



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**CONTRIBUIÇÃO AO CONTROLE DAS INFECÇÕES PELO  
HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 1 EM REBANHOS  
DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO**

**PAULA AMORIM SCHIAVO**

*Sob a Orientação do Professor*  
**Cláudio de Moraes Andrade**

Dissertação submetida como  
requisito parcial para obtenção do  
grau de **Mestre em Ciências**, no  
Curso de Pós-Graduação em  
Medicina Veterinária, Área de  
Concentração em Medicina  
Veterinária Preventiva

Seropédica, RJ  
Março de 2005

Autorizo a reprodução desta obra para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

636.208969

518

S329c

T

Schiavo, Paula Amorim, 1979-  
Contribuição ao controle das  
infecções pelo herpesvírus bovino  
tipo 1 em rebanhos do estado do Rio  
de Janeiro/ Paula Amorim Schiavo .  
- 2005.  
102 f. : il.

Orientador: Cláudio de Moraes  
Andrade.

Dissertação (mestrado)-  
Universidade Federal Rural do Rio  
de Janeiro, Instituto de  
Veterinária.

Bibliografia: f. 82-95.

1. Bovino - Infecções - Teses.  
2. Bovino - Doenças - Teses. 3.  
Vírus do herpes em animais - Teses.  
4. Vírus do herpes em animais -  
Controle - Teses. 5. Virologia  
veterinária - Teses. I. Andrade,  
Cláudio de Moraes, 1933- II.  
Universidade Federal Rural do Rio  
de Janeiro. Instituto de  
Veterinária. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**PAULA AMORIM SCHIAVO**

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de Concentração em Medicina Veterinária Preventiva, como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, em 07 de março de 2005.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 07/03/2005

---

Cláudio de Moraes Andrade. L.D. UFRRJ  
(Orientador)

---

Carlos Henrique de Azeredo Lima. Ph.D. PESAGRO/RJ

---

Rita de Cássia Campbell Machado Botteon. Ph.D. UFRRJ

*“O homem é triste por duas razões: porque ignora ou porque espera.” (Camus)*

*Para Leonardo.*

*Para André, Maria e Paulo.*

*Para Cláudio, Isabel e Marietta.*

## AGRADECIMENTOS

Ao Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, pela oportunidade concedida.

À CAPES e ao CNPq pelo auxílio financeiro que possibilitou a realização destes trabalhos.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, o lugar que chamarei sempre “minha casa”.

Às Coordenadoras do Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Professoras Marta Fernanda Albuquerque da Silva e Rita de Cássia Campbell Machado Botteon e aos Secretários Otacilio José Domingos e Regina Helena de Oliveira Santos, sempre prontos a prestar o socorro necessário.

Aos Professores do Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária pela dedicação, pelas experiências passadas, pela convivência, pelos conselhos e por não esmorecerem.

Aos Professores João Telhado Pereira, Marta Fernanda Albuquerque da Silva, Paulo de Tarso Landgraf Botteon, Rita de Cássia Campbell Machado Botteon e Luiz Figueira Pinto pela amizade, pela paciência, pela experiência e pelas valiosas sugestões.

Ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, especialmente ao Dr. José Diocleciano Peixoto e à Dra. Georgina Rita Hermida Lage, pela cessão dos soros para as pesquisas de prevalência.

Ao Centro Panamericano de Febre Aftosa, pela cessão da amostra Cooper do BHV-1 e das células MDBK.

Ao Professor José Antônio Jerez pelo apoio prontamente concedido.

A Cátia Regina Valério Grégio, incansável, pela ajuda e experiência com o BHV-1.

A Vanessa Miranda, pela ajuda na avaliação da atividade dos extratos, pela força e por suas valiosas sugestões.

A Lucrécia Pereira Wienen e Rita de Cássia Campbell Machado Botteon pela organização e colheita dos soros e colostros.

À Professora Sônia Soares Costa pela cessão dos extratos de plantas.

Ao Professor Paulo Vargas Peixoto e à amiga Luciana Rodrigues de Almeida pela cessão de material bibliográfico.

A todos os contemporâneos do Laboratório de Víruses Veterinárias, companheiros de caminhada e sem os quais não teria chegado até aqui! Obrigada por comporem a alma da maior paixão que já experimentei na vida! Obrigada Aline da Silva Costa, Ana Elisa da Costa

Ferreira, Bernardo Oliveira Loureiro, Carla da Silva Mota, Carlos Henrique de Azeredo Lima, Carlos Mazur, Cátia Regina Valério Grégio, Cristiana Portz, Gabrielle Sales de Oliveira, Jorge Granja de Oliveira Júnior, Maria das Graças Miranda Danelli, Marius da Silva Pinto Belucci, Priscila Nogueira Ferraz, Sieberth do Nascimento Brito, Thaís Castelo Branco Chaves, Thaís Lourenço Ferreira, Vanessa Miranda e Waldyr Pessanha Júnior.

Ao Professor Sergio Gaspar de Campos, pelo exemplo profissional, por sua dedicação e atenção em todos os momentos.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, especialmente Gabrielle Sales de Oliveira, Roberto dos Santos Teixeira, Tatiana Pessoa dos Reis, Raquel Calixto e Rafael Pessoa Campello Queiroz por tudo o que compartilhamos nestes anos de curso.

A Carla da Silva Mota, Graziela Savastano e a Valéria Moura Oliveira pela amizade, pelo apoio, por toda a ajuda e pelas sugestões.

À minha amiga Isabel Gomes Andrade pelo exemplo de dedicação como amiga e como profissional.

A Marietta Maria Gomes Andrade pela amizade e por todo o apoio concedido.

Aos amigos da SFA-AM, especialmente, Ornã, Campos, Eduardo, Elineide, Guilherme, João, José Rogério, Lílian, Luciana, Luiz Cláudio, Paulinho e Rubens por toda ajuda e compreensão nesta fase de tantas mudanças.

A Alessandra e Leonardo Castagnino pela dedicação.

À minha avó Wanda, meus tios e minha amiga Natividade pelas orações.

Ao meu irmão André Luís Amorim Schiavo, pela paciência nas muitas horas de laboratório, e a meus pais Paulo Darcy Schiavo e Maria da Graça Amorim Schiavo pelo amor e dedicação incondicionais.

Ao meu orientador, Cláudio de Moraes Andrade, pelo exemplo pessoal e profissional, pela paciência, por fazer de cada instante um aprendizado, por sua mente visionária, por estar aberto a novas idéias sem se vender a elas, pelos ouvidos e pelas palavras oportunas, e por tudo o que faz com que cada orientado seja o único, mas justamente por não ser o único.

Ao meu noivo Leonardo Barboza Pinheiro, por todo amor, toda a força e motivação.

## **BIOGRAFIA**

Paula Amorim Schiavo, filha de Paulo Darcy Schiavo e Maria da Graça Amorim Schiavo, nasceu em Nova Iguaçu, Estado do Rio de Janeiro, aos sete dias do mês de abril de 1979. Concluiu o Ensino Fundamental no Instituto de Educação Santo Antônio, em Nova Iguaçu, em dezembro de 1992. Ingressou no Ensino Médio em março de 1993, no Colégio Técnico da Universidade Rural, onde se formou Técnica em Agropecuária em 28 de dezembro de 1995. Iniciou o curso de Medicina Veterinária na Universidade Federal Fluminense em março de 1997, transferindo-se no ano seguinte para a Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, onde foi diplomada em 5 de abril de 2003. Exerceu monitoria da disciplina de Microbiologia Veterinária, sob orientação do Professor Sergio Gaspar de Campos, nos anos de 1999 e 2000, e da disciplina de Virologia Veterinária, sob orientação dos professores Carlos Mazur e Sieberth do Nascimento Brito, em 2001. Foi bolsista do PIBIC/CNPq de 2001 a 2003, dedicando-se à pesquisa da Herpesvirose Bovina, sob a orientação do Professor Cláudio de Moraes Andrade. Em 2003, ingressou no Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Atualmente, é Fiscal Federal Agropecuário lotada na Superintendência Federal de Agricultura no Amazonas.

## RESUMO

SCHIAVO, Paula Amorim. **Contribuição ao Controle das Infecções pelo Herpesvírus Bovino tipo 1 em Rebanhos Bovinos do Estado do Rio de Janeiro.** 2005. 102 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2005.

O BHV-1 é conhecido genericamente como o agente etiológico da IBR, da IPV e da IPB, e está disseminado em rebanhos bovinos e bubalinos do Brasil e do mundo, causando prejuízos econômicos e sanitários à atividade pecuária. Ainda pode apresentar sintomatologia semelhante à da Febre Aftosa e outras enfermidades vesiculares, de forma que o diagnóstico diferencial de laboratório é exigido. A alta prevalência de animais positivos representa um sério risco para a atividade pecuária, considerando-se a recidividade da infecção, que apresenta uma forma subclínica, facilmente despercebida pelos envolvidos com a bovinocultura. Sendo objeto de controle em todo o mundo, mas com poucas alternativas viáveis na situação atual do rebanho brasileiro, urge a definição de novas estratégias de controle da infecção. A vacinação não protege da infecção, prejudica a identificação dos animais portadores e, no caso de vacinas atenuadas, pode estabelecer infecção latente. A enfermidade será a próxima barreira sanitária ao comércio internacional de animais vivos e seus produtos na União Européia e já foi erradicada da Áustria, Dinamarca, Finlândia, Suíça e Suécia, e programas de controle foram iniciados em outros países europeus. Neste trabalho abordamos aspectos clínicos e epidemiológicos da doença, avaliando a ocorrência da infecção pelo BHV-1 no Estado do Rio de Janeiro. Também propomos uma nova metodologia para o diagnóstico de matrizes infectadas pelo BHV-1, usando a técnica de neutralização em microplacas com células MDBK cultivadas em monocamadas; avaliamos a eficiência da imunização passiva, a partir da ingestão do colostro; apresentamos propostas de controle da doença com tratamentos homeopáticos e fitoterápicos; avaliamos o efeito do extrato de *Kalanchoe brasiliensis* frente ao BHV-1 *in vitro*; revisamos a literatura referente à vacinação contra a doença e sugerimos medidas para o controle da doença em rebanhos do Estado do Rio de Janeiro.

**Palavras-chave:** BHV-1. Controle. Rio de Janeiro.

## ABSTRACT

SCHIAVO, Paula Amorim. **Contribution to the Control of Bovine Herpesvirus type 1 Infections in Cattle Herds from Rio de Janeiro State, Brazil.** 2005. 102 p. Dissertation (Master Science in Veterinary Medicine) Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2005.

BHV-1, the agent of IBR, IPV and IPB, is spread among cattle and buffalo herds, bringing sanitary and economic losses to the livestock industry in Brazil and the world. These diseases can present clinical signs that fake Food-and-Mouth Disease and other vesicular diseases, and differential diagnosis in referenced laboratories is required. The high incidence is a hazardous risk for livestock, as the infection has an insidious character, with a subclinical form, generally unnoticed by the people involved with the cattle maintenance. As the control of the infection is required but there are few reasonable alternatives for the situation within Brazilian herds, we need new strategies for the control of the disease, which will be of major concern for fighting the infection in the world. Vaccines can't protect from infection and confuse diagnostics. Using attenuated vaccines a latent infection can be started. The disease will be the next sanitary barrier for the international trade of animals and products in the European Union. BHV-1 has been eradicated from Austria, Denmark, Finland, Sweden and Switzerland and control programs have started in some other countries. In the present research, we appreciated clinical and epidemiological aspects of the disease, evaluating the BHV-1 presence in Rio de Janeiro state. We have proposed a new method for the diagnostics of infected breeding cows, using the neutralization test in microplates with MDBK monolayers. We have evaluated the efficiency of passive immunization after colostrum ingestion. The effect of *Kalanchoe brasiliensis* extracts against BHV-1 in MDBK cells was evaluated. The control of the infection with homeopathic and phytotherapy therapeutics is proposed and the publications about BHV-1 vaccination were reviewed. Measures for the control of the infection in cattle herds from Rio de Janeiro State are suggested.

**Key words:** BHV-1. Control. Rio de Janeiro.

## RESUMO

SCHIAVO, Paula Amorim. **Contribución al Control de las Infecciones por el Herpesvirus Bovino tipo 1 en Rebaños Bovinos del Estado de Rio de Janeiro.** 2005. 102 p. Disertación (Maestría en Medicina Veterinaria). Instituto de Veterinaria, Universidad Federal Rural de Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2005.

EL BHV-1 es conocido genéricamente como el agente etiológico de la IBR, de la IPV y de la IPB, y está diseminado en rebaños bovinos y bubalinos de Brasil y del mundo, causando perjuicios económicos y sanitarios a la actividad pecuaria. Todavía puede presentar sintomatología semejante a la de la Fiebre Aftosa y otras enfermedades vesiculares, en un modo que el diagnóstico diferencial de laboratorio es exigido. La alta prevalencia de animales positivos representa un serio riesgo para la actividad pecuaria, se considerando la recidivada de la infección, que presenta una forma subclínica, fácilmente desapercibida por los envueltos con la bovinocultura. Siendo objeto de control en todo el mundo, pero con pocas alternativas viables en la situación actual del rebaño brasileño, urge la definición de nuevas estrategias de control de la infección. La vacunación no protege de la infección, perjudica la identificación de los animales portadores y, en el caso de vacunas atenuadas, puede establecer infección latente. La enfermedad será la próxima barrera sanitaria al comercio internacional de animales vivos y sus productos en Unión Europea y ya fue erradicada de Austria, Dinamarca, Finlandia, Suiza y Suecia, y programas de control habían sido iniciados en otros países europeos. En este trabajo abordamos aspectos clínicos y epidemiológicos de la enfermedad, evaluando la ocurrencia de la infección por el BHV-1 en el Estado de Rio de Janeiro. También proponemos una nueva metodología para el diagnóstico de matrices infectadas por el BHV-1, usando la técnica de neutralización en microplacas con células MDBK cultivadas en monocamadas; evaluamos la eficiencia de la inmunización pasiva, a partir de la ingestión del calostro; presentamos propuestas de control de la enfermedad con tratamientos homeopáticos y fitoterápicos; evaluamos el efecto del extracto de *Kalanchoe brasiliensis* frente al BHV-1 in vitro; revisamos la literatura referente a la vacunación contra la enfermedad y sugerimos medidas para el control de la enfermedad en rebaños del Estado de Rio de Janeiro.

