras analisadas
Noroeste Rio-grandense	2654287	18,99	418
Santa Rosa	207 548	1,49	33
Três Passos	212 769	1,52	33
Frederico Westphalen	287 482	2,06	45
Erechim	266 846	1,91	42
Sananduva	129 976	0,93	20
Cerro Largo	158 016	1,13	25
Santo Ângelo	573 691	4,11	90
Ijuí	141 152	1,01	22
Carazinho	117 465	0,84	18
Passo Fundo	188 616	1,35	30
Cruz Alta	197 333	1,41	31
Não-Me-Toque	39 042	0,28	6
Soledade	134 351	0,96	21
Nordeste Rio-grandense	870117	6,23	137
Guaporé	152 338	1,09	24
Vacaria	570 705	4,08	90
Caxias do Sul	147 074	1,05	23
Centro Ocidental Rio-grandense	1576814	11,28	248
Santiago	610 304	4,37	96
Santa Maria	823 995	5,90	130
Restinga Seca	142 515	1,02	22
Centro Oriental Rio-grandense	853509	6,11	134
Santa Cruz do Sul	219 448	1,57	35
Lajeado-Estrela	219 411	1,57	35
Cachoeira do Sul	414 650	2,97	65
Metropolitana de Porto Alegre	1087532	7,78	171
Montenegro	81 896	0,59	13
Gramado-Canela	75 555	0,54	12
São Jerônimo	207 648	1,49	33
Porto Alegre	192 275	1,38	30
Osório	335 488	2,40	53
Camaquã	194 670	1,39	31
Sudoeste Rio-grandense	4739186	33,91	746
Campanha Ocidental	2 120 329	15,17	334
Campanha Central	1 401 559	10,03	221
Campanha Meridional	1 217 298	8,71	192
Sudeste Rio-grandense	2193382	15,70	345
Serras de Sudeste	958 627	6,86	151
Pelotas	522 857	3,74	82
Jaguarão	322 032	2,30	51
Litoral Lagunar	389 866	2,79	61
Total	13974827		2200

Tabela 2 Resultados (positivo e negativo) dos testes de soroneutralização (SN) frente a diferentes cepas de herpesvírus bovinos tipos 1 (BoHV-1) e 5 (BoHV-5) sobre amostras de soros bovinos coletados no Estado do Rio Grande do Sul (n= 2200).

Tipos/subtipos de vírus	Cepa frente a qual foi realizado o teste de SN	Amostras positivas	Amostras negativas	Prevalência encontrada
BoHV-1.1	LA	482	1718	21,9
BoHV-1.1	EVI123*	511	1689	23,2
BoHV-5a	EVI88**	420	1780	19,1
BoHV-5b	A663	484	1716	22,0
BoHV-1.1 + BoHV-1.1	LA + EVI123	595	1605	27,0
BoHV-1.1 + BoHV-5a	LA + EVI88	553	1647	25,1
BoHV-1.1 + BoHV-5a	LA + A663	558	1642	25,4
BoHV-1.1 + BoHV-5a	EVI123 + EVI88	567	1633	25,8
BoHV-1.1 + BoHV-5b	EVI123 + A663	590	1610	26,8
BoHV-5a + BoHV-5b	EVI88 + A663	538	1662	24,5
BoHV-1.1 + BoHV-1.1 + BoHV-5a	LA + EVI123 + EVI88	620	1580	28,2
BoHV-1.1 + BoHV-1.1 + BoHV-5b	LA + EVI123 + A663	623	1577	28,3
BoHV-1.1 + BoHV-5a + BoHV-5b	LA + EVI88 + A663	593	1607	27,0
BoHV-1.1 + BoHV-5a + BoHV-5b	EVI123 + EVI88 + A663	611	1589	27,8
BoHV-1.1 + BoHV-1.1 + BoHV-5a + BoHV-5b	LA + EVI123 + EVI88 + A663	642	1558	29,2

*refere-se à amostra EVI123/98 (vide métodos para detalhes)