**Palabras Claves:** BHV-1. Control. Rio de Janeiro.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Regiões fisiográficas do Estado do Rio de Janeiro e municípios componentes.	26
<b>Tabela 2.</b> Prevalência de anticorpos neutralizantes para o BHV-1, por diluição do soro reagente.	27
<b>Tabela 3.</b> Prevalência de soros reagentes nos município examinados, entre os soros testados.	29
<b>Tabela 4.</b> Número de soros pesquisados por região fisiográfica.	30

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Filtragem do MEM em membrana Millipore, usando pressão positiva, em capela de fluxo laminar horizontal.	12
<b>Figura 2.</b> Garrafa de cultivo com monocamada e células MDBK.	14
<b>Figura 3.</b> Microplacas de 96 cavidades, fundo chato, para execução dos testes de soroneutralização.	15
<b>Figura 4.</b> Capela de fluxo laminar preparada para execução do teste de soroneutralização.	15
<b>Figura 5.</b> Aspiração do meio de cultivo celular das cavidades com monocamadas confluentes.	16
<b>Figura 6.</b> Câmara de CO <sub>2</sub> contendo as microplacas em teste, colocadas na estufa.	17
<b>Figura 7.</b> Leitura dos testes em microscópio invertido.	19
<b>Figura 8.</b> Efeito citopatogênico característicos dos herpesvírus.	19
<b>CAPÍTULO I</b>	
<b>Figura 1.</b> Municípios onde foram encontrados animais com anticorpos neutralizantes para o BHV-1.	32
<b>CAPÍTULO II</b>	
<b>Figura 1.</b> Anticorpos maternos no soro e colostro.	41
<b>CAPÍTULO III</b>	
<b>Figura 1.</b> Anticorpos neutralizantes para o BHV-1 em bezerros desde o nascimento.	50

## LISTA DE ABREVIACÕES, SIGLAS E SÍMBOLOS

BHV-1	( <i>Bovine Herpesvirus type 1</i> ) Herpesvírus Bovino Tipo 1
BVD	Diarréia Viral Bovina
BVDV	Vírus da Diarréia Viral Bovina
°C	Graus Celsius
CH	Escala Centesimal Hahnemanniana
CPE	Efeito citopatogênico
DH	Escala Decimal Hahnemanniana
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	cido desoxirribonucléico
DT <sub>50</sub>	Dose tóxica para 50% das culturas
ED <sub>50</sub>	ndice de inibição viral
ELISA	Enzyme-linked immunoadsorbent assay
g	Gramas
gB	Glicoproteína B
gC	Glicoproteína C
gD	Glicoproteína D
gE	Glicoproteína E
gI	Glicoproteína I
h	hora(s)
IBR	( <i>Infectious Bovine Rhinotracheitis</i> ) Rinotraqueíte Infecciosa Bovina
IFN-γ	Interferon gama
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IPB	( <i>Infectious Pustular Balanopostitis</i> ) Balanopostite Pustular Infecciosa
IPV	( <i>Infectious Pustular Vulvovaginitis</i> ) Vulvovaginite Pustular Infecciosa
IT	ndice terapêutico
L	Litro
MDBK	Madin Darby Bovine Kidney
MEM	Minimum Essential Medium
mL	Mililitros
mm	Milímetros
μ	Micrmetros
μL	Microlitros
OIE	Organização Internacional de Saúde Animal
PEG	Polietilenoglicol
q.s.p.	Quantidade suficiente para
TICD <sub>50</sub>	Dose infectante para 50% das culturas de tecidos
UI	Unidades Internacionais

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>1</b>
1.1 Objetivos.....	2
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>3</b>
2.1 O Vírus .....	3
2.1.1 Propriedades Virais .....	3
2.1.2 Espécies Suscetíveis .....	4
2.2 A Doença.....	4
2.2.1 Importância Econômica e Sanitária das Infecções pelo Herpesvírus Bovino tipo 1 .....	4
2.2.2 Distribuição.....	4
2.2.3. Transmissão e Patogenia .....	5
2.2.4 Formas clínicas da infecção pelo Herpesvírus Bovino tipo 1 (BHV-1).....	6
a) <i>Doença Respiratória e Ocular</i> .....	7
b) <i>Encefalite</i> .....	8
c) <i>Doença Genital</i> .....	8
d) <i>Forma Sistêmica em Animais Jovens</i> .....	9
2.3 Diagnóstico .....	9
<b>3. MÉTODOS E PROCEDIMENTOS DA PESQUISA.....</b>	<b>11</b>
3.1 Material .....	11
3.1.1 Amostra do vírus .....	11
3.1.2 Sistema hospedeiro .....	11
3.1.3 Meios e soluções .....	11
3.1.4 Extratos de plantas .....	11
3.2. Método .....	12
3.2.1 Modo de Preparo das Soluções .....	12
3.2.2 Técnica de Cultivo Celular .....	13
3.2.3 Técnica de soroneutralização.....	14
3.2.4 Metodologia para avaliação de extratos e substâncias antivirais <i>in vitro</i> .....	17
<b>CAPÍTULO I: OCORRÊNCIA DE ANTICORPOS NEUTRALIZANTES PARA O HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 1 EM REBANHOS DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO. ....</b>	<b>21</b>
RESUMO .....	22
ABSTRACT .....	23
1. Introdução .....	24
2. Material e Métodos .....	25
3. Resultados e Discussão.....	26
4. Conclusões .....	33

<b>CAPÍTULO II: DETECÇÃO DE ANTICORPOS NEUTRALIZANTES PARA O HERPESVÍRUS BOVINO EM COLOSTRO .....</b>	<b>34</b>
RESUMO .....	35
ABSTRACT .....	36
1. Introdução .....	37
2. Material e Métodos .....	39
3. Resultados e Discussão.....	40
4. Conclusões .....	42
<b>CAPÍTULO III: MONITORAMENTO DE ANTICORPOS NEUTRALIZANTES PARA O HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 1 EM BEZERROS LEITEIROS. ....</b>	<b>43</b>
RESUMO .....	44
ABSTRACT .....	45
1. Introdução .....	46
2. Material e Métodos .....	47
3. Resultados e Discussão.....	48
4. Conclusões .....	51
<b>CAPÍTULO IV: ATIVIDADE ANTIVIRAL DE <i>KALANCHOE BRASILIENSIS</i> (“SAIÃO”) FRENTE AO HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 1 <i>IN VITRO</i>. ....</b>	<b>52</b>
RESUMO .....	53
ABSTRACT .....	54
1. Introdução .....	55
2. Material e Métodos .....	57
3. Resultados e Discussão.....	58
4. Conclusões .....	60
<b>CAPÍTULO V: PERSPECTIVAS DO TRATAMENTO HOMEOPÁTICO NAS INFECÇÕES HERPÉTICAS DE BOVINOS. ....</b>	<b>61</b>
RESUMO .....	62
ABSTRACT .....	63
1. Introdução .....	64
2. Discussão .....	65
3. Conclusões .....	67
<b>CAPÍTULO VI: CONTROLE DAS INFECÇÕES PELO HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 1 NO BRASIL.....</b>	<b>68</b>
RESUMO .....	69
ABSTRACT .....	70
1. Introdução .....	71
2. Discussão .....	73

3. Conclusões .....	80
<b>4. CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>81</b>
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>82</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>96</b>
Anexo I: Titulação pelo Método de Reed & Muench (1938) .....	97
Anexo II: Isolamento do Herpesvírus Bovino tipo 1 a partir de espécimens clínicos (OIE, 2004a).....	101

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O Herpesvírus Bovino tipo 1 (BHV-1) é conhecido genericamente como o agente etiológico da IBR (Rinotraqueíte Infecciosa Bovina), da IPV (Vulvovaginite Pustular Infecciosa) e da IPB (Balanopostite Pustular infecciosa), e está disseminado em rebanhos bovinos e bubalinos do Brasil e do mundo, causando prejuízos econômicos e sanitários à atividade pecuária. Sendo objeto de controle em todo o mundo, mas com poucas alternativas viáveis na situação atual do rebanho brasileiro, urge a definição de novas estratégias de controle da infecção, que serão de grande interesse no combate da doença em todo o mundo. A importância da IBR tem sido tão marcante que a enfermidade será a próxima barreira sanitária ao comércio internacional de bovinos e correlatos na União Européia (VAN OIRSCHOT *apud* TEIXEIRA *et al.*, 2001).

O controle da doença é dificultado por tratar-se de uma herpesvirose, cujo agente infecta persistentemente os animais acometidos. A alta prevalência torna inviável o sacrifício sistemático dos animais acometidos, como ocorre nos países de pequeno rebanho. Em nosso país a situação se complica pelo grande número de rebanhos infectados, o problemático controle do trânsito de animais, e de possíveis carreadores. A vacinação não protege da infecção, prejudica a identificação dos animais portadores e, no caso de vacinas atenuadas, pode estabelecer infecção latente.

Neste trabalho abordamos aspectos clínicos e epidemiológicos da doença, avaliando o status da infecção pelo BHV-1 no Estado do Rio de Janeiro. Também propomos uma nova metodologia para o diagnóstico de matrizes infectadas pelo BHV-1 e avaliamos a eficiência da imunização passiva, apresentamos propostas de controle da doença com tratamentos homeopáticos e fitoterápicos, revisamos a literatura referente à vacinação contra a doença e sugerimos medidas para o controle da doença em rebanhos do Estado do Rio de Janeiro.

## 1.1. Objetivos

- Estudar a infecção pelo BHV-1 em rebanhos bovinos do Estado do Rio de Janeiro, determinando a sua ocorrência ou ausência, e abordando aspectos clínicos e controle.
- Avaliar a possibilidade de utilização da técnica de neutralização em microplacas para determinar a presença de anticorpos contra o BHV-1 no colostro, e sua aplicação no incremento da detecção de fêmeas positivas no rebanho.
- Avaliar a atividade virucida potencial do extrato puro de *Kalanchoe brasiliensis* (“saião”) frente ao BHV-1.
- Estudar a viabilidade da utilização de bioterápicos homeopáticos no controle da infecção pelo BHV-1 em rebanhos bovinos.
- Estudar a aplicabilidade da vacinação como ferramenta para o controle das infecções pelo BHV-1 em rebanhos bovinos, abordando proteção, imunidade passiva, latência e reativação viral.
- Propor medidas para o controle da infecção pelo BHV-1 no Estado do Rio de Janeiro.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. O Vírus

#### 2.1.1. Propriedades Virais

O Herpesvírus Bovino tipo 1 (BHV-1) pertence à subfamília *Alphaherpesvirinae* da família *Herpesviridae*, Gênero *Varicellovirus* (ROIZMAN *et al.*, 1995).

Como para os outros herpesvírus, seu genoma é constituído por uma molécula única de DNA de dupla fita, que é infecciosa sob condições experimentais. Os virions são envelopados, com cerca de 150 nanômetros de diâmetro, e contem um nucleocapsídeo de simetria icosaédrica composto de 162 capsômeros, sendo 150 hexâmeros e 12 pentâmeros. (MURPHY *et al.*, 1999).

Os membros da subfamília *Alphaherpesvirinae* caracterizam-se por apresentar uma série moderada de hospedeiros, um ciclo replicativo curto (menor que 20 horas), com rápido aparecimento e disseminação em cultivo celular e capacidade de estabelecer infecções latentes (ROIZMAN *et al.*, 1981). O BHV-1 permanece em estado de latência nos gânglios nervosos, principalmente no trigêmeo e sacral (ACKERMANN *et al.*, 1982).

Herpesvírus possivelmente também estabelecem latência em outras células, como por exemplo linfócitos (ENGELS, 2000; WINKLER *et al.*, 2002). Leucócitos do sangue periférico podem portar o BHV-1 (FUCHS *et al.*, 1999; MWEENE *et al.*, 1996). A latência, seguida por reativação e liberação de vírus, é o mecanismo primordial para os herpesvírus sobreviverem na natureza (ENGELS, 2000). Assim, tendo sofrido infecção primária, o animal será portador do BHV-1 por toda a sua vida, potencialmente atuando como fonte de infecção para indivíduos susceptíveis, assegurando a permanência da infecção no plantel (LEMAIRE *et al.*, 1994).

As proteínas virais são de crescente interesse no desenvolvimento de vacinas e testes diagnósticos. Os herpesvírus contêm mais de 30 proteínas estruturais, das quais seis estão presentes no nucleocapsídeo, duas estão associadas ao DNA e cerca de 12 são glicoproteínas de envelope, a maioria projetada como peplômeros. A glicoproteína E (gE) tem atividade sobre o receptor Fc e se liga à IgG normal (MURPHY *et al.*, 1999). A gB é essencial para a replicação do BHV-1 e para o processo de fusão de membranas que leva à penetração do vírus

na célula alvo e disseminação direta do BHV-1 das células infectadas às não infectadas, e pode ser usada como transportadoras de peptídeos e proteínas (KEIL *et al.*, 2005).

### **2.1.2. Espécies Suscetíveis**

O BHV-1 causa doença em bovinos domésticos e selvagens (OIE, 2004a). Há, também, relatos de doença e resposta imunológica em ovinos e caprinos (WHETSTONE & EVERMANN, 1988; LEHMKUHL *et al.*, 1985; CARDOS *et al.*, 1991) e de isolamentos em búfalos (GIBBS & RWEYEMAMU, 1977; IBRAHIM *et al.*, 1983), suínos (KAHRS, 1977; GIBBS & RWEYEMAMU, 1977), e lhamas (WILLIAMS *et al.*, 1991). Infecção natural e experimental também foi reportada em capivaras (*Hydrochoerus hydrochoeris* Lin) (BOHRER *et al.*, 1987).

Anticorpos contra o BHV-1 foram encontrados também em espécies de veados como o “white-tailed deer” (*Odocoileus hemionus*) e o “red deer” (*Cervus elaphus*) (GIBBS & RWEYEMAMU, 1977). INGLIS *et al.*, (1983) descreveram o primeiro isolamento do BHV-1 em “red deer” (*Cervus elaphus*) associado à doença ocular. No Alaska foram encontrados anticorpos contra o BHV-1 em “caribou” (*Rangifer tarandus*) (ZARNKE, 1983).

## **2.2. A Doença**

### **2.2.1. Importância Econômica e Sanitária das Infecções pelo Herpesvírus Bovino tipo 1**

O impacto econômico da infecção pelo BHV-1 pode ser observado pelo retardo do crescimento de animais jovens, queda da produção leiteira, abortos e natimortos e a reduzida eficiência reprodutiva de matrizes e touros (LEMAIRE *et al.*, 1994). Acrescentam-se as restrições ao comércio internacional de animais vivos e seus produtos, como sêmen, embriões e produtos de biotecnologia, previstas no Código Sanitário para Animais Terrestres (OIE, 2004b). A herpesvirose bovina, além das perdas econômicas, pode apresentar sintomatologia semelhante à da Febre Aftosa e outras enfermidades vesiculares, de forma que o diagnóstico diferencial de laboratório passou a ser exigido. A alta prevalência de animais positivos representa um sério risco para a atividade pecuária, considerando-se a recidividade da infecção, que apresenta uma forma latente (subclínica), facilmente despercebida dos profissionais e criadores envolvidos com a bovinocultura (GRÉGIO, 1999).

### **2.2.2. Distribuição**

O vírus está distribuído mundialmente, atingindo bovídeos domésticos e selvagens, mas foi erradicado da Áustria, Dinamarca, Finlândia, Suíça e Suécia, e programas de controle

foram iniciados em outros países europeus (OIE, 2004a). No Brasil a doença tem sido diagnosticada por sorologia, o que demonstra ser a infecção mais freqüente do que o suposto. O BHV-1 encontra-se disseminado nos rebanhos bovinos leiteiros e de corte de diversos estados brasileiros (CONTREIRAS *et al.*, 1986; PITUCO, 1988; ANUNCIACÃO *et al.*, 1989; RAVAZZOLO *et al.*, 1989; LOVATO *et al.*, 1995; VIDOR *et al.*, 1995; GRÉGIO, 1999). Tanto no Brasil como em outros países da América do Sul há grande variedade de resultados, em consequência do uso de diferentes técnicas de amostragem, de diagnóstico laboratorial e de diferenças regionais (PITUCO, 1988). Entretanto, conclui-se que o BHV-1 está distribuído em vários países, afetando rebanhos bovinos de corte e leite e provocando distúrbios respiratórios e reprodutivos. Há necessidade de pesquisas mostrando o impacto econômico desta doença no Brasil (PITUCO & DEL FAVA, 1998).

### **2.2.3. Transmissão e Patogenia**

O BHV-1 é eliminado pelas secreções respiratórias, oculares, genitais e sêmen de animais infectados. Sua transmissão se dá principalmente por contato direto (gotículas), sendo também possível a transmissão indireta por fômites, em intervenções cirúrgicas, líquidos e tecidos fetais e embriões contaminados. A inseminação artificial também representa um importante papel na entrada do vírus em rebanhos livres (LEMAIRE *et al.*, 1994).

O período de incubação, para efeitos do Código Sanitário para Animais Terrestres (OIE, 2004b) é de 21 dias, mas este período, na verdade, é variável. O vírus entra no animal pelas vias aéreas e replica-se a altos títulos nas membranas mucosas do trato respiratório superior e nas tonsilas. Dissemina-se para a conjuntiva e através de axônios neuronais alcança o gânglio trigêmeo. Um baixo grau de viremia pode ocorrer ocasionalmente (OIE, 2004a). Embora os neurônios sensoriais do gânglio trigêmeo sejam o sítio primário de latência do BHV-1, os genomas virais podem ser detectados nas tonsilas de bezerros latentemente infectados (PEREZ *et al.*, 2005).

Após a infecção genital o BHV-1 se replica nas membranas mucosas da vagina e do prepúcio, e se torna latente no gânglio sacral (OIE, 2004a).

A lesão primária é uma necrose focal da membrana mucosa nasal, laringeal, traqueal ou genital. A lesão é provavelmente a consequência direta da replicação viral e efeito citopático subsequente. O animal reage por intensa resposta inflamatória. As lesões podem coalescer e formar grandes pústulas que consistem de infiltrados maciços de leucócitos (OIE, 2004a).

A infecção aguda pelo BHV-1 induz apoptose em células linfóides (WINKLER *et al.*, 1999) e determina uma imunossupressão transitória que pode levar à pneumonia bacteriana e morte (PEREZ *et al.*, 2005). A imunossupressão pode ser associada diretamente com a indução de apoptose nas células infectadas (YAZICII *et al.*, 2004).

LEITE *et al.* (2005) verificaram que a infecção pelo BHV-1 e a conseqüente liberação de interleucina-1 $\beta$  e talvez de outras citocinas inflamatórias pode incrementar a ligação e os efeitos biológicos dos leucócitos. Eles observaram, no mesmo experimento, que a infecção de células mononucleares do sangue periférico pelo BHV-1 aumenta sua suscetibilidade à leucotoxina de *Mannheimia haemolytica*.

Após a infecção, a liberação nasal de vírus é detectável por 10-14 dias com picos de  $10^8$ -  $10^{10}$  TICD<sub>50</sub> de títulos virais/ mL de secreção nasal. A dose mínima infectiva não é conhecida. A infecção normalmente induz resposta humoral e celular em 7-10 dias (OIE, 2004a).

#### **2.2.4. Formas clínicas da infecção pelo Herpesvírus Bovino tipo 1 (BHV-1)**

A extensa variedade de manifestações clínicas associadas com o BHV-1 é causadora de dúvidas quanto ao diagnóstico. A conseqüência de uma infecção natural é provavelmente determinada multifatorialmente pelas cepas virais, pela dose infectante e via de exposição ou inoculação, pelo estado imunológico do animal exposto e pelos fatores ambientais (KAHRS, 1977). O vírus é conhecido genericamente como o agente etiológico da enfermidade conhecida como IBR (Rinotraqueíte Infecciosa Bovina), porém outras manifestações clínicas da infecção pelo BHV-1 têm uma denominação específica, como IPV (Vulvovaginite Pustular Infecciosa) e IPB (Balanopostite Pustular infecciosa). Outras manifestações incluem conjuntivites, abortos, encefalomiélites, mastites, metrites, infertilidade, infecções sistêmicas em animais jovens, sendo ainda responsável pelo nascimento de animais débeis e quadros de enterite, causando a morte de neonatos (LEMAIRE *et al.*, 1994). Ocorre queda na produção de leite e retardo no ganho de peso (OIE, 2004a). Infecções bacterianas secundárias podem levar a quadros mais severos (OIE, 2004a; RADOSTITS *et al.*, 2002). A mortalidade é baixa na doença não-complicada, mas a prevalência é alta, com muitas infecções subclínicas (OIE, 2004a). Ocasionalmente, as formas clínicas se sobrepõem (GRÉGIO, 1999). Todos esses diferentes sintomas clínicos são observados em outras doenças infecciosas e o diagnóstico clínico é impossível.

#### *a) Doença Respiratória e Ocular*

O vírus infecta as cavidades nasais e o trato respiratório superior, resultando em rinite, laringite e traqueíte. A doença também é conhecida como “nariz vermelho”, pela hiperemia grave da mucosa nasal. A tonsila faríngea é prontamente infectada pelo vírus, sendo importante tecido linfóide para respostas antivirais precoces. A traquéia perde seus cílios e há um desnudamento quase completo das células colunares traqueais, prejudicando os mecanismos de defesa do trato respiratório. A disseminação para os tecidos oculares provavelmente ocorre através dos ductos lacrimais e causa conjuntivite com edema e tumefação da conjuntiva, formação de placa multifocal nas conjuntivas, edema corneal periférico e vascularização profunda (RADOSTITS *et al.*, 2002).

Os sinais clínicos mais evidentes são relacionados ao trato respiratório superior, como descarga nasal mucopurulenta (OIE, 2004a). Após dois a quatro dias de incubação, há o estabelecimento repentino de anorexia, tosse, febre (até 42°C), hiperemia com focos de necrose nas mucosas do septo nasal, corrimento ocular e nasal seroso profuso, sialorréia e, às vezes, ligeira hiperexcitabilidade (RADOSTITS *et al.*, 2002). Em poucos dias, a descarga nasal e ocular se torna mucopurulenta. As lesões necróticas no nariz podem progredir a pústulas e úlceras cobertas por pseudomembranas que obstruem as vias aéreas superiores e levam à respiração oral (OIE, 2004a). A respiração fica aumentada em frequência e profundidade. A traqueíte pode provocar dispnéia inspiratória com sons de respiração traqueal anormais transmitidos para os pulmões; a angústia respiratória é evidente ao exercício. Tosse curta e explosiva é característica de alguns surtos. A morte súbita, em 24 horas após os primeiros sinais, pode resultar de bronquiolite obstrutiva intensa. Algumas mortes podem ocorrer no período febril agudo, mas a maior parte dos casos fatais se deve à broncopneumonia secundária e ocorrem após a doença prolongada até quatro meses. Alguns animais recuperados podem apresentar respiração ruidosa persistente e mucosa nasal macroscopicamente espessada e áspera, acompanhada por corrimento nasal (RADOSTITS *et al.*, 2002).

A conjuntivite é um achado comum na forma respiratória (OIE, 2004a), mas podem ocorrer surtos como o principal achado clínico (RADOSTITS *et al.*, 2002). A conjuntivite é facilmente diagnosticada, porém com muita frequência confundida com a ceratoconjuntivite causada pela *Moraxella bovis*. Porém, as lesões da herpesvirose se restringem à conjuntiva, sendo a única lesão corneal observada o edema difuso (RADOSTITS *et al.*, 2002).

### *b) Encefalite*

A meningoencefalite geralmente aparenta ser o resultado de uma infecção com um herpesvírus estreitamente relacionado, porém distinto, chamado recentemente BHV-5, embora a infecção pelo BHV-1 possa esporadicamente causar meningoencefalite (OIE, 2004a).

O vírus provavelmente infecta o cérebro se disseminando a partir da mucosa nasal via nervo periférico trigêmeo para o gânglio trigêmeo, resultando em encefalite não-supurativa; todavia, sempre se suspeitou de viremia. Pode haver ganglionite do trigêmeo e encefalite não-fatal. Encefalite grave ocorre experimentalmente em bezerros privados de colostro.

Os bezerros de menos de seis meses de idade podem desenvolver encefalite, com incoordenação, excitação alternada com depressão e alta taxa de mortalidade. Salivação, mugidos, convulsões e cegueira também são relatados (RADOSTITS *et al.*, 2002).

### *c) Doença Genital*

O surto de doença respiratória ou ocular é seguido por abortos, ou estes últimos sucedem a vacinação parenteral do rebanho quando se utilizam vacinas atenuadas contra o BHV-1, sendo mais comum em vacas com seis a oito meses de prenhez ou cerca de 90 dias após a vacinação ou doença natural. Segue-se retenção de placenta, mas a infertilidade residual é importante. Endometrite, concepção deficiente e estro curto podem ocorrer após inseminação com sêmen infectado (RADOSTITS *et al.*, 2002; KENDRICK & McENTREE, 1987). A doença genital pode ser transmitida por monta natural e algumas vezes por infecções nasais (KAHRS, 1977).

A vulvovaginite pustular infecciosa caracteriza-se por micção freqüente, elevação da cauda e corrimento vaginal moderado, tumefação da vulva e aparecimento de pequenas pápulas e em seguida erosões e úlceras na superfície mucosa, que podem coalescer e necrosar. Lesões semelhantes ocorrem na glândula peniana e mucosa prepucial, na balanopostite pustular infecciosa (RADOSTITS *et al.*, 2002).

O vírus pode ser transportado por leucócitos periféricos para a placenta e transferido ao feto, causando aborto. O feto é altamente suscetível ao vírus, que causa infecção hiperaguda geralmente fatal. A infecção no último trimestre da gestação pode resultar em mumificação, aborto, natimorto ou bezerros fracos com as lesões usuais da IBR, bem como lesões do estômago e intestino produzidas pela administração experimental do vírus virulento a bezerros recém-nascidos (RADOSTITS *et al.*, 2002).

#### *d) Forma Sistêmica em Animais Jovens*

A invasão sistêmica pelo vírus é seguida por sua localização em vários tecidos diferentes. Ocorrem lesões necróticas focais nas vísceras e gastroenterite proeminente (VAN OIRSCHOT *et al.*, 1993).

Há inflamação e necrose graves dos tratos respiratório e alimentar, como faringe, esôfago, pulmões, laringe, linfonodos, fígado, além de nefrite e encefalite. A mucosa bucal está hiperêmica, com erosões no palato mole cobertas por muco, e faringite aguda com exsudato mucopurulento. Ocorre anorexia súbita, febre, sialorréia e rinite, freqüentemente acompanhada por conjuntivite, grave edema laríngeo e angústia respiratória, que resultam em dificuldade de deglutição e pneumonia por aspiração. A broncopneumonia é freqüente e os sons respiratórios altos, com crepitações e sibilos associados à consolidação. Ocorre diarréia provavelmente relacionada a lesões ruminais. Em bovinos de corte em engorda a doença é fatal, caracterizada por erosão e ulceração difusas do trato alimentar superior (RADOSTITS *et al.*, 2002).

### **2.3. Diagnóstico**

A suspeita da doença se baseia em sinais clínicos, patológicos e epidemiológicos, mas exames laboratoriais são requeridos para o diagnóstico definitivo, com a detecção do BHV-1 ou de seus compostos e determinação de anticorpos específicos para o agente (OIE, 2004a).

Na necropsia se observam rinite, laringite e traqueíte. Para o diagnóstico laboratorial se coletam membranas mucosas do trato respiratório e porções de tonsila, pulmão e linfonodos bronquiais (OIE, 2004a).

Nos casos de aborto, focos de necrose estão presentes em vários tecidos, particularmente no fígado fetal. Colher o fígado, pulmão, baço e rins do feto e cotilédones placentários. Enviar as amostras em gelo para o laboratório o mais brevemente possível (OIE, 2004a).

Os métodos de detecção do DNA viral estão em desenvolvimento, e a técnica da PCR se provou particularmente útil para a testagem de amostras de sêmen (OIE, 2004a).

Para o diagnóstico virológico, deve-se colher espécimens clínicos segundo a manifestação da doença, ainda durante a fase aguda. Colher suabes do exsudato nasal de animais com a forma respiratória da infecção, sêmen e suabes da mucosa vaginal, vulva e prepúcio e de lesões vesiculares de úbere e tetos dos animais que apresentarem a forma

genital. Em casos de conjuntivite, colher suabes do saco conjuntival. Tecidos de fetos abortados ou animais necropsiados são colhidos, conforme as recomendações da Organização Internacional de Saúde Animal (OIE, 2004a). Lavados prepuciais com salina também podem ser usados para o isolamento viral. Os espécimens devem ser acondicionados em meio de transporte viral, resfriados a 4°C e rapidamente remetidos ao laboratório. No laboratório, as amostras são processadas conforme as recomendações da Organização Internacional de Saúde Animal (OIE, 2004a). A presença do vírus é evidenciada pela observação ao microscópio, em cerca de 72 horas pós-inoculação, do efeito citopatogênico característico, do tipo hidrópico e em cacho de uva, com o aparecimento de inclusões virais intranucleares do tipo A de Cowdry (CHEATHAN & CRANDELL, 1957).

Para o diagnóstico sorológico, o teste de neutralização viral e vários ELISAs são os mais usados para a detecção de anticorpos. Os anticorpos podem ser detectados no leite com um ELISA (OIE, 2004a). O teste de soroneutralização e os ELISAs para detecção da gB são os testes mais sensíveis para detecção de anticorpos para o BHV-1 no soro bovino, enquanto para o exame de amostras de leite os ELISAs indiretos são os testes de escolha (KRAMPS *et al.*, 2004). O ensaio do IFN- $\gamma$  não pode detectar portadores latentes soronegativos, mas pode diferenciar bezerros infectados de bezerros imunizados passivamente (LEMAIRE *et al.*, 2000a).

### **3. MÉTODOS E PROCEDIMENTOS DA PESQUISA**

#### **3.1. Material**

##### **3.1.1 Amostra do vírus**

O vírus BHV-1, amostra Cooper (Cooper strain, NVSL, Ames, Iowa), foi cedido pelo Centro Panamericano de Febre Aftosa, mantido e replicado no Laboratório e estocado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  até a nova inoculação, praticada a intervalos regulares para manutenção da amostra. A amostra é titulada em células MDBK e o título infeccioso ( $\text{TICD}_{50}$ ) calculado pelo método de Reed & Muench (1938).

##### **3.1.2 Sistema hospedeiro**

Células da linhagem MDBK (Maidin Darby Bovine Kidney), cedidas pelo Centro Panamericano de Febre Aftosa (Duque de Caxias, RJ) foram cultivadas em monocamadas em meio de cultura MEM (Minimum Essencial Medium) tipo Glasgow modificado, adicionado de 2 mL de solução de L-glutamina, 4 mL de antibióticos (2 mL de penicilina e 2 mL de estreptomicina), 4 mL de anfotericina B e 10% de soro fetal bovino no momento do uso (ANDRADE, 2000).

##### **3.1.3 Meios e soluções**

Os meios e soluções utilizados – Meio de cultura MEM (Minimum Essencial Medium) tipo Glasgow modificado, Solução de Estreptomicina, Solução de Penicilina, Solução de Anfotericina B, Solução de Glutamina, Solução de Tripsina e Soro Fetal Bovino livre de anticorpos – foram preparados no Laboratório de Viroses Veterinárias segundo os protocolos propostos por Andrade (2000), a partir de insumos básicos certificados e de categoria *pro analysis*.

##### **3.1.4 Extratos de plantas**

Foram preparados a partir das folhas de *Kalanchoe brasiliensis* (“saião”) por infusão em álcool etílico durante 24 horas, filtrados em membrana Millipore 0,22  $\mu\text{m}$  por pressão positiva e preparados em ambiente estéril.