** refere-se à amostra EVI88/95 (vide métodos para detalhes)

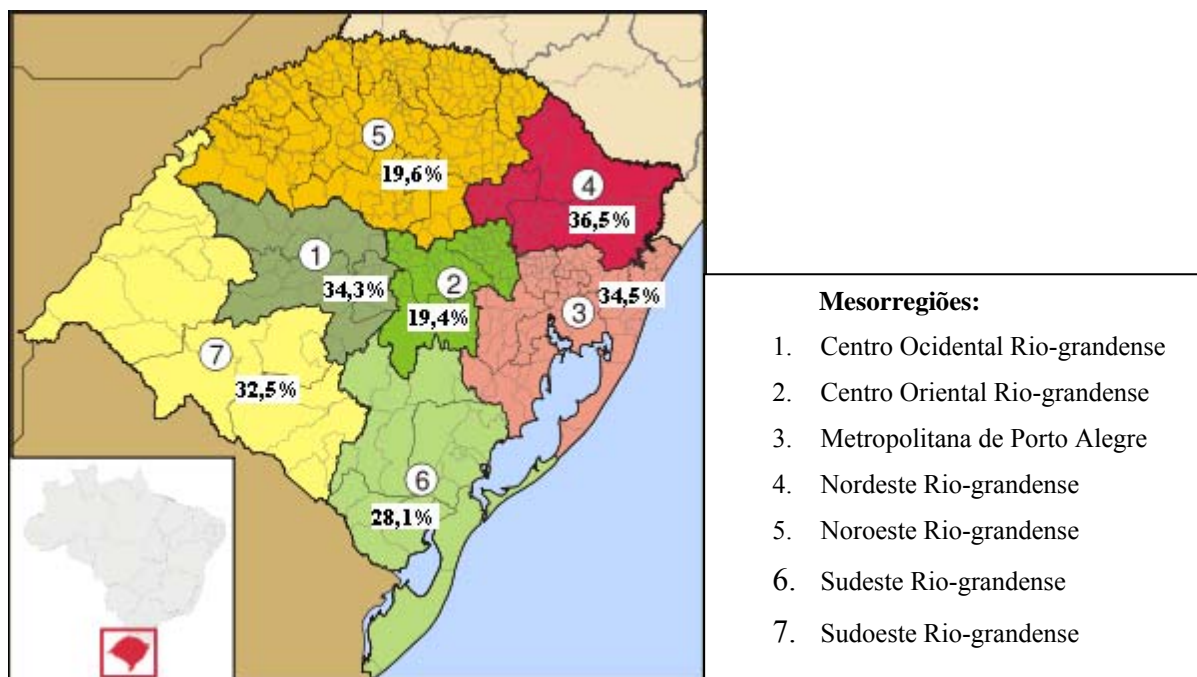


Figura 1 Soroprevalência de herpesvírus bovinos tipos 1 e 5 de acordo com as mesorregiões do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil.

Tabela 3 Resultado da pesquisa sobre os possíveis fatores de risco ou proteção relacionados às infecções causadas pelo BoHV-1 e BoHV-5.

Fator avaliado nos questionários	Respostas aos questionários	Positivo	Negativo	Resíduo ajustado (+)	Fator de
Mesorregiões	Centro Ocidental Rio-grandense	85 (34,3%)	163 (65,7%)	1,9	---*
	Centro Oriental Rio-grandense	26 (19,4%)	108 (80,6%)	2,6	proteção
	Metropolitana de Porto Alegre	59 (34,5%)	112 (65,5%)	1,6	---
	Nordeste Rio-grandense	50 (36,5%)	87 (63,5%)	1,9	---
	Noroeste Rio-grandense	82 (19,6%)	336 (80,4%)	4,8	proteção
	Sudeste Rio-grandense	97 (28,1%)	248 (71,9%)	0,5	---
	Sudoeste Rio-grandense	243 (32,5%)	504 (67,5%)	-2,5	risco
	total	642 (29,2%)	1558 (70,8%)		
Tipo de ordenha	manual	168 (25,5%)	492 (74,5%)	2,5	proteção
	mecânica	87 (25,7%)	251 (74,3%)	1,4	---
	não ordenha	198 (34,4%)	377 (65,6%)	-3,7	risco
	total	453 (28,8%)	1120 (71,2%)		
Quantidade de ordenha	1X/dia	142 (31,1%)	315 (68,9%)	1,3	---
	2 ou 3X/dia	113 (20,9%)	428 (79,1%)	5	proteção
	não ordenha	197 (34,4%)	376 (65,6%)	-3,7	risco
	total	452 (28,8%)	1119 (71,2%)		
Tipo de exploração	corde	427 (33%)	866 (67%)	-5	risco
	leite	107 (22,2%)	375 (77,8%)	3,7	proteção
	mista	100 (24,3%)	312 (75,7%)	2,3	proteção
	total	634 (29%)	1553 (71%)		
Assistência veterinária	veterinário de cooperativa	73 (21,9%)	260 (78,1%)	3,3	proteção
	veterinário privado	264 (35,1%)	489 (64,9%)	-4,1	risco
	não	283 (28%)	728 (72%)	1,5	---
	total	620 (29,6%)	1477 (70,4%)		
Venda de animais de reprodução	sim	207 (35,3%)	379 (64,7%)	-3,4	risco
	não	403 (27,7%)	1050 (72,3%)	3,4	proteção
	total	610 (29,9%)	1429 (70,1%)		
Uso de piquetes de parto/pós-parto	sim	240 (32,5%)	499 (67,5%)	-2,3	risco
	não	389 (27,7%)	1015 (72,3%)	2,3	proteção
	total	629 (29,4%)	1514 (70,6%)		
Presença de ovinos/caprinos	sim	385 (34,1%)	744 (65,9%)	-5,6	risco
	não	240 (23,2%)	796 (76,8%)	5,6	proteção
	total	625 (28,9%)	1540 (71,1%)		
Presença de animais silvestres	sim	183 (36,2%)	322 (63,8%)	-3,4	risco
	não	278 (27,7%)	725 (72,3%)	3,4	proteção
	total	461 (30,6%)	1047 (69,4%)		
Raça predominante	Europeu de corte	150 (42,4%)	204 (57,6%)	-6,1	risco
	Europeu de leite	90 (25,5%)	263 (74,5%)	1,6	---
	Mestiço	235 (27,3%)	625 (72,7%)	1,4	---
	Outras Raças	13 (41,9%)	18 (58,1%)	1,6	---
	Zebus	41 (17,4%)	194 (82,6%)	4,1	proteção
	Várias Raças	86 (29,9%)	202 (70,1%)	0,3	---
	total	615 (29%)	1506 (71%)		

Nota: Os resíduos padronizados ajustados (Adj) maiores que +1,96 e menores que -1,96 correspondem a um $p < 0,05$ na variável analisada.

* refere-se aos valores de Adj que não apresentaram significância estatística, não podendo ser interpretados (Adj entre -1,96 e +1,96).