## 3.2. Método

### 3.2.1 Modo de Preparo das Soluções (ANDRADE, 2000)

#### 1. Meio de cultura MEM (Minimum Essential Medium) tipo Glasgow modificado

Misturou-se 14,22 g de MEM Glasgow pó + 2,75 g de  $\text{NaHCO}_3$  + água bidestilada q.s.p. 1000 mL, mantendo sob agitação. O pH é ajustado para 6,8 através da utilização de  $\text{CO}_2$ . Esterilizou-se por filtração com membrana Millipore de  $0,22\mu$  usando pressão positiva e estocou-se em refrigerador a  $4^\circ\text{C}$  até o momento de seu uso (Figura 1).



**Figura 1.** Filtragem do MEM em membrana Millipore, usando pressão positiva, em capela de fluxo laminar horizontal.

#### 2. Solução de Estreptomicina

Diluiu-se 1 frasco-ampola de 1 g de estreptomicina (Sulfato de Estreptomicina, Laboratórios Wyeth Ltda.) em 10 mL de água bidestilada estéril. Diluiu-se a solução obtida a 1:50 em água bidestilada estéril. Aliquotou-se a 2 mL por tubo e estocou-se a  $-20^\circ\text{C}$  até o uso.

#### 3. Solução de Penicilina

Diluiu-se 1 frasco-ampola de 1.000.000 UI de benzilpenicilina potássica (Penicilina G Potássica, Laboratórios Wyeth Ltda.) em 10 mL de água bidestilada estéril. Fez-se uma segunda diluição a 1:50 em água bidestilada estéril. Aliquotou-se a 2 mL por tubo e estocou-se a  $-20^\circ\text{C}$  até o uso.

#### **4. Solução de Anfotericina B**

Diluiu-se 1 frasco-ampola de 50 mg de anfotericina B (Fungizon ®, Gibco Laboratories) em 10 mL de água bidestilada estéril, misturou-se com 10 mL de água bidestilada estéril e diluiu-se a solução obtida a 1:160 de água bidestilada estéril. Aliquotou-se a 4 mL por tubo e estocou-se a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o uso.

#### **5. Solução de Glutamina**

Diluiu-se 30 g de L-glutamina (L-glutamine, Gibco Laboratories) em 1000 mL de água bidestilada estéril. Distribuir 4 mL por tubo e estocou-se a  $4^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso.

#### **6. Solução de Tripsina**

Misturou-se, seqüencialmente, 8,00 g de NaCl + 0,38g de KCl + 0,10g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  + 1,00 g de dextrose. Dissolveu-se em 700 mL de água destilada. Adicionou-se HCl N/1 até pH 7,7. Adicionou-se então 1,50 mL de Vermelho de fenol a 1% + 100.000 UI de penicilina + 0,10 g de estreptomicina. Completou-se o volume para 1.000 mL com água destilada. Adicionou-se 2,50 g de Tripsina (1:250, Difco), manteve-se sob agitação constante até a dissolução completa e deixou-se por uma noite a  $4^{\circ}\text{C}$ . Esterilizou-se em membrana Millipore de  $0,22\mu$  usando pressão positiva, aliquotou-se a cada 100 mL e estocou-se a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### **7. Tratamento do soro bovino com PEG 8.000**

Dissolveu-se 800 g de PEG-6.000 em 1L de solução salina 0,85% (volume final = aprox. 1700 mL); adicionou-se esta solução a 10 L de soro; agitou-se em banho de gelo durante 60 minutos; houve separação de um precipitado. Centrifugou-se a  $2.000 \times g$  durante 30 minutos a  $20^{\circ}\text{C}$ , recolheu-se o sobrenadante, filtrou-se através de membrana Millipore  $0,22\mu$  usando pressão positiva, aliquotou-se a cada 10 mL e estocou-se a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### **3.2.2 Técnica de Cultivo Celular**

As passagens das células da linhagem MDBK eram realizadas, em média, a cada três dias, propagadas na ordem 1 x 4, em capela de fluxo laminar horizontal.

- Escolhia-se uma garrafa de cultivo que apresente monocamada celular confluenta (Figura 2)

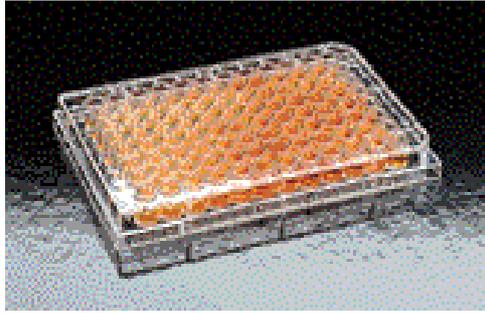


**Figura 2.** Garrafa de cultivo com monocamada de células MDBK.

- Colocavam-se as soluções em banho-maria (37°C)
- Prevenia-se a formação de aerossóis contaminadores em potencial das culturas, flambando todos os bordos dos recipientes antes de colocá-los dentro da capela de fluxo laminar.
- Desprezava-se o meio de cultura antigo em recipiente próprio.
- Lavava-se, com volume de solução de tripsina suficiente para cobrir o fundo da garrafa de cultivo, primeiro as paredes opostas à monocamada e desprezava-se a tripsina.
- Colocava-se o mesmo volume, mas desta vez deixava-se a tripsina atuar sobre a monocamada celular.
- Agitava-se o frasco contra a mão até que a monocamada se desprendesse do frasco.
- Agitava-se com pipeta para completa individualização das células, observando o tempo, para que a tripsina não inviabilizasse as células.
- Calculava-se o volume de garrafas para esta nova partida na ordem de 1 x 4, calculando o volume total de MEM a ser adicionado e acrescentava-se então soro fetal bovino na quantidade de 10% do volume final para paralisar a ação da tripsina.
- Completava-se para o volume calculado com MEM Glasgow modificado adicionado de L-glutamina, antibióticos e anfotericina B e distribuía-se em garrafas de cultivo com rolhas de borracha estéreis.
- Anotava-se na garrafa nome da linhagem celular, n°. da passagem e data.
- Visualizava-se ao microscópio invertido.
- Acompanhava-se o desenvolvimento da monocamada ao microscópio invertido.

### **3.2.3 Técnica de Soroneutralização (LENNETE *et al.*, 1995)**

As amostras de soro eram examinadas pela técnica de soroneutralização em microplacas de 96 cavidades (Figura 3), segundo Lennete *et al.*, 1995.



**Figura 3.** Microplacas de 96 cavidades, fundo chato, para execução dos testes de soroneutralização.

Separavam-se os materiais para a execução do teste de soroneutralização e levava-se à capela de fluxo laminar, conforme a Figura 4:

- a) Pipetas Pasteur estéreis e bomba de vácuo para aspiração do meio usado para o cultivo das monocamadas celulares em placas de 96 cavidades.
- b) Pipetador Eppendorf e ponteiras Eppendorf estéreis de volumes: 1  $\approx$  10  $\mu$ L; 1  $\approx$  50  $\mu$ L; 1  $\approx$  250  $\mu$ L.
- c) Pipetadores de volume variável de 20  $\mu$ L a 50  $\mu$ L.
- d) Ponteiras estéreis para volumes de 20  $\mu$ L a 200  $\mu$ L.

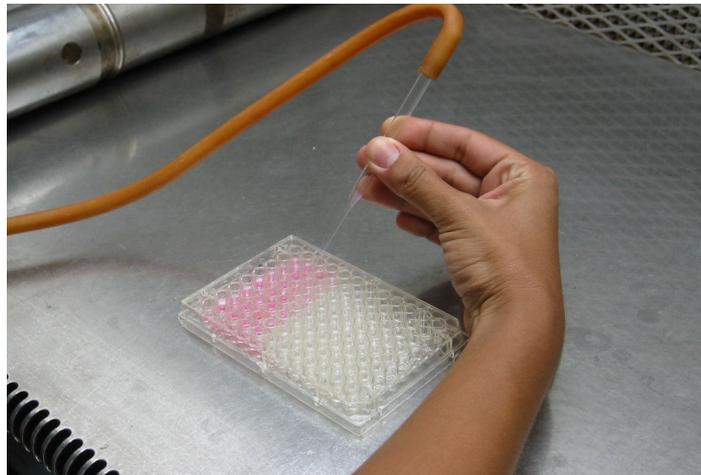


**Figura 4.** Capela de Fluxo Laminar preparada para a execução do teste de soroneutralização.

- e) Pipetas estéreis de vidro nos volumes 1/100 mL para as diluições dos soros e 10 mL para diluição do antígeno.
- f) Frascos pequenos para diluição viral e estoque do meio de cultivo celular.
- g) Banho de gelo para a solução contendo o vírus BHV-1.

- h) Meio de cultivo celular MEM tipo Glasgow modificado acrescido de antibióticos e anfotericina B.
- i) Estante para tubos 13x70 mm.
- j) Tubos de ensaio 13x70 mm estéreis em quantidade suficiente para realização das diluições do antígeno e dos soros a serem testados.
- k) Rolhas de borracha ou silicone estéreis, tamanho 00, para incubação das diluições nos tubos.
- l) Proveta estéril para elaboração da diluição viral a 100 TICD<sub>50</sub>.
- m) Painel de soros a serem testados.

Eram preparadas, então, diluições a 1:10, 1:20, 1:40 e 1:80 de cada soro em MEM acrescido de antibiótico e fungistático, utilizando-se tubos 13x70 mm. O vírus BHV-1 era diluído em MEM acrescido de antibióticos e fungistático, de modo a obter 100 TICD<sub>50</sub>. Misturavam-se iguais volumes de cada diluição sérica com a diluição viral (500 µL da diluição viral + 500 µL da diluição do soro) em tubos 13x70 mm, colocava-se rolha em cada tubo para evitar a perda de CO<sub>2</sub> e conseqüente mudança de pH do meio de cultivo, agitava-se suavemente e incubava-se durante 60 minutos em banho de gelo. As monocamadas confluentes previamente cultivadas nas microplacas tinham o meio de cultivo aspirado (Figura 5).



**Figura 5.** Aspiração do meio de cultivo celular das cavidades com monocamadas confluentes.

Distribuía-se 40 µL (20% do volume final do orifício) de cada diluição em duas cavidades da microplaca, exceto nos orifícios que constituíam os controles negativo (somente MEM) e positivo (BHV-1 diluído em MEM contendo 100 TICD<sub>50</sub>), anotando-se a respectiva localização de cada diluição na placa de teste. Aguardava-se uma hora e

completava-se cada cavidade com 150  $\mu$ L de MEM sem adição de soro, colocava-se as microplacas em câmara com atmosfera de CO<sub>2</sub> proporcionada pela adição de uma parte de ácido sulfúrico (5 mL) a duas partes de solução de bicarbonato de sódio 1M (10 mL) em bécher de vidro colocado no interior da câmara. Selava-se rapidamente a câmara para evitar perda de CO<sub>2</sub> e incubava-se em estufa a 37°C, conforme mostrado na Figura 6. A leitura era realizada em microscópio invertido no período de 96 horas, até visualização do efeito citopatogênico nos controles positivos do experimento. A ausência de efeito citopatogênico nas cavidades-teste era indicativa da presença de anticorpos neutralizantes na diluição correspondente.



**Figura 6.** Câmara de CO<sub>2</sub> contendo as microplacas em teste, colocadas na estufa.

### **3.2.4 Metodologia para avaliação de extratos e substâncias antivirais *in vitro* (WIGG & COSTA, 2000)**

#### **Preparo**

Obter a substância nas formas:

- Extrato bruto aquoso (liofilizado ou não) ou etanólico;
- Substância pura, em pó ou cristais.

Os preparados têm de estar solubilizados para serem inoculados em cultivo celular. Soluçoes a 1% da substância em teste são preparadas com água destilada (se o produto for hidrossolovel) e dimetilsulfóxido (DMSO) (se não for hidrossolovel). Em seguida são diluídos em meio de cultivo celular e esterilizados em membrana Millipore de 0,22  $\mu$ m, aliquoteadas e estocadas a -20°C.

### **Determinação da citotoxicidade**

A dose citotóxica para 50% das monocamadas celulares confluentes ( $DT_{50}$ ) cultivadas em microplacas de 96 cavidades, fundo chato, é calculada pelo método de Reed & Muench (1938), para cada linhagem celular utilizada no experimento, observando-se as alterações morfológicas nas monocamadas tratadas com a substância, em contraste com as monocamadas não tratadas que constituem os controles do experimento.

### **Titulação viral**

A  $TICD_{50}$  do vírus para o qual se busca a substância antiviral é determinada pelo método de Reed & Muench (1938) a partir da inoculação de diluições decimais da suspensão viral em monocamadas celulares confluentes de linhagem susceptível ao vírus, cultivadas em microplacas de 96 cavidades, fundo chato, e observação de efeito citopatogênico característico do vírus, em contraste com as cavidades não-inoculadas que constituem os controles do experimento. A diluição viral usada na pesquisa de atividade antiviral será igual a  $100 TICD_{50}$ .

### **Pesquisa da atividade antiviral**

A atividade antiviral pode se verificar:

- a) pelo efeito virucida (inativação viral)
- b) pela interferência na interação vírus-célula

Para o primeiro caso, diluições seriadas a partir da  $TICD_{50}$  da substância são feitas em meio de cultivo celular, utilizando-se tubos de ensaio 13x70 mm e pipetas para 1mL 1/100. A suspensão viral com  $100 TICD_{50}$  do vírus é acrescentada em volume igual em cada tubo e então as misturas são incubadas em banho de gelo por 1 hora. Em seguida aspira-se o meio de cultivo das monocamadas cultivadas e acrescenta-se a mistura substância pesquisada + vírus na quantidade de 10% do volume da cavidade e incuba-se por 30 minutos a 37°C, completando-se logo após o volume da cavidade com meio de cultivo celular.

Para o segundo caso, diluições seriadas a partir da  $TICD_{50}$  da substância são feitas em meio de cultivo celular, utilizando-se tubos de ensaio 13x70 mm e pipetas para 1mL 1/100, e imediatamente são inoculadas nas cavidades cujo meio foi previamente aspirado, a 5% do volume final da cavidade. Aguarda-se 1 hora e acrescentam-se 5% do volume da cavidade de suspensão viral contendo  $100 TICD_{50}$ .

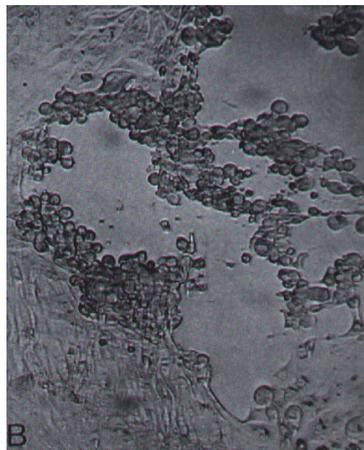
Incuba-se por 30 minutos a 37°C e completa-se o volume da cavidade com meio de cultivo celular.

Em cada placa de teste são procedidos controles da substância, controle da suspensão viral e controle celular.

A leitura é feita em microscópio invertido até 96 horas pós-inoculação (Figura 7). A evidência de atividade antiviral verifica-se pela inibição do efeito citopatogênico do vírus nas cavidades correspondentes (Figura 8).



**Figura 7.** Leitura dos testes em microscópio invertido.



**Figura 8.** Efeito citopatogênico característico dos herpesvírus.

### **Determinação do índice de inibição viral**

O índice de inibição viral é calculado pelo método de Reed & Muench ( $ED_{50}$  = concentração da substância que inibe 50% dos vírus). Comparando-se o teste no qual se trataram previamente as monocamadas com a substância com o teste no qual se utilizou incubação prévia de mistura soro-vírus, estima-se se a substância tem atividade virucida ou interfere na interação vírus-célula.

### **Determinação do índice terapêutico**

O índice terapêutico é calculado pela fórmula:

$$\text{IT} = \text{TICD}_{50} \text{ da substância} / \text{ED}_{50}$$

## **CAPÍTULO I**

# **OCORRÊNCIA DE ANTICORPOS NEUTRALIZANTES PARA O HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 1 EM REBANHOS DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO**

## RESUMO

SCHIAVO, Paula Amorim. **Ocorrência de Anticorpos Neutralizantes para o Herpesvírus Bovino tipo 1 em Rebanhos do Estado do Rio de Janeiro**. Seropédica: UFRRJ, 2005. 111 p. VI capítulos. (Dissertação, Mestrado em Medicina Veterinária).

O Herpesvírus Bovino tipo 1 (BHV-1) é responsável por grandes perdas econômicas e sanitárias na pecuária, com grande repercussão sobre a nutrição, produção e reprodução. Para determinar a soroprevalência do BHV-1 em rebanhos bovinos não-vacinados do Estado do Rio de Janeiro, utilizou-se a técnica de soroneutralização em microplacas de 96 cavidades, para análise de soros de bovinos distribuídos por rebanhos em vários municípios, desconsiderando-se a aptidão e a forma de exploração do rebanho. Usaram-se monocamadas de células da linhagem MDBK cultivadas em MEM Glasgow modificado. Diluições (1:10, 1:20, 1:40 e 1:80) de cada soro foram preparadas e misturadas com volumes iguais de 100 TICD<sub>50</sub> de BHV-1(cepa Cooper ) por 0,1 mL. Foram procedidos pelo menos 8 controles virais e 8 controles da monocamada celular em cada placa. As misturas foram inoculadas com volumes de 0,2 mL volumes em duplicata. As placas foram observadas a cada 24 h (até 96 h) para o diagnóstico de CPE. Em 121 soros colhidos em 22 municípios do Estado do Rio de Janeiro encontrou-se um total de 42,97% animais reagentes ao BHV-1 em 6/7 regiões fisiográficas do estado, sendo a Região Norte do estado aquela que apresentou o maior percentual de animais positivos (75,00%) entre os soros analisados e, em oposição, a região das Baixadas Litorâneas com o menor percentual de animais positivos (12,50%). Conclui-se que a infecção pelo BHV-1 constitui um risco para a pecuária no Rio de Janeiro e, como não se preconizam medidas de controle e a forma latente é subestimada pelos envolvidos com a atividade pecuária a disseminação potencial deve ser considerada.

**Palavras chave:** BHV-1; prevalência; Herpesviridae; soroneutralização.

## ABSTRACT

SCHIAVO, Paula Amorim. **Occurrence of Serum Neutralizing Antibodies to Bovine Herpesvirus type 1 in Cattle Herds from Rio de Janeiro State, Brazil**. Seropédica: UFRRJ, 2005. 111 p. VI chapters. (Dissertation, Master Science in Veterinary Medicine).

Bovine Herpesvirus type 1 (BHV-1) is responsible for great economical and sanitary losses in livestock, with great repercussion over nutrition, production of milk and reproduction. To design the seroprevalence of BHV-1 in non-vaccinated cattle herds from Rio de Janeiro State we used the microneutralization test. This test was performed in flat-bottomed microtiter plates with MDBK monolayers cultivated in MEM Glasgow culture medium, added with glutamine and antibiotics. Dilutions (1:10, 1:20, 1:40, and 1:80) of each sera were prepared and mixed with equal volumes of 100 TICD<sub>50</sub> per 0,1 mL of BHV-1 (Cooper strain). It was proceeded at least 8 wells of virus control and 8 wells of monolayer control in each plate. The mixtures were inoculated in 0,2 mL volumes into two culture wells each. The plates were observed every 24 h (till 96 h) for development of CPE. In 121 sera from 22 cities in Rio de Janeiro State we found a total of 42,97% of animals reagents to BHV-1 in 6/7 regions within the State. Analyzing all the results of our work on seroprevalence, we found 48,03% of the animals presenting neutralizing antibodies for BHV-1 in Rio de Janeiro. It has been concluded that the BHV-1 infection is prevalent within Rio de Janeiro State and, since no control measures have been carried and the latent form of the infection is often underestimated the potential dissemination must be considered.

**Key words:** BHV-1; prevalence; Herpesviridae; seroneutralization.

## 1. INTRODUÇÃO

Vários agentes infecciosos podem afetar a saúde de rebanhos bovinos e, conseqüentemente, seu desempenho zootécnico. O impacto econômico da infecção pelo Herpesvírus Bovino (BHV-1) pode ser observado pelo retardo do crescimento de animais jovens, queda da produção leiteira, abortos e natimortos e a reduzida eficiência reprodutiva de matrizes e touros (LEMAIRE *et al.*, 1994). Acrescentam-se ainda as restrições ao comércio internacional de animais vivos e seus produtos, como sêmen, embriões e produtos de biotecnologia, previstas no Código Sanitário Internacional para Animais Terrestres (OIE, 2004b). A alta incidência de animais positivos representa um sério risco para a atividade pecuária, principalmente considerando-se a insidiosidade da infecção, que apresenta uma forma latente, facilmente despercebida dos profissionais e criadores envolvidos com a bovinocultura, o que salienta a importância da identificação destes animais. O vírus está distribuído mundialmente, atingindo bovídeos domésticos e selvagens, mas tem sido erradicado dos países europeus (OIE, 2004a).

Os testes sorológicos preconizados são a prova de soroneutralização e alguns ELISAs (OIE, 2004a). Não se preconizam medidas para o controle da doença e a literatura relativa aos diagnósticos da infecção pelo BHV-1 no Estado do Rio de Janeiro é ainda carente. Os anticorpos podem ser detectados no leite com um ELISA (OIE, 2004a). O teste de soroneutralização e os ELISAs para detecção da gB são os testes mais sensíveis para detecção de anticorpos para o BHV-1 no soro bovino, enquanto para o exame de amostras de leite os ELISAs indiretos são os testes de escolha (KRAMPS *et al.*, 2004). O ensaio do IFN- $\gamma$  não pode detectar portadores latentes soronegativos, mas pode diferenciar bezerros infectados de bezerros imunizados passivamente (LEMAIRE *et al.*, 2000a).

Pela necessidade de informações quanto ao status da infecção pelo BHV-1 na população bovina do Estado do Rio de Janeiro, testamos os soros de 121 bovinos não-vacinados quanto a presença de anticorpos neutralizantes.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de soro foram obtidas de bovinos de rebanhos localizados no Estado do Rio de Janeiro, desconsiderando-se sexo, idade, raça e aptidão. Células da linhagem MDBK foram utilizadas para multiplicação viral, produção de antígenos e realização dos testes de soroneutralização. Monocamadas foram cultivadas em Meio Mínimo Essencial tipo Glasgow modificado adicionado de antibióticos, L-glutamina e 10% de soro fetal bovino. O vírus utilizado foi a amostra Cooper do BHV-1, proveniente da coleção do Centro Panamericano de Febre Aftosa. Os soros foram estudados em duplicata pela técnica de soroneutralização em microplacas de 96 cavidades segundo Lennete *et al.* (1995), com período de incubação de 1 h a 37°C, frente a 100 doses infectantes do BHV-1 para 50% dos cultivos celulares (100 TICD<sub>50</sub>), calculada pelo método de Reed & Muench (1938), nas diluições 1:10, 1:20, 1:40 e 1:80. Em cada placa se praticou ao menos um controle celular e um controle viral. A leitura das placas foi realizada com 48, 72 e 96 h após incubação em estufa a 37°C com atmosfera de CO<sub>2</sub>, para visualização do efeito citopatogênico. A última diluição na qual se observou 100% de inibição viral foi tomada como o título de anticorpos no soro pesquisado. Soros incapazes de inibir o ataque dos vírus às células foram considerados negativos para a presença de anticorpos anti-BHV-1 nas diluições pesquisadas.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram pesquisados os soros de 121 animais, distribuídos por 22 diferentes municípios em seis das sete regiões fisiográficas do Estado do Rio de Janeiro, conforme apresentadas na Tabela 1.

**Tabela 1. Regiões fisiográficas do Estado do Rio de Janeiro e municípios componentes.**

REGIÃO		MUNICÍPIOS
I	Metropolitana	Belford Roxo, Duque de Caxias, Guapimirim, Itaboraí, Itaguaí, Japeri, Magé, Mangaratiba, Marica, Mesquita, Nilópolis, Niterói, Nova Iguaçu, Paracambi, Queimados, Rio de Janeiro, São Gonçalo, São João de Meriti, Seropédica e Tanguá.
II	Noroeste Fluminense	Aperibé, Bom Jesus do Itabapoana, Cambuci, Italva, Itaocara, Itaperuna, Laje do Muriaé, Miracema, Natividade, Porciúncula, Santo Antônio de Pádua, São José de Ubá e Varre-Sai.
III	Norte Fluminense	Campos dos Goytacazes, Carapebus, Cardoso Moreira, Conceição de Macabu, Macaé, São Fidélis, Quissamã, São Francisco do Itabapoana e São João da Barra.
IV	Serrana	Bom Jardim, Cantagalo, Carmo, Cordeiro, Duas Barras, Macuco, Nova Friburgo, Petrópolis, Santa Maria Madalena, São José do Vale do Rio Preto, São Sebastião do Alto, Sumidouro, Teresópolis e Trajano de Moraes.
V	Baixadas Litorâneas	Araruama, Armação dos Búzios, Arraial do Cabo, Cabo Frio, Cachoeiras de Macacu, Casimiro de Abreu, Iguaba Grande, Rio Bonito, Rio das Ostras, São Pedro d'Aldeia, Saquarema e Silva Jardim.
VI	Centro-Sul Fluminense	Areal, Comendador Levy Gasparian, Engenheiro Paulo de Frontin, Mendes, Miguel Pereira, Paraíba do Sul, Paty do Alferes, Rio das Flores, Sapucaia, Três Rios e Vassouras.
VII	Sul Fluminense	Angra dos Reis, Barra do Piraí, Barra Mansa, Itatiaia, Paraty, Pinheiral, Piraí, Porto Real, Quatis, Resende, Rio Claro, Valença e Volta Redonda.

Foi encontrado um índice de animais reagentes de 42,97% sobre o total de soros testados, considerando-se as diluições maiores que 1:10. Este resultado é detalhado na tabela 2.

**Tabela 2. Prevalência de anticorpos neutralizantes para o BHV-1, por diluição do soro reagente.**

Município	Região	Nº de soros			Diluição do soro reagente			
		Testados	-	+	1:10	1:20	1:40	1:80
Belford Roxo	I	6	4	2	2	-	-	-
Duque de Caxias	I	5	3	2	2	-	-	-
Guapimirim	I	5	1	4	3	1	-	-
Itaguaí	I	8	5	3	3	-	-	-
Japeri	I	4	2	2	2	-	-	-
Magé	I	5	2	3	3	-	-	-
Mangaratiba	I	5	5	-	-	-	-	-
Nova Iguaçu	I	5	2	3	3	-	-	-
Paracambi	I	4	3	1	1	-	-	-
Cambuci	II	1	1	-	-	-	-	-
Itaperuna	II	25	7	18	2	3	8	5
Sto. Antônio de Pádua	II	6	3	3	3	-	-	-
Campos	III	1	1	-	-	-	-	-
Macaé	III	1	-	1	-	1	-	-
Quissamã	III	1	-	1	-	-	1	-
S. Franc. Itabapoana	III	1	-	1	-	1	-	-
Petrópolis	IV	3	1	2	1	-	1	-
Rio Bonito	V	7	6	1	1	-	-	-
Rio das Ostras	V	6	6	-	-	-	-	-
Paraíba do Sul	VI	10	8	2	2	-	-	-
Paty do Alferes	VI	4	3	1	1	-	-	-
Três Rios	VI	8	6	2	2	-	-	-
TOTAL		121	69	52	31	6	10	5
	%				25,61	4,95	8,26	4,13
		100%	57,03	42,97	42,97			

A prevalência de animais reagentes entre os animais testados encontra-se assim distribuída, por município: Região I (Metropolitana): municípios de Belford Roxo (33,33% de reagentes), Duque de Caxias (40,00%), Guapimirim (80,00%), Itaguaí (37,50%), Japeri (50,00%), Magé (60,00%), Mangaratiba (0%), Nova Iguaçu (60,00%) e Paracambi (25,00%); Região II (Noroeste Fluminense): Cambuci (0%), Itaperuna (72,00%) e Santo Antônio de Pádua (50,00%); Região III (Norte Fluminense): Campos dos Goytacazes (0%), Macaé (100%), Quissamã (100%) e São Francisco do Itabapoana (100%); Região IV (Serrana): Petrópolis (66,66%); Região V (Baixadas Litorâneas): Rio Bonito (14,28%) e Rio das Ostras (0%); Região VI (Centro-Sul Fluminense): Paraíba do Sul (20,00%), Paty do Alferes (25,00%) e Três Rios (25,00%); Região VII (Sul Fluminense): nenhum soro pesquisado. Estes resultados estão plotados na Tabela 3.

**Tabela 3. Prevalência de soros reagentes nos município examinados, entre os soros testados.**

Município	Região	Nº de soros		
		Testados	-	+
Belford Roxo	I	6	66,66%	33,33%
Duque de Caxias	I	5	60,00%	40,00%
Guapimirim	I	5	20,00%	80,00%
Itaguaí	I	8	62,50%	37,50%
Japeri	I	4	50,00%	50,00%
Magé	I	5	40,00%	60,00%
Mangaratiba	I	5	100%	-
Nova Iguaçu	I	5	40,00%	60,00%
Paracambi	I	4	75,00%	25,00%
Cambuci	II	1	100%	-
Itaperuna	II	25	28,00%	72,00%
Sto. Antônio de Pádua	II	6	50,00%	50,00%
Campos	III	1	100%	-
Macaé	III	1	-	100%
Quissamã	III	1	-	100%
S. Franc. Itabapoana	III	1	-	100%
Petrópolis	IV	3	33,33%	66,66%
Rio Bonito	V	7	85,71%	14,28%
Rio das Ostras	V	6	100%	-
Paraíba do Sul	VI	10	80,00%	20,00%
Paty do Alferes	VI	4	75,00%	25,00%
Três Rios	VI	8	75,00%	25,00%
TOTAL		121	69	52
		100%	57,03%	42,97%

O teste de soroneutralização apresenta alto grau de especificidade (LENNETE *et al.*, 1995). Com um índice de 42,97% de animais reagentes a este teste, considera-se que a infecção pelo BHV-1 apresenta prevalência relativamente alta em nosso Estado.

Este trabalho é uma continuação daquele iniciado por Grégio (1999), utilizando a mesma metodologia e o mesmo painel de soros. Em seu experimento, Grégio (1999) encontrou 56,60% de animais reagentes ao BHV-1, testando 235 soros de outros municípios do Estado do Rio de Janeiro. Grégio (1999) pesquisou a prevalência de anticorpos em rebanhos localizados principalmente na Região Sul-Fluminense e nas Baixadas Litorâneas; neste trabalho, a maioria dos soros era proveniente da Região Metropolitana do Estado, cujos rebanhos são pequenos.

Assim, obteve-se um painel de 356 soros provenientes de 43 diferentes municípios dos 92 que compõe o Estado do Rio de Janeiro. Destes, 171 apresentam anticorpos para o BHV-1. Estes dados indicam uma prevalência de anticorpos em 48,03% dos animais testados. Na tabela 4, analisa-se a prevalência de animais reagentes por região fisiográfica do Estado do Rio de Janeiro.