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Neste trabalho realizamos uma investigação sobre a técnica de soroneutralização, por ser ela extensamente utilizada como padrão para a detecção de anticorpos específicos para o BoHV-1 e para o BoHV-5 (BITSCH, 1978; DEL FAVA et al., 1998; ROCHA et al., 2001; VIEIRA et al., 2003). A SN tem sido amplamente utilizada em inquéritos epidemiológicos, certificação de rebanhos, triagem de reprodutores destinados à coleta e comercialização de sêmen, além de dar suporte à investigação clínica (FRANCO & ROEHE, 2007). O teste convencional preconiza a utilização de um vírus “padrão” e um período de incubação de uma hora entre o vírus e os soros, antes da adição das células (DEREGT et al., 1993; VIEIRA et al., 2003; OIE, 2004).

A importância da avaliação sorológica está associada primordialmente ao conhecimento da prevalência da infecção pelo BoHV-1, BoHV-5 ou ambos. Este é o primeiro passo nos programas de controle e erradicação, nos quais bovinos infectados devem ser detectados e removidos da população (ACKERMANN et al., 1990). A soropositividade em um rebanho indica a presença de portadores do vírus que potencialmente atuam como fonte de infecção para animais suscetíveis, assegurando a permanência da infecção nos plantéis, além de causarem prejuízos econômicos devido à queda da produtividade (TIKOO et al., 1995).

No presente estudo foi constatado que a utilização de apenas uma cepa viral nos testes de SN pode prejudicar a detecção de grande parte dos animais soropositivos dos rebanhos analisados, desta forma, programas de controle e erradicação dos BoHV-1 e 5 podem ser seriamente comprometidos. Ao utilizar-se apenas uma cepa viral, a sensibilidade na detecção de animais soropositivos mostrou-se reduzida, sendo possível detectar apenas de 59,3 a 76,4% da sensibilidade máxima obtida frente a seis diferentes cepas de BoHV-1 e BoHV-5. Além disso, a cepa que isoladamente apresentou-se como a mais sensível na detecção de animais soropositivos foi a A663 (BoHV-5b), uma cepa que não é usualmente incluída como cepa de confrontação nos laboratórios que utilizam a SN como técnica de rotina. No entanto, esta amostra viral poderia ser uma boa candidata caso seja feita a opção pela utilização de apenas uma cepa viral na utilização em testes sorológicos. No entanto, ainda assim, deve-se ter em mente que os resultados de testes de SN frente a apenas um vírus isoladamente darão margem a grandes percentuais de “falso-negativos”.

A sensibilidade máxima na detecção de soros positivos foi determinada quando os resultados referentes às seis cepas virais utilizadas no estudo foram avaliados concomitantemente. No entanto, foi possível chegar-se a uma combinação de quatro cepas virais que possibilitaram a detecção de 99,1% das amostras verificadas como soropositivas no estudo. Esta combinação foi obtida na análise dos resultados dos testes de SN frente às amostras: LA (BoHV-1.1), EVI123/98 (BoHV-1.1), EVI88/95 (BoHV-5a) e A663 (BoHV-5b). Mesmo não tendo detectado 100% das amostras soropositivas, esta combinação apresentou sensibilidade bastante elevada e mostrou-se viável para utilização em estudos soropidemiológicos.

Posteriormente, utilizando-se esta combinação de quatro diferentes cepas virais, analisamos 2200 soros de fêmeas bovinas adultas representativas de todo o Estado do Rio Grande do Sul. Observou-se que a prevalência média atual para o Estado do Rio Grande do Sul encontra-se em 29,2%, taxa inferior aos índices encontrados na maioria de trabalhos já realizados no nosso Estado até o momento (WIZIGMANN et al., 1972; RAVAZZOLO et al., 1989; VIDOR et al., 1995; POLETO et al., 2004). No entanto, pela primeira vez utilizou-se dados da população bovina por mesorregiões do RS, para o cálculo de um número amostral que fosse realmente representativo dos rebanhos do Rio Grande do Sul. Além disso, pela primeira vez foram utilizados testes de SN frente a quatro cepas virais diferentes. Outro fato importante foi que neste trabalho foram utilizadas apenas amostras de fêmeas adultas (>24 meses). Pode-se esperar portanto, que a soroprevalência para o estado do RS seja um pouco mais elevada do que a encontrada, pois no estudo de Quincozes (2005) observou-se que fêmeas adultas apresentam menores índices de soropositividade do que machos adultos.

Os fatores de risco e proteção relacionados com as infecções por BoHV-1 e BoHV-5 encontrados no presente estudo, foram em grande parte inesperados, demonstrando que pouco ainda se conhece sobre as características dessas infecções em nossos rebanhos. No entanto, a importância do conhecimento destes fatores é primordial para um delineamento correto e efetivo de programas que objetivem a prevenção e o controle desses agentes.

Os resultados mostram que anticorpos anti-BoHV-1 e anti-BoHV-5 foram encontrados nos rebanhos bovinos do Rio Grande do Sul, com índices de prevalência que variam de uma mesorregião a outra. Além disso, quando testes de soroneutralização forem utilizados com a finalidade de avaliar o status sorológico de rebanhos, os mesmos devem ser realizados frente a diferentes cepas virais, uma vez que estas cepas não

induzem reatividade sorológica cruzada em todos os animais. Entretanto, a prevalência verificada ainda não permite discriminar infecções tipos específicas, ou seja, a real prevalência em relação ao BoHV-1 e ao BoHV-5 permanece desconhecida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKERMANN, M.; ENGELS, M. Pro and contra IBR-eradication. **Veterinary Microbiology**, v. 113, p. 293-302. 2006.

ACKERMANN, M. et al. Eradication of infectious bovine rhinotracheitis in Switzerland: review and prospects. **Veterinary Microbiology**, v. 23, p. 365-370. 1990.

AHMED, R. et al. Persistence of viruses. In: FILDS, B.N. et al. **Virology**. 3 ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996. cap 8, p. 219-249.

ALEGRE, M. et al. Development of a multiplex polymerase chain reaction for the differentiation of bovine herpesvirus-1 and 5. **Journal of Veterinary Medicine B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health**, v. 48, p. 613-621. 2001.

ALICE, F.J. Isolamento do vírus da mamilite herpética no Brasil. **Revista de Microbiologia**, v. 8, p. 9-15. 1977.

BAGUST, T.J.; CLARK, L. Pathogenesis of meningo-encephalitis produced in calves by infectious bovine rhinotracheitis herpesvirus. **Journal of Comparative Pathology**, v. 82, n. 4, p. 375-383. 1972.

BELKNAP, E.B. et al. Experimental infection of neonatal calves with neurovirulent bovine herpesvirus type 1.3. **Veterinary Pathology**, v. 31, p. 358-365. 1994.

BIELANSKI, A.; DUBUC, C. In-vitro fertilization and culture of ova from heifers infected with bovine herpesvirus-1 (BHV-1). **Theriogenology**, v. 41, n. 6, p. 1211-1217. 1994.

BITSCH, V. The P24-37 modification of the infectious bovine rhinotracheitis virus-serum neutralization test. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 19, n. 1, p. 497-505. 1978.

BLOOD, D.C. et al. Rinotraqueítis bovina infecciosa (nariz roja) (RIB). **Medicina Veterinaria Nova**, p. 873-879. 1988.

BOELAERT, F. Et al. Risk factors for bovine herpesvirus-1 seropositive. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 69, p. 285-295. 2005.

BRADSHAW, B.J.; EDWARDS, S. Antibody isotype responses to experimental infection with bovine herpesvirus 1 in calves with colostrally derived antibody. **Veterinary Microbiology**, v. 53, p. 143-151. 1996.

BRATANICH, A.C. et al. Comparative studies of BHV-1 variants by in vivo-in vitro tests. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 38, n. 1, p. 41-48. 1991.

CARRILLO B.J. et al. Meningoencephalitis caused by IBR virus in calves in Argentina. **Zentralblatt fur Veterinarmedizin B**, v. 30, p. 327-332. 1983.

CASTRUCCI, G. et al. Reactivation of bovid herpesvirus 1 and 2 and parainfluenza-3 virus in calves latently infected. **Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases**, v. 6, p. 193-199. 1983.

CASTRUCCI, G. et al. Vaccination of calves against bovine herpesvirus-1: assessment of the protective value of eight vaccines. **Comparative Immunology Mycrobiology & Infectious Disease**, v. 25, p. 29-41. 2002.

CHO, H.J.; BOHAC, J.C. Sensivity and specificity of an enzyme-linked immuosorbent assay for the detection of infectious bovine rhinotracheitis viral antibody in cattle. **Journal of Comparative Medicine**, v. 49, p. 189-194. 1984.

COLLINS, J.K. et al. A single dilution enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative detection of antibodies to bovine herpesvirus type 1. **Veterinary Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 133-147. 1985.

D'ARCE, R.C.F. et al. Restriction endonuclease and monoclonal anibody analysis of Brazilian isolates of bovine herpesviruses types 1 and 5. **Veterinary Microbiology**, v. 88, n. 2002, p. 315-324. 2002.

DAVISON, A.J. Evolution of the herpesviruses. **Veterinary Microbiology**, v. 86, p. 315-324. 2002.

DEL FAVA, C. et al. Erradicação do herpesvírus bovino-1 (BHV-1) de um rebanho bovino leiteiro em manejo semi-intensivo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 18, n. 2, p. 61-68. 1998.

DEL FAVA, C. et al. Reproductive rates and performance traits in beef cattle infected by bovine herpesvirus. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, n. 6, p. 739-746. 2006.

DELHON, G. et al. Genome of bovine herpesvirus 5. **Journal of Virology**, v. 77, n. 19, p. 10339–10347. 2003.

DEREGT, D. et al. Comparative evaluation of two sensitive serum neutralization tests of bovine herpesvirus-1 antibodies. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 57, p. 56-59. 1993.

D'Offay, J. M. et al.. Isolation and characterization of encephalitic bovine herpesvirus type 1 isolates from cattle in North America. **American Journal of Veterinary Research**, v. 54, p. 534–539. 1993.

DONKERSGOED, J.V.; BABIUK, L.A. Diagnosing and managing the respiratory form of infectious bovine rhinotracheitis. **Veterinary Medicine**, v. 86, n. 1, p. 86-94. 1991.

EDWARDS, S. et al. The virulence of British isolates of bovid herpesvirus 1 in relationship to viral genotype. **The British Veterinary Journal**, v. 143, n. 3, p. 216-231. 1991.

EDWARDS, S.; ROEDER, P.L. Attempted reactivation of latent bovine herpesvirus 1 infection in calves by infection with ruminant pestiviruses. **Veterinary Microbiology**, v. 8, p. 563-169. 1983.

ENGELS, M.; ACKERMANN, M. Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. **Veterinary Microbiology**, v. 53, p. 3-15. 1996.