**Tabela 4. Número de soros pesquisados e prevalência por região fisiográfica.**

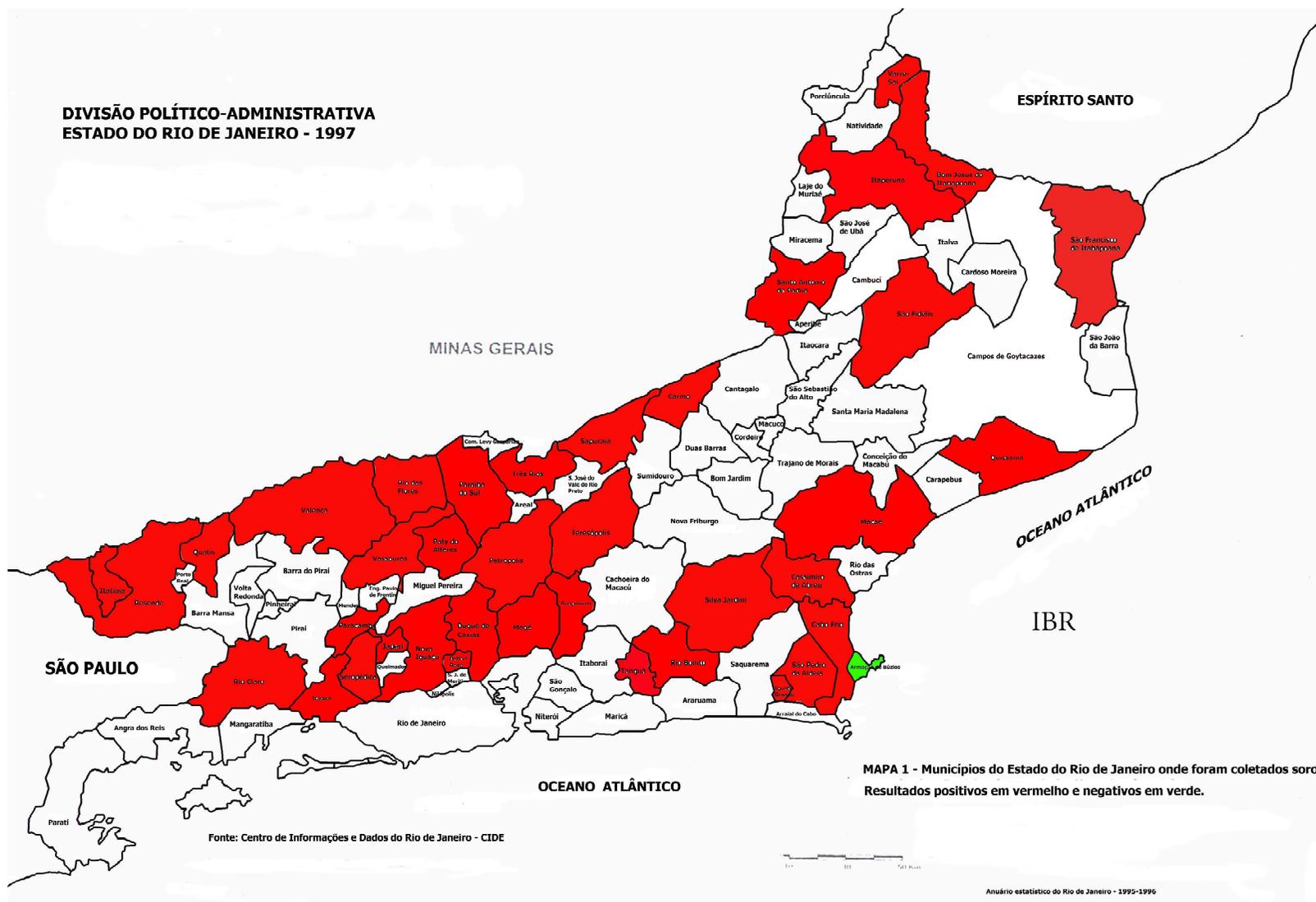
Região		Nº de soros pesquisados e prevalência	
I	Metropolitana	47	42,56%
II	Noroeste Fluminense	32	65,63%
III	Norte Fluminense	4	75,00%
IV	Serrana	3	66,67%
V	Baixas Litorâneas	8	12,50%
VI	Centro-Sul Fluminense	22	22,73%
VII	Sul Fluminense	-	-
TOTAL		121	42,97%

A Região Norte do estado apresentou o maior percentual de animais positivos (75,00%) entre os soros analisados e, em oposição, a região das Baixadas Litorâneas apresentou o menor percentual de animais positivos (12,50%). É interessante observar as características das criações em cada região fisiográfica. Nas Regiões Serrana, Centro-Sul e Sul-Fluminense, são mantidos, em sua maior parte, rebanhos para exploração leiteira. Na Região Metropolitana, os rebanhos são menores, porém, a densidade é

maior. Nas Regiões Noroeste e Norte Fluminense e nas Baixadas Litorâneas a densidade é menor, porém os rebanhos são maiores e a exploração praticada é, em sua maior parte, para o corte. Os rebanhos sob exploração leiteira podem estar expostos a vários defeitos de manejo, como estresse climático, nutricional e gestacional, aumentando a susceptibilidade às doenças; no entanto, a prevalência de animais reagentes foi menor nestes rebanhos, suscitando discussão quanto à taxa de substituição e introdução de novos animais no rebanho, bem como sua exposição a defeitos de manejo reprodutivo, aumentando a disseminação da doença, ou a defeitos de manejo nutricional e infestação por parasitos, aumentando a susceptibilidade às doenças. Apesar dessas observações, as diferenças observadas entre as taxas de prevalência de animais com anticorpos neutralizantes para o BHV-1 parecem estar relacionadas muito mais ao número de amostras analisadas – quanto maior o número de amostras coletadas, maior a fidelidade dos resultados. Neste estudo, portanto, não foi possível observar nenhum efeito do tipo de exploração sobre a prevalência da infecção pelo BHV-1.

Observa-se que o BHV-1 ocorre nos rebanhos bovinos de todas as regiões fisiográficas do Estado do Rio de Janeiro. Na Figura 1 estão assinalados os municípios onde se encontraram animais com anticorpos neutralizantes contra o BHV-1.

Figura 1. Municípios onde foram encontrados animais com anticorpos neutralizantes para o BHV-1.



#### **4. CONCLUSÕES**

O Herpesvírus Bovino tipo 1 está disseminado no Estado do Rio de Janeiro, e, considerando os aspectos clínicos e epidemiológicos desta doença, a disseminação potencial deve ser considerada, sendo necessárias medidas urgentes para seu controle dentro dos rebanhos e no âmbito dos municípios.

Como não se preconizam medidas para o controle desta doença, animais, bem como sêmen e produtos de biotecnologia podem ser comercializados entre rebanhos, disseminando o agente. A reativação ocasional da doença, sem sintomas e com liberação de vírus, contribui para o aumento dos casos, vez que faz com que a aparente sanidade seja superestimada pelos criadores e profissionais.

## **CAPÍTULO II**

### **DETECÇÃO DE ANTICORPOS NEUTRALIZANTES PARA O HERPESVÍRUS BOVINO EM COLOSTRO**

## RESUMO

SCHIAVO, Paula Amorim. **Detecção de Anticorpos Neutralizantes para o Herpesvírus Bovino em Colostro**. Seropédica: UFRRJ, 2005. 111 p. VI capítulos. (Dissertação, Mestrado em Medicina Veterinária).

O Herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1) é responsável por grandes perdas econômicas e sanitárias na pecuária, com grande repercussão sobre a nutrição, produção de leite e reprodução. O diagnóstico sorológico da infecção em matrizes prenhes pode ser mascarado pela transferência dos anticorpos para o colostro e pela menor resposta humoral em vacas prenhes latentemente infectadas pelo BHV-1. Pesquisou-se uma técnica alternativa aos ELISAs para aferição dos anticorpos neutralizantes para o BHV-1 no colostro para posterior aplicação. Para tanto, amostras de soro e colostro de cada matriz foram examinadas pela técnica de neutralização em microplacas, utilizando células MDBK cultivadas em meio de cultura MEM Glasgow modificado. Os títulos de anticorpos humorais foram maiores que os títulos colostrais em 25% dos animais; em 33,3% dos animais os níveis eram idênticos; o título colostrais foi maior que o sérico em 41,6% dos animais. Assim, verifica-se que em apenas 8,33% dos animais não foram encontrados anticorpos para o BHV-1, enquanto a pesquisa sorológica isolada encontraria 33,3% de animais negativos, ou seja, 25% de portadores não seriam identificados, o que é epidemiologicamente representativo e de destacada importância por tratar-se de infecção normalmente inaparente em adultos, mas fatal para o feto e o neonato. Verificou-se que o uso do colostro no teste de neutralização não afetou a fisiologia celular, já que as células não se mostraram intoxicadas nos controles e amostras negativas. A avaliação de imunoglobulinas colostrais nos moldes aqui propostos mostrou-se eficiente, sensível, simples e de grande relevância, podendo ser aplicada a outras doenças de impacto econômico e sanitário.

**Palavras chave:** BHV-1; colostro; anticorpos; neutralização.

## ABSTRACT

SCHIAVO, Paula Amorim. **Detection of Colostral Antibodies against Bovine Herpesvirus type 1 by Neutralization Test.** Seropédica: UFRRJ, 2005. 111 p. VI chapters. (Dissertation, Master Science in Veterinary Medicine).

Secretions accumulated in mammary gland in the few last weeks of gestation and the proteins transferred from the systemic circulation by the influence of hormones compose colostrum. In ruminants, IgG1 is the major protein both in the milk and in colostrum. Whole IgG, the great portion of IgM and about half IgA in bovine colostrum derives from serum, which might cause a decrease in serum antibodies level. The humoral immune response in bovine herpesvirus (BHV-1) infection is also masked by the presence of antigen in the organism which binds constantly the antibodies produced resembling that they weren't. This can be avoided by using techniques that don't use the antibody research in sera for diagnostic of infection. In despite of it, serology remains a powerful tool in viral diagnostic in a community, and neutralization antibody assays are the gold standard of serologic tests, providing both sensitive and specific measures of host immunity. We used the microneutralization test for gauging of the neutralizing antibodies for BHV-1 in colostrums and sera of 18 cows. The same antibodies levels were observed in 8 (44, 44%) animals. Higher antibodies levels in serum were found in 3 cows, with no detectable antibody in colostrums. Higher antibodies levels in colostrums were found in 7 (38,88%) cows, 3 animals with no detectable antibody in sera. This could be explained by puerperal stress and the latent behavior of BHV-1 infection. The antibody research in sera would find 33,33%(6/18) of negative animals while only 16,66%(3/18) were really negatives. Control methods for the infection should include seronegatives latent carriers. We verified that the use of colostrum in neutralization test didn't affect cell physiology, since the cells were not shown intoxicated in the controls and negative samples, revealing a safe technique, and of easy execution to be adopted for the research of colostral antibodies. The evaluation of colostral immunoglobulins by this way is efficient, sensitive, simple and of great relevance, could be applied to other diseases of economical and sanitary impact.

**Key words:** BHV-1, colostrum, neutralization test, colostral immunoglobulins,.

## 1. INTRODUÇÃO

Vários agentes infecciosos podem afetar a saúde de rebanhos bovinos e conseqüentemente sua performance zootécnica. Infecções pelo Herpesvírus Bovino (BHV-1) causam grandes perdas econômicas e sanitárias na pecuária, com grande repercussão sobre a nutrição, produção de leite e reprodução (ALFIERI, 2000). Algumas entidades clínicas da infecção pelo BHV-1 têm uma denominação específica como Rinotraqueíte Infecciosa e Vulvovaginite Pustular Infecciosa. Outras manifestações clínicas incluem conjuntivites, abortos, encefalomyelites, mastites, metrites, infertilidades, infecções sistêmicas em animais jovens e enterites (LEMAIRE *et al.*, 1994). Todos esses diferentes quadros clínicos são observados em outras doenças infecciosas, logo o diagnóstico laboratorial é imprescindível para o controle eficiente e medidas profiláticas a serem adotadas (ALFIERI, 2000), principalmente considerando-se a insidiosidade da infecção, que apresenta uma forma latente (subclínica), facilmente despercebida dos profissionais e criadores envolvidos com a bovinocultura.

Em matrizes bovinas, as secreções acumuladas na glândula mamária nas últimas semanas de gestação e as proteínas transferidas da circulação sistêmica sob influência hormonal compõem o colostro. Nos ruminantes, a IgG1 é a principal proteína tanto no leite quanto no colostro. Toda a IgG, a maior parte da IgM e cerca de metade da IgA do colostro bovino deriva do soro, o que pode causar um decréscimo no nível de anticorpos séricos. A resposta imune humoral contra a infecção pelo BHV-1 também é mascarada pela presença de antígenos no organismo ligando-se constantemente aos anticorpos e aparentando soronegatividade (TIZARD, 2000). Isto pode ser evitado quando se empregam para diagnóstico técnicas que não utilizam a pesquisa de anticorpos séricos. No entanto, a sorologia continua sendo uma poderosa ferramenta no diagnóstico de uma doença viral em uma comunidade, e o teste de soroneutralização é a prova sorológica ideal por sua sensibilidade e sua especificidade (LENNETE *et al.*, 1995).

Em função dos prejuízos causados pela doença, vários métodos têm sido utilizados, em todo o mundo, para o diagnóstico e controle do BHV-1. Medidas de controle devem incluir portadores latentes soronegativos (LEMAIRE *et al.*, 2000b). Em vários países a testagem do leite é um importante teste de triagem, porém, para este tipo de material, somente ELISAs estão disponíveis, pois o leite pode ser tóxico para os cultivos celulares e para o vírus. Neste trabalho, testamos uma técnica para aferição dos

anticorpos neutralizantes para o BHV-1 em colostro para uso em conjunto com a pesquisa sorológica, a fim de delinear uma metodologia diagnóstica mais sensível para a detecção de animais latentemente infectados pelo BHV-1.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Colheram-se amostras de sangue no período pré-parto e do colostro de dezoito bovinas de um rebanho leiteiro em Seropédica/RJ. O soro foi separado e, junto com a amostra de colostro do mesmo animal, remeteu-se em frascos de polipropileno sob refrigeração para o laboratório. Células da linhagem MDBK foram utilizadas para multiplicação viral, produção de antígenos e realização dos testes de soroneutralização. Monocamadas foram cultivadas em Meio Mínimo Essencial tipo Glasgow modificado adicionado de antibióticos, L-glutamina e 10% de soro fetal bovino isento de anticorpos. A amostra Cooper do BHV-1 foi cedida pelo Centro Panamericano de Febre Aftosa, cultivada no Laboratório de Viroses Veterinárias e titulada em células MDBK, tendo o título infeccioso (TICD<sub>50</sub>) calculado pelo método de Reed & Muench (1938). Soro e colostro dos animais foram examinados em duplicata pela técnica de neutralização em monocamadas celulares cultivadas em microplacas de 96 cavidades, segundo Lennete *et al.*, (1995), com período de incubação de 1 h a 37°C, frente a 100 doses infectantes do BHV-1 para 50% dos cultivos celulares (100 TICD<sub>50</sub>), nas diluições 1:10, 1:20, 1:40 e 1:80. Em cada placa se praticou ao menos um controle celular e um controle viral. A leitura das placas foi realizada com 48, 72 e 96 h após incubação em estufa a 37°C com atmosfera de CO<sub>2</sub>, para visualização do efeito citopatogênico. A última diluição na qual se observou 100% de inibição viral foi tomada como o título de anticorpos no material pesquisado. Soros e colostros incapazes de inibir o ataque dos vírus às células foram considerados negativos para a presença de anticorpos anti-BHV-1 nas diluições pesquisadas.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