- ENGELS, M. et al. The genome of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) strains exhibiting a neuropathogenic potential compared to known BHV-1 strains by restriction site mapping and cross-hybridization. **Virus Research**, v. 6, n. 1, p. 57-73. 1986.
- ESTEVEZ, P.A. et al. Bovine herpesvirus type 5 in the semen of a bull not exhibiting clinical signs. **The Veterinary Record**, v. 152, n. 21, p. 658-659. 2003.
- FENNER, F.J. et al. **Veterinary Virology**. 2 ed. San Diego: Academic Press, 1993. cap. 8, p. 137-158; cap. 9, p. 159-178; cap. 13, p. 241-264; cap. 19, p. 337-368.
- FENNER F. et al. **Virologia Veterinaria**. 1 ed. Zaragoza: Acribia, 1992. 691 p.
- FLORES, E. Diagnóstico virológico. **Apostila**. 1999, 62p.
- FRANCO, A.C.; ROEHE, P.M. *Herpesviridae*, in: Flores, E.F., **Virologia Veterinária**, Santa Maria-RS, Ed. Da UFSM, cap. 17, p. 433-488. 2007.
- FRENCH, E.L. A specific virus encephalitis in calves: isolation and characterization of the causal agent. **Veterinary Journal**, v. 38, p. 216-221. 1962.
- GARDINER, M.R. et al. Viral meningoencephalitis of calves in Western Australia. **Australian Veterinary Journal**, v. 40, p. 225-228. 1964.
- GEORGE, L.W. Understanding the encephalitic form of infectious bovine rhinotracheitis. **Food Animal Practice**, p. 335-337. 1991.
- GOMES, L.I. et al. Bovine herpesvirus 5 (BoHV-5) in bull semen: amplification and sequence analysis of the US4 gene. **Veterinary Research Communications**, v. 27, n. 6, p. 495-504. 2003.
- GRANZOW, H. et al. Ultrastructural analysis of the replication cycle of pseudorabies virus in cell culture: a reassessment. **Journal of Virology**, v. 71, n. 3, p. 2072-2082. 1997.

GUNGOR, A.B.; OZKUL, A. Dynamics of natural bovine herpesvirus-1 (BoHV-1) infection in a dairy herd. **Tropical Animal Health and Production**, v. 39, p. 13-20. 2007.

HAGE, J.J. et al. Sheep do not have a major role in bovine herpesvirus 1 transmission. **Veterinary Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 41-54. 1997.

HALFEN, D.C.; VIDOR, T. Infecção por herpesvírus bovino 1 e herpesvírus bovino 5. In: RIET-CORREA F. Et al. **Doenças de Ruminantes e Equinos**. Universitária/UFPEL, Pelotas, p. 82-91. 1998.

HALL, W.T. et al. The pathogenesis of encephalitis caused by the infectious bovine rhinotracheitis virus. **Australian Veterinary Journal**, v. 42, p. 229-237. 1966.

HEROLD, B.C. et al. Glycoprotein C-independent binding of herpes simplex virus to cells requires cell surface heparan sulfate and glycoprotein B. **Journal of General Virology**, v. 75, n. 6, p. 1211–1222. 1994.

HOUSE, J.A.; BAKER, J.A. Bovine herpesvirus IBR-IPV. The antibody virus neutralization reaction. **Cornell Veterinarian**, v. 61, p. 320-335. 1971.

HÜBNER, S.O. et al. Experimental infection of calves with a gI, gE, US9 negative bovine herpesvirus type 5. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 28, p. 187-196. 2005.

HUSHUR, O. et al. Restriction of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) growth in non-permissive cells beyond the expression of immediate early genes. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 66, n. 4, p. 453-455. 2003.

JONES, C. Herpes simplex virus type 1 and bovine herpesvirus 1 latency. **Clinical Microbiology Review**, v. 16, n. 1, p. 79-95. 2003.

KAHRS, R.F. Infectious bovine rhinotracheitis: a review and update. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 171, n. 10, p. 1055-1064. 1977.

KAHRS, R.F.. **Viral diseases of cattle**. 1 ed. Iowa: Iowa State University Press, 1981. 299p.

KARGER, A. & METTENLEITER, T.C. Glycoprotein gIII and gp50 play dominant roles in the biphasic attachment of pseudorabies virus. **Virology**, v. 194, n. 2, p. 654–664. 1993.

KEUSER, V. et al. Improved antigenic methods for differential diagnosis of bovine, caprine, and cervine alphaherpesviruses related to bovine herpesvirus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 1228–1235. 2004.

KLUPP, B.G. et al. Identification and characterization of a novel structural glycoprotein in pseudorabies virus, gL. **Journal of Virology**, v. 68, p. 3868-3878. 1991.

KRAMPS, J.A. et al. Evaluation of tests for antibodies against bovine herpesvirus 1 performed in national reference laboratories in Europe. **Veterinary Microbiology**, v. 102, p. 169-181. 2004.

LAMBERTO, P. Imunoprofilaxia da rinotraqueíte infecciosa bovina: vacinas com vírus atenuado, vacinas com vírus vivo termosensível e vacinas inativadas. In: SIMPÓSIO PFIZER, 4., 2003, Goiânia. **Anais**. Goiânia, 2003. p. 16-21.

LEMAIRE, M. et al. Production of bovine herpesvirus type 1-seronegative latent carriers by administration of a live-attenuated vaccine in passively immunized calves. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 4233-4238. 2000.

LEMAIRE, M. et al. Le contrôle de l'infection par le virus de la rhino trachéite infectieuse bovine. **Annuaire Médecine Vétérinaire**, v. 138, p. 167-180. 1994.

LI, Y. et al. Characterization of cell-binding properties of bovine herpesvirus glycoproteins B, C, and D: identification of a dual cell-binding function of gB. **Journal of Virology**, v. 69, n. 8, p. 4758–4768. 1995.

LI, Y. et al. Glycoprotein Bb, the N-terminal subunit of bovine herpesvirus 1 gB, can bind to heparan sulfate on the surfaces of madin-darby bovine kidney cells. **Journal of Virology**, v. 70, p. 2032–2037. 1996.

LIANG, X. et al. An *in vivo* study of a glycoprotein gIII-negative bovine herpesvirus 1 (BHV-1) mutant expressing beta-galactosidase: evaluation of the role of gIII in virus infectivity and its use as a vector for mucosal immunization. **Virology**, v. 189, n. 2, p. 629–639. 1992.

LIANG, X. et al. Bovine herpesvirus 1 attachment to permissive cells is mediated by its major glycoproteins gI, gIII, and gIV. **Journal of Virology**, v. 65, n. 10, p. 1124–1132. 1991.

LOVATO, L.T. et al. Herpesvírus bovino tipo 1 (HVB-1): Inquérito sorológico epidemiológico no rebanho leiteiro do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 25, n. 3, p. 425-430. 1995.

LYAKU, J.R. et al. The distinction of serologically related ruminant alphaherpesviruses by the polymerase chain reaction (PCR) and restriction endonuclease analysis. **Veterinary Microbiology**, v. 48, p. 135-142. 1996.

MADIN, S.H. et al. Isolation of the infectious bovine rhinotracheitis virus. **Science**, v. 124, n. 3225, p. 721-722. 1956.

MARS, M.H. et al. A gE-negative bovine herpesvirus 1 vaccine strain is not re-excreted nor transmitted in an experimental cattle population after corticosteroid treatments. **Vaccine**, v. 18, n. 19, p. 1975-1981. 2000.

MAYFIELD, J.E. et al. Cloning and cleavage site mapping of DNA from bovine herpesvirus 1 (Cooper strain). **Journal of Virology**, v. 47, p. 259-264. 1983.

MÉDICE, K.C. et al. Prevalência de anticorpos neutralizantes contra o herpesvírus bovino tipo 1, decorrentes de infecção natural, em rebanhos com distúrbios reprodutivos. **Ciência Rural**, v. 30, n. 2, p. 347-350. 2000.

METTENLEITER, T.C. Herpesvirus assembly and egress. **Journal of Virology**, v. 76, n. 4, p. 1537-1547. 2002.

METZLER, A.E. et al. European isolates of bovine herpesvirus 1: a comparison of restriction endonuclease sites, polypeptides, and reactivity with monoclonal antibodies. **Archives of Virology**, v. 85, p. 57-69. 1985.

METZLER, A.E. et al. Bovine herpesvirus 1: molecular and antigenic characteristics of variant viruses isolated from calves with neurological disease. **Archives of Virology**, v. 87, n. 3-4, p. 205-217. 1986.

MEYER, G. et al. Les encéphalites à herpèsvirus bovins. **Point Vétérinaire**, v. 31, p. 417-424. 2000.

MEYER, G. et al. Comparative pathogenesis of acute and latent infections of calves with bovine herpesvirus types 1 and 5. **Archives of Virology**, v. 146, n. 4, p. 633-652. 2001.

MILLER, J.M. The effects of IBR virus infections on reproductive function of cattle. **Veterinary Medicine**, v. 86, n. 1, p. 790-794. 1991.

MILLER J.M. et al. Abortifacient property of bovine herpesvirus type 1 isolates that represent three subtypes determined by restriction endonuclease analysis of viral DNA, **American Journal of Veterinary Research**, n. 52, p. 458-461. 1991.

MSOLLA, P.M. et al. Reactivation and shedding of bovine herpesvirus 1 following *Dictyocaulus viviparus* infection. **Journal of Comparative Pathology**, v. 93: p. 271-274. 1983.

MURPHY, F.A. et al. **Veterinary Virology**. 3rd ed. New York: Academic Press; 1999.

MUYLKENS, B. et al. Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. **Veterinary Research**, v. 38, p. 181-209. 2007.

NAKAMICHI, K. et al. Bovine herpesvirus 1 glycoprotein G is required for prevention of apoptosis and efficient viral growth in rabbit kidney cells. **Virology**, v. 279, p. 488-498. 2001.

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE). International Animal Health Code. Manual of Standards. Disponível em: <http://oie.int/norms/mmanual>. Acesso em: 07 maio 2008.

OKAZAKI, K. Et al. BHV-1 adsorption is mediated by the interaction of glycoprotein gIII with heparinlike moiety on the cell surface. **Virology**, v. 181, n. 2, p. 666-670. 1991.

PASTORET, P.P. et al. Bovine herpesvirus 1 infection of cattle: pathogenesis, latency, consequences of latency. **Annales des Recherche Vétérinaire**, v. 13, p. 221-235. 1982.

PASTORET, P.P.; THIRY, E. Diagnosis and prophylaxis of infectious bovine rhinotracheitis: the role of virus latency. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Disease**, v. 89, n. 1, p. 35-42. 1985.

PEREZ, S.E. et al. Primary infection, latency and reactivation of bovine herpesvirus type 5 in the bovine nervous system. **Veterinary Pathology**, v. 39, n. 4, p. 437-444. 2002.

PIDONE, C.L et al. Herpesvirus bovinos 1 y 5. **Analecta Veterinaria**, v. 9, n. 1-2, p. 40-50. 1999.

PITUCO, E.M. et al. Modelo alternativo para erradicação da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina/ Vulvovaginite Infecciosa (IBR/IPV) em rebanhos bovinos leiteiros. **Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo**, v. 64 (supl.), n. 17, p. 29. 1997.

POLETTI, R. et al. Prevalência de tuberculose e infecções víricas em bovinos leiteiros do município de Passo Fundo, RS. **Ciência Rural**, v. 34, n. 2, p. 595-598. 2004.

PUENTE, E. Impacto da IBR e da BVD na reprodução bovina. In: Simpósio Pfizer, 4., 2003, Goiânia. **Anais**. Goiânia, 2003. p. 7-14.