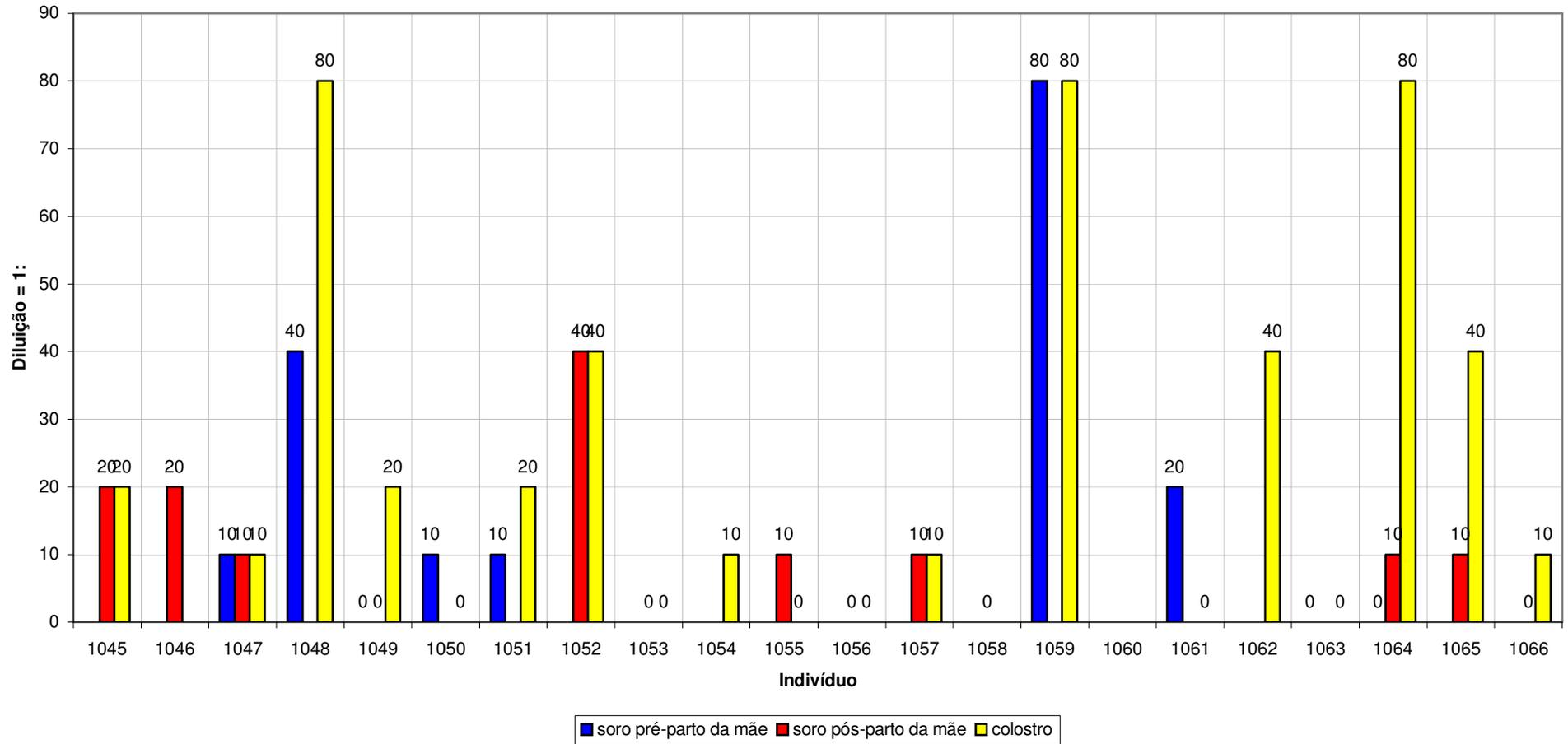
O mesmo título de anticorpos foi observado no soro e no colostro de oito (44, 44%) vacas. Níveis de anticorpos mais altos foram observados no soro de três vacas cujos colostros não apresentaram nível detectável de anticorpos. Títulos mais altos de anticorpos foram observados no colostro de sete (38,88%) vacas, das quais três não apresentaram nível detectável de anticorpos no soro. Isto pode ser explicado pelo estresse puerperal e pelo caráter latente da infecção pelo BHV-1. A pesquisa de anticorpos usando somente o soro desses animais encontraria 33,33%(6/18) de animais soronegativos, enquanto apenas 16,66%(3/18) eram realmente negativos. Medidas de controle devem incluir animais portadores latentes soronegativos, os quais muitos testes falham em identificar (LEMAIRE *et al*, 2000b). Verificou-se que o uso do colostro não afetou a fisiologia celular, já que as células não se mostraram intoxicadas nos controles e nas amostras negativas; o efeito citopatogênico característico do vírus também não se modificou, revelando que esta técnica é segura, sensível, de fácil execução e de grande relevância, podendo ser aplicada a outras doenças de impacto econômico e sanitário.

Os títulos de anticorpos humorais foram maiores que os títulos colostrais em 25% dos animais; em 33,3% dos animais os níveis eram idênticos; o título colostrais foi maior que o sérico em 41,6% dos animais.

Analisando-se os dados em conjunto, verifica-se que em apenas 8,33% dos animais não foram encontrados anticorpos para o BHV-1, enquanto a pesquisa sorológica isolada encontraria 33,3% de animais negativos, ou seja, 25% de portadores não seriam identificados, o que é epidemiologicamente representativo e de destacada importância por tratar-se de infecção normalmente inaparente em adultos, mas fatal para o feto e o neonato.

Os títulos de anticorpos no soro colhido antes do parto, no soro colhido após o parto e no colostro de cada vaca são apresentados na Figura 1.

Figura 1. Anticorpos maternos no soro e colostro



#### **4. CONCLUSÕES**

O uso do colostro no teste de neutralização não afetou a fisiologia celular, já que as células não se mostraram intoxicadas nos controles e amostras negativas, podendo-se adotar esta técnica para a pesquisa de anticorpos colostrais.

A avaliação de imunoglobulinas séricas e colostrais nos moldes aqui propostos mostrou-se eficiente, sensível, simples e de grande relevância, podendo ser aplicada a outras doenças de impacto econômico e sanitário.

Assim, propõe-se, para o diagnóstico de matrizes infectadas pelo BHV-1, a análise tanto de amostras de soro quanto de colostro.

### **CAPÍTULO III**

## **MONITORAMENTO DE ANTICORPOS NEUTRALIZANTES PARA O HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 1 EM BEZERROS LEITEIROS**

## RESUMO

SCHIAVO, Paula Amorim. **Monitoramento de Anticorpos Neutralizantes para o Herpesvírus Bovino tipo 1 em Bezerros Leiteiros**. Seropédica: UFRRJ, 2005. 111 p. VI capítulos. (Dissertação, Mestrado em Medicina Veterinária).

O Herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1) é responsável por grandes perdas econômicas e sanitárias na pecuária, com grande repercussão sobre a nutrição, produção de leite e reprodução. A imunidade passiva conferida pelo colostro é importante para proteger bezerros da doença sistêmica provocada pela infecção. Pesquisamos a eficiência da imunização passiva, verificando se anticorpos neutralizantes para o BHV-1 eram transferidos aos bezerros pelo colostro, e qual a duração desta imunidade. Amostras de soro de bezerros dos 0 aos 57 dias de idade e o soro colhido de suas mães no pré-parto e no pós-parto, bem como amostras de colostro, foram examinadas pela técnica de neutralização em microplacas, utilizando células MDBK cultivadas em meio de cultura MEM Glasgow modificado. Observa-se grande aumento no nível sérico de anticorpos nos primeiros dias naqueles animais cuja mãe também apresentava alto título de anticorpos colostrais. Altos níveis de anticorpos foram observados dos 28 aos 32 dias de idade, quando começam a decrescer.

**Palavras chave:** BHV-1; colostro; neutralização; imunidade passiva.

## ABSTRACT

SCHIAVO, Paula Amorim. **Monitoring Serum Neutralizing Antibodies against Bovine Herpesvirus type 1 in Dairy Calves**. Seropédica: UFRRJ, 2005. 111 p. VI chapters. (Dissertation, Master Science in Veterinary Medicine).

Bovine Herpesvirus type 1 (BHV-1) is responsible for great economical and sanitary losses in livestock, with great repercussion about nutrition, milk production and reproduction. We accessed the efficiency of the passive immunization against BHV-1 verifying whether neutralizing antibodies in colostrums were absorbed and how long the passive immunity lasts. Sera from 0 to 57 days post-partum were collected of the calves and pre- and post-partum serum and colostrums of its dams were taken. Samples of serum and colostrum of each animal were examined by neutralization technique in microplates, using MDBK cells cultivated in Glasgow-MEM modified culture medium. Cooper strain of BHV-1 was cultivated and the infective title (TICD<sub>50</sub>) was calculated by Reed & Muench's method. We got dilutions 1:10, 1:20, 1:40 and 1:80 of each colostrum sample in MEM. BHV-1 was diluted in MEM to obtain 100 TICD<sub>50</sub>. Similar volumes of each colostrum dilution were mixed with the viral dilution and incubated in 37°C for 60 minutes. The culture medium was aspirated and the monolayers were washed twice in PBS. 50 mL of each dilution were distributed in two cavities, except in the holes that constituted the negative controls (only MEM) and positive (100 TICD<sub>50</sub> of BHV-1). After 1 hour each cavity was completed with 100 mL of MEM, the microplates were stamped and it was incubated in 37°C. The reading was made in inverted microscope, for visualization of the cytopathogenic effect, during the period of 5 days. It was verified that a great increase in the serum antibodies occurs in the first days post-partum in calves which dam presents high levels of colostral antibodies. High serum antibodies levels were observed from day 28 to 32, when they begin to decrease.

**Key words:** Colostrum, neutralization test, colostral immunoglobulins, BHV-1.

## 1. INTRODUÇÃO

Infecções pelo Herpesvírus Bovino (BHV-1) causam grandes perdas econômicas e sanitárias na pecuária, com grande repercussão sobre a nutrição, produção de leite e reprodução (ALFIERI, 2000). Algumas entidades clínicas da infecção pelo BHV-1 têm uma denominação específica como Rinotraqueíte Infecciosa e Vulvovaginite Pustular Infecciosa. Outras manifestações clínicas incluem conjuntivites, abortos, encefalomyelites, mastites, metrites, infertilidades, infecções sistêmicas em animais jovens e enterites (LEMAIRE *et al.*, 1994). Todos esses diferentes quadros clínicos são observados em outras doenças infecciosas, logo o diagnóstico laboratorial é imprescindível para o controle eficiente e medidas profiláticas a serem adotadas (ALFIERI, 2000), principalmente considerando-se a insidiosidade da infecção, que apresenta uma forma latente (subclínica), facilmente despercebida dos profissionais e criadores envolvidos com a bovinocultura.

Em matrizes bovinas, as secreções acumuladas na glândula mamária nas últimas semanas de gestação e as proteínas transferidas da circulação sistêmica sob influência hormonal compõem o colostro (TIZARD, 2000). Após o parto, bezerros de vacas vacinadas têm altas concentrações de anticorpos contra o vírus respiratório sincicial bovino, mas não contra o BHV-1 (CORTESE & MORLEY, 1996), indicando que toda a imunidade contra esta infecção é transferida da mãe para o bezerro via colostro. Em bezerros que não mamam o colostro, a mortalidade por IBR é alta (RADOSTITS *et al.*, 2002). Qual a meia-vida destes anticorpos transferidos passivamente, e se esta transferência ocorre satisfatoriamente, no entanto, é objeto de discussão. Neste trabalho, pesquisamos a eficiência da transferência de anticorpos contra o BHV-1 para bezerros através do colostro de suas mães e a persistência destes anticorpos no soro.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Colheram-se amostras de soro de 22 bezerros de um rebanho leiteiro em Seropédica/RJ, juntamente com o soro pré-parto, pós-parto e colostro de suas mães. Células da linhagem MDBK foram utilizadas para multiplicação viral, produção de antígenos e realização dos testes de neutralização. Monocamadas foram cultivadas em Meio Mínimo Essencial tipo Glasgow modificado adicionado de antibióticos, L-glutamina e 10% de soro fetal bovino isento de anticorpos. A amostra viral utilizada foi a amostra Cooper do BHV-1, oriunda da coleção do Centro Panamericano de Febre Aftosa. Amostras de soro e colostro foram examinadas em duplicata pela técnica de soroneutralização em microplacas de 96 cavidades segundo Lennete *et al.* (1995), com período de incubação de 1 h a 37°C, frente a 100 doses infectantes do BHV-1 para 50% dos cultivos celulares (100 TICD<sub>50</sub>), calculada pelo método de Reed & Muench (1938), nas diluições 1:10, 1:20, 1:40 e 1:80. Em cada placa se praticou ao menos um controle celular e um controle viral. A leitura das placas foi realizada com 48, 72 e 96 h após incubação em estufa a 37°C com atmosfera de CO<sub>2</sub>, para visualização do efeito citopatogênico. A última diluição na qual se observou 100% de inibição viral foi tomada como o título de anticorpos no material pesquisado. Soros incapazes de inibir o ataque dos vírus às células foram considerados negativos para a presença de anticorpos anti-BHV-1 nas diluições pesquisadas.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