RAVAZZOLO, A.P. et al. Evidência da presença de anticorpos para o vírus da rinotraqueíte infecciosa dos bovinos em alguns municípios do Estado do Rio Grande do Sul. **Arquivos da Faculdade de Veterinária-UFRGS**, p. 98-95. 1989.

RIET-CORREA, F. et al. Meningoencefalite e necrose do córtex cerebral em bovinos causada por herpesvírus bovino-1. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 9, p. 13-16. 1989.

RIET-CORREA, F. et al. Víroses confundíveis com febre aftosa. **Ciência Rural**, v. 26, n. 2, p. 323-332. 1996.

RIET-CORREA, G. et al. Meningoencefalite e polioencefalomalácia causadas por herpesvírus bovino-5 no Estado do Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n. 1, p. 44-46. 2006.

RIJSEWIJK, F.A. et al. Epitopes on glycoprotein C of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) that allow differentiation between BHV-1.1 and BHV-1.2 strains. **Journal of General Virology**, v. 80, p. 1477-1483. 1999.

RISSI, D.R. et al. Epidemiologia, sinais clínicos e distribuição das lesões encefálicas em bovinos afetados por meningoencefalite por herpesvírus bovino-5. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n. 2. 2006.

RISSI, D.R. Meningoencefalite por herpesvírus bovino-5. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 7. p. 251-260. 2007.

ROCHA, M.A. et al.. Bovine herpesvírus-1 in semen. **Ciência Rural**, v. 29, n. 2, p. 373-380. 1999.

ROCHA, M.A. et al. Pesquisa de anticorpos para IBR em amostragem de demanda no Estado de Minas Gerais, 1990-1999 **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 6. 2001.

ROEHE, P.M. 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, p. 41-44. 1997.

ROELS, S. et al. Natural case of bovine herpesvirus 1 meningoencephalitis in an adult cow. **The Veterinary Record**, v. 146, n. 20, p. 586-588. 2000.

ROS, C.; BELÁK, S. Studies of genetic relationships between bovine, caprine, cervine, and rangiferine alphaherpesviruses and improved molecular methods for virus detection and identification. **Journal Clinical of Microbiology**, v. 37, n. 5, p. 1247-1253. 1999.

ROS, c. et al. Improved detection of five closely related ruminant alphaherpesviruses by specific amplification of viral genomic sequences. **Journal of Virological Methods**, v. 83, p. 55-65. 1999.

ROIZMANN, B. et al. Herpes simplex virus, in: Knipe, M.D. & Howley, P.M., **Field's Virology**, Philadelphia-USA, 5th Ed. Lippincott Williams & Wilkins, v.2, cap. 67, p. 2501 – 2601. 2007.

ROIZMANN, B.; PELLETT, P.E., The family Herpesviridae: a brief introduction, in: Knipe, M.D. & Howley, P.M., **Field's Virology**, Philadelphia-USA, 5th Ed. Lippincott Williams & Wilkins, v. 2. cap. 66, p. 2480-2497. 2007.

ROIZMANN, B. et al. The family Herpesviridae: an update. **Archives of Virology**, n. 123, p. 425–449. 1992.

SALVADOR, S.C. et al. Meningoencefalite em bovinos causada por herpesvírus bovino-5 no Mato Grosso do Sul e São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 18, n. 2, p. 76-83. 1998.

SANCHES, A.W.D. et al. Doenças do sistema nervoso central em bovinos no Sul do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, n. 3, p. 113-118. 2000.

SCHILD, A.L. et al. Doenças diagnosticadas pelo Laboratório Regional de Diagnóstico em 1993. **Boletim do Laboratório Regional de Diagnóstico**, n. 14, p. 23-26. 1994.

SCHUDEL, A.A. et al. Infections of calves with antigenic variants of bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) and neurological disease. **Journal of Veterinary Medicine B.**, v. 33, p. 303-310. 1986.

SCHYNTS, F. et al. A specific PCR to differentiate between gE negative vaccine and wildtype bovine herpesvirus type 1 strains. **Veterinary Microbiology**, v. 66, p. 187-195. 1999.

SIEBERT, S. et al. Marker vaccines—new opportunities for IBR control. **Tierärztliche Umschau**, v. 50, p. 530-533. 1995.

SILVA, A.D. et al. Vaccination with a gE-negative bovine herpesvirus type 1 vaccine confers insufficient protection to a bovine herpesvirus type 5 challenge. **Vaccine**, v. 24, p. 3313-3320. 2006.

SILVA, M.S. et al. Molecular and antigenic characterization of Brazilian bovine herpesvirus type 1 isolates recovered from the brain of cattle with neurological disease. **Virus Research**, v. 129, p. 191-199. 2007.

SIX, A. et al. Latency and reactivation of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) in goats and of caprine herpesvirus 1 (CapHV-1) in calves. **Archives of Virology**, v. 146, p. 1325-1335. 2001.

SMITH, G.A. et al. Emergence of a new bovine herpesvirus 1 strain in Australian feedlots. **Archives of Virology**, n. 140, p. 599–603. 1995.

SOLIS-CALDERON, J.J. et al. Seroprevalence of and risk factors for infectious bovine rhinotracheitis in beef cattle herds of Yucatan, Mexico. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 57, p. 199-208. 2003.

SOUZA, V.F. et al. Caracterização de herpesvírus bovinos tipos 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5) com anticorpos monoclonais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 22, n. 1, p. 13-18. 2002.

SPEAR, P.G. Entry of alphaherpesviruses into cells. **Seminars in Virology**, v. 4, p. 167–180. 1993.

SPEAR, P.G. et al. Three classes of cell surface receptors for alphaherpesvirus entry. **Virology**, v. 275, n. 1, p. 1-8. 2000.

SPIELKI, F.R. et al. A monoclonal antibody-based ELISA allows discrimination between responses induced by bovine herpesvirus subtypes 1 (BoHV-1.1) and 2 (BoHV-1.2). **Journal of Virological Methods**, v. 129, n. 2, p. 191-193. 2005.

SPIELKI, F.R. et al. Comparative pathogenicity of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) subtypes 1 (BHV-1.1) and 2a (BHV-1.2a). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 24, n. 1, p. 43-49. 2004.

TEIXEIRA, M.B. et al. Diferenças em níveis de anticorpos neutralizantes contra herpesvírus bovinos tipos 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5) por testes de soroneutralização. **Pesquisa Veterinária Gaúcha**, v. 4, n. 1, p. 61-65. 1998.

THIELSCHER, H.; HUTH, F. IBR/IPV: Vaccination or Culling? **Landbauforschung Völkenrode**, v. 36, p. 171-176. 1986.

THIRY, E. et al. Les conséquences de l'infection des bovins par le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine. **Point Vétérinaire**, v. 199, p. 279-285. 1999.

THIRY, E. et al. Parturition as a stimulus of IBR virus reactivation. **The Veterinary Record**, v. 116, p. 599-600. 1985.

THIRY, J. et al. Ruminant alphaherpesvirus related to bovine Herpesvirus 1. **Veterinary Research**, v. 37, p. 169-190. 2006.

THIRY, J. et al. Isolation and characterisation of a ruminant alphaherpesvirus closely related to bovine herpesvirus 1 in a free-ranging red deer. **BioMed Central Veterinary Research**, v. 3, n. 26. 2007.

TIKOO, S.K. et al. Bovine Herpesvirus 1 (BHV-1): biology, pathogenesis, and control. **Advances in Virus Research**, n. 45, p. 191-223. 1995.

TOMISHIMA, M.J.; ENQUIST, L.W. A conserved alpha-herpesvirus protein necessary for axonal localization of viral membrane protein. **Journal of Cell Biology**, v. 154, n. 4, p. 741-752. 2001.

VAN OIRSCHOT, J.T. et al. Advances in the development and evaluation of bovine herpesvirus 1 vaccines. **Veterinary Microbiology**, v. 53: p. 43-54. 1996.

VAN OIRSCHOT, J.T. et al. A subclinical infection of bulls with bovine herpesvirus type 1 at an artificial insemination centre. **The Veterinary Record**, v. 132, n. 2, p. 32-35. 1993.

VAN SCHAİK, G. Risk and economics of disease introduction to dairy farms. **Tijdschr Diergeneeskd**, v. 126, p. 414-418. 2001.

VAN SCHAİK, G. et al. Probability of and risk factors for introduction of infectious diseases into Dutch SPF dairy farms: a cohort study. **Preventive Veterinary Medicine.**, v. 54, p. 279-289. 2002.

VASCONCELLOS, R.O. et al. Meningoencefalite por herpesvírus. In: Encontro Nacional de Patologia Veterinária. **Anais**. Santa Maria, 1993. p.11.

VIDOR, T. et al. Herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1): sorologia de rebanhos com problemas reprodutivos. **Ciência Rural**, v. 25, n. 3, p. 421-424. 1995.

VIEIRA, S. et al. Anticorpos para o herpesvírus bovino 1 (bhv-1) em bovinos do estado de Goiás. **Ciência Animal Brasileira**, v. 4, n. 2, p. 131-137. 2003.

VOGEL, F.S.F. et al. Distribution of bovine herpesvirus type 5 DNA in the central nervous systems of latently, experimentally infected calves. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 10, p. 4512–4520. 2003.

VOGEL, F.S.F. et al. Neutralizing activity to bovine herpesvirus types 1 (BHV-1) and 5 (BHV-5) in sera of cattle immunized with vaccines against BHV-1. **Ciência Rural**, v. 32, n. 5. 2002.

WEIBLEIN, R. et al. Bovine meningoencephalitis from IBR virus. **The Veterinary Record**, v. 124, p. 666-667. 1989.

WHETSTONE, C. A., B. S. et al. Variability occurs in the inverted repeat region of genomic DNA from bovine herpesvirus 1 respiratory, genital and bovine herpesvirus 5 encephalitic isolates. **Veterinary Microbiology**, n. 38, p. 181-189. 1993.

WILD, P. et al. Novel entry pathway of bovine herpesvirus 1 and 5. **Journal of Virology**, v. 72, n. 2, p. 9561-9566. 1998.

WINKLER, M.T. et al. Persistence and reactivation of bovine herpesvirus 1 in the tonsils of infected calves. **Journal of Virology**, v. 74, n. 11, p. 5337-5346. 2000.

WIZIGMANN, G. et al. Investigações sorológicas sobre a ocorrência e incidência dos vírus PI-3, IBR e diarreia a vírus - Enfermidade das Mucosas dos bovinos no Estado do Rio Grande do Sul. **Boletim do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor**, n. 1, p. 52-58. 1972.

WYLER, R. et al. Infectious bovine rhinotracheitis/vulvovaginitis (BHV1). In: WITTMAN, G.; BECKER, Y. **Herpesvirus diseases of cattle, horses, and pigs. Developments in veterinary virology**. 1 ed. Switzerland: Academic Publishers, 1989. p. 1-72.

ZAJAC, M.P.M. et al. BHV-1 vaccine induces cross-protection against BHV-5 disease in cattle. **Research in Veterinary Science**, p. 1-8. 2006.