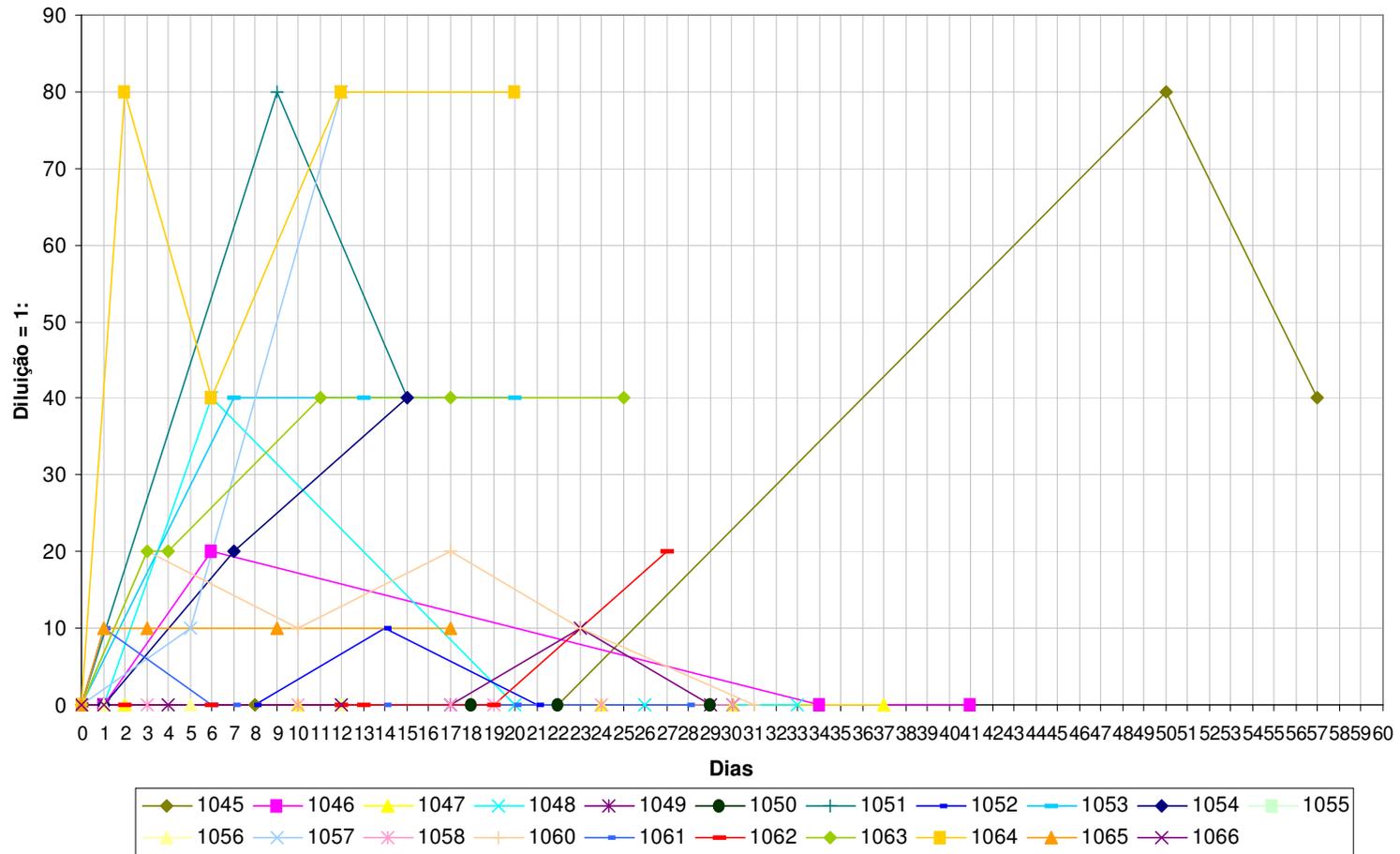
Foram pesquisados soros de 22 animais e suas mães, verificando o título de anticorpos neutralizantes para o BHV-1 nos bezerros, colhendo-se os soros entre os 0 e 57 dias de vida e a presença de anticorpos neutralizantes para o BHV-1 no soro colhido no período pré-parto, no soro colhido no período pós-parto e no colostro das mães, para conhecimento do grau de imunidade conferido aos bezerros pelo colostro de fêmeas reagentes ao BHV-1. Os resultados foram dispostos na forma de curva de anticorpos durante o período pesquisado, para cada indivíduo, na figura 1. Analisando a curva, observa-se grande aumento do nível sérico de anticorpos nos primeiros dias de vida daqueles animais cuja mãe também apresentava alto título de anticorpos colostrais. Em média, altos níveis de anticorpos são observados até cerca de 28 a 32 dias de idade, quando começam a decrescer. Em três animais não foi detectada a presença de anticorpos em nenhum dos dias coletados; destes, somente um era proveniente de mãe com título de anticorpos no colostro detectável no teste; os outros dois eram filhos de vacas sem anticorpos detectáveis no soro ou colostro pelo teste de soroneutralização em microplacas.

A eficiência da transmissão de anticorpos maternos para os bezerros através do colostro foi demonstrada como esperado. No entanto, bezerros com anticorpos colostrais podem ser infectados pelo BHV-1 e mesmo tornarem-se soronegativos, contudo persistentemente infectados com reexcreção do vírus após o estresse natural ou induzido, conforme demonstrado por LEMAIRE *et al.* (2000a). A presença de anticorpos passivamente adquiridos pelos bezerros através do colostro pode interferir no desenvolvimento de uma resposta humoral ativa à infecção (LEMAIRE *et al.*, 2000a). Defende-se que os anticorpos contra o BHV-1 adquiridos passivamente tem uma meia-vida biológica de cerca de três semanas, podendo ser detectados ocasionalmente em animais com mais de 9 meses de idade, e raramente em animais acima desta idade (OIE, 2004). Em estudo realizado por MOREIRA *et al.* (2000), foi demonstrado que anticorpos colostrais persistem por até 3 meses de vida, mas mesmo títulos altos não protegem animais da infecção em regiões onde esta é prevalente.

Anticorpos colostrais contra o BHV-1 são transmitidos aos bezerros que mostram altos níveis séricos nas primeiras semanas de vida, interferindo com testes diagnósticos e resposta ao agente sem, contudo, proteger-lhes completamente da

infecção como demonstrado por LEMAIRE *et al.* (2000a), que produziu portadores latentes soronegativos ao administrar uma vacina atenuada a bezerros passivamente imunizados.

Figura 1. Anticorpos neutralizantes para o BHV-1 em bezerros desde o nascimento



#### **4. CONCLUSÕES**

Anticorpos colostrais contra o BHV-1 são transmitidos aos bezerros, que mostram altos níveis séricos nas primeiras semanas de vida, interferindo com testes diagnósticos e com a resposta ao agente.

## **CAPÍTULO IV**

### **ATIVIDADE ANTIVIRAL DE *KALANCHOE BRASILIENSIS* ("SAIÃO") FRENTE AO HERPESVÍRUS BOVINO TIPO I *IN VITRO***

## RESUMO

SCHIAVO, Paula Amorim. **Atividade antiviral de *Kalanchoe brasiliensis* (“saião”) frente ao Herpesvírus bovino tipo I *in vitro***. Seropédica: UFRRJ, 2005. 111 p. VI capítulos. (Dissertação, Mestrado em Medicina Veterinária).

O BHV-1 está disseminado em rebanhos bovinos e bubalinos do Brasil e do mundo, causando prejuízos econômicos e sanitários à atividade pecuária. Sendo objeto de controle em todo o mundo, mas com poucas alternativas viáveis na situação atual do rebanho brasileiro, urge a definição de novas estratégias de controle da infecção. Como em toda virose o tratamento é de pouco ou nenhum resultado, e as drogas antivirais encontradas no mercado são poucas e caras, não sendo aplicáveis em Medicina Veterinária. Grandes esperanças são depositadas nas pesquisas de atividade antiviral e imunomoduladora de substâncias naturais, como alternativa eficiente e economicamente viável de tratamento, respectivamente, pela menor possibilidade da existência de resistência viral, como acontece com o aciclovir; e pela disponibilidade na natureza. A dimensão da importância dos tratamentos fitoterápicos e homeopáticos aumentou com a exigência de produtos animais livres de resíduos e com a possibilidade de agregação de valor à carne e ao leite com o sistema de produção orgânico. *Kalanchoe brasiliensis* possui atividade antiinflamatória e imunomodulatória e foi testada neste experimento quanto à atividade antiviral frente ao BHV-1. O extrato bruto de *Kalanchoe brasiliensis* apresentou citotoxicidade de  $10^{-3,95}$  e uma atividade virucida razoável, com índice de inibição viral de  $10^{-4,48}$  e índice terapêutico relativamente alto (88,16%) *in vitro*, podendo ser utilizado em formulações para o tratamento das manifestações clínicas do BHV-1 em bovinos. São necessários testes *in vivo* para avaliação de seu potencial na redução da liberação de vírus infectivos para o ambiente e na diminuição do curso clínico da doença.

**Palavras chave:** BHV-1, *Kalanchoe brasiliensis*, antiviral, Herpesviridae.

## ABSTRACT

SCHIAVO, Paula Amorim. **Antiviral activity of *Kalanchoe brasiliensis* (“saião”) against Bovine Herpesvirus type 1 *in vitro***. Seropédica: UFRRJ, 2005. 111 p. VI chapters. (Dissertation, Master Science in Veterinary Medicine).

BHV-1 is spread among cattle and buffalo herds, inducing sanitary and economic losses to livestock. There are few alternatives to controlling BHV-1 dissemination at present status. Strategies to control the infection are of major concern all around the world. Special intents in limiting virus shedding and reducing clinical course of infection guided many experiments over 30 years. Screening for antiviral and immunomodulatory activity of natural compounds is of great interest because of their availability and the possibility to match these requests. Also, increasing demands for organic production focused the natural ways of improving production. *Kalanchoe brasiliensis* pure extract was tested to access its potential antiviral activity against BHV-1 (Cooper strain). This test was performed in flat-bottomed microtiter plates with MDBK monolayers cultivated in MEM Glasgow culture medium, added with glutamine and antibiotics. Decimal-based dilutions of pure extract were made to determine the cytotoxicity activity ( $10^{-3,95}$ TICD<sub>50</sub>) by Reed & Muench method. Then,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  and  $10^{-6}$  dilutions of pure extract were tested against 100 TICD<sub>50</sub> per 0,1 mL of BHV-1. Equal volumes of viral suspension and dilutions of the extract were mixed and, after 1 h in contact the mixtures were inoculated in MDBK cells. The plates were observed every 24 h (till 96 h) for development of CPE. We observed a dose-dependent inhibition of BHV-1 activity, pointing a viral inhibition index (ED<sub>50</sub>) of  $10^{-4,48}$ . Considering the cytotoxicity activity at  $10^{-3,95}$ TICD<sub>50</sub>, therapeutic ratio *in vitro* of *Kalanchoe brasiliensis* pure extract was 88,16% when utilized as virucidal. It was verified that *Kalanchoe brasiliensis* presents reasonable virucidal activity at non-toxic doses and shows good therapeutic ratio *in vitro*. Tests *in vivo* are required for the evaluation of *Kalanchoe brasiliensis* potential for limiting viral shedding and its ability to reducing the duration of the symptoms.

**Key words:** BHV-1, *Kalanchoe brasiliensis*, antiviral, Herpesviridae.

## 1. INTRODUÇÃO

O Herpesvírus Bovino tipo 1 (BHV-1) é conhecido genericamente como o agente etiológico da IBR (Rinotraqueíte Infecciosa Bovina), da IPV (Vulvovaginite Pustular Infecciosa) e da IPB (Balanopostite Pustular infecciosa), e está disseminado em rebanhos bovinos e bubalinos do Brasil e do mundo, causando prejuízos econômicos e sanitários à atividade pecuária. Sendo objeto de controle em todo o mundo, mas com poucas alternativas viáveis na situação atual do rebanho brasileiro, urge a definição de novas estratégias de controle da infecção, que serão de grande interesse no combate da doença em todo o mundo.

O aciclovir, a ribavirina, a metisazona e a bromuridina demonstraram ótimo potencial inibitório da replicação do BHV-1 *in vitro* (GLOTOV *et al.*, 2004). Porém, as drogas antivirais encontradas no mercado são poucas e caras, não sendo aplicáveis em Medicina Veterinária. Grandes esperanças são depositadas nas pesquisas de atividade antiviral e imunomoduladora de substâncias naturais, como alternativa eficiente e economicamente viável de tratamento, respectivamente, pela menor possibilidade da existência de resistência viral, como acontece com o aciclovir; e pela disponibilidade na natureza.

O tratamento antiviral já se constitui um problema para os herpesvírus humanos, que já apresentam resistência aos fármacos antiherpéticos utilizados, bem antes de se tornarem disponíveis para os animais de produção. Nos últimos anos, pesquisas com compostos isolados ou extratos de plantas tem demonstrado bons resultados contra os herpesvírus *in vitro*, afirmando-se como uma alternativa importante, quiçá uma estratégia de escolha, para o controle das infecções herpéticas, principalmente, devido ao aparecimento de cepas resistentes ao aciclovir e a outras drogas antiherpéticas paralelo ao número crescente de casos de imunodeficiência humana adquirida.

A dimensão da importância dos tratamentos fitoterápicos e homeopáticos aumentou com a exigência de produtos animais livres de resíduos (BRASIL,1999) e com a possibilidade de agregação de valor à carne e ao leite com o sistema de produção orgânico. Além disso, o custo destes tratamentos é reduzido quando comparados aos tratamentos convencionais.

Alguns compostos originados de plantas emergem como alternativas para a composição de formulações para animais, visando acelerar a recuperação das lesões e reduzir a eliminação de vírus infectivos para o ambiente.

A erva-cidreira (*Melissa officinalis*) demonstrou atividade contra o Herpes Simplex Humano tipo 1 (HSV-1) *in vitro* (DIMITROVA, 1993), provavelmente devido ao ácido rosemarínico (BRINKER, 1995 *apud* WYNN & MARSDEN, 2003 ).

O extrato puro e suas frações aquosas e etiloacéticas de *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) foram capazes de inibir a replicação do BHV-1 *in vitro*, tendo a fração aquosa do extrato o melhor desempenho entre os três compostos. Frações aquosas de etiloacéticas de *Guazuma ulmifolia* (mutamba) também inibiram a replicação do BHV-1 *in vitro* (LINHARES *et al.*, 2002).

Um flavonóide da soja já demonstrou atividade anti-BHV-1 *in vitro* (AKULA *et al.*, 2002): genisteína, uma isoflavona da soja, limita a replicação do BHV-1 *in vitro* por sua capacidade de inibir a atividade da tirosina quinase, inibindo a fosforilação da glicoproteína E (gE) e a replicação do BHV-1 de maneira dose-dependente. Uma possível aplicação é alimentar os bovinos com produtos de soja ricos em genisteína antes de ou durante períodos de estresse (AKULA *et al.*, 2002).

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Células da linhagem MDBK foram utilizadas para multiplicação viral, titulação dos extratos e vírus e realização dos testes. Monocamadas foram cultivadas em meio de cultura MEM (Minimum Essential Medium) tipo Glasgow modificado, adicionado de 2 mL de solução de L-glutamina, 4 mL de antibióticos (2 mL de penicilina e 2 mL de estreptomicina), 4 mL de anfotericina B e 10% de soro fetal bovino no momento do uso. O vírus utilizado foi a amostra Cooper do BHV-1 (Cooper strain, NVSL, Ames, Iowa), proveniente da coleção do Centro Panamericano de Febre Aftosa, mantido e replicado no Laboratório de Virose Veterinárias e estocado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  até a nova inoculação. Determinou-se a citotoxicidade do extrato bruto de *Kalanchoe brasiliensis* (“saião”) usando o método de Reed & Muench (1938) em placas de 24 cavidades. Depois, testou-se a capacidade deste composto inibir a replicação viral nas doses não-citotóxicas, usando microplacas de 96 cavidades e colocando cada diluição contra 100 doses infectantes do BHV-1 para 50% dos cultivos celulares ( $100\text{ TICD}_{50}$ ), calculada pelo método de Reed & Muench (1938). Em cada placa se praticou ao menos um controle celular e um controle viral. A leitura das placas foi realizada com 48, 72 e 96 h após incubação em estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  com atmosfera de  $\text{CO}_2$ , para visualização do efeito citopatogênico. A determinação do índice de inibição viral e a determinação do índice terapêutico foram feitas segundo a metodologia de Wigg & Costa (2000).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

**Determinação da citotoxicidade:** encontrou-se uma TICD<sub>50</sub> de 10<sup>-3,95</sup> para o extrato bruto de *Kalanchoe brasiliensis*.

**Pesquisa da atividade antiviral:** o extrato bruto de *Kalanchoe brasiliensis* foi testado nas diluições 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup> e 10<sup>-6</sup>. Como a TICD<sub>50</sub> deste extrato foi de 10<sup>-3,95</sup>, os controles do extrato foram procedidos na diluição 10<sup>-4</sup> e nenhuma cavidade inoculada com esta dose de extrato mostrou-se intoxicada. Os seguintes percentuais de inibição foram encontrados em cada caso:

a) Efeito virucida do extrato de *Kalanchoe brasiliensis*:

Diluição do extrato	Percentual de inibição
10 <sup>-3</sup>	68,51%
10 <sup>-4</sup>	30,00%
10 <sup>-5</sup>	8,33%
10 <sup>-6</sup>	5,30%

b) Interferência na interação vírus-célula: proteção das células contra a infecção pelo BHV-1

Diluição do extrato	Percentual de inibição
10 <sup>-3</sup>	35,71%
10 <sup>-4</sup>	19,35%
10 <sup>-5</sup>	6,17%
10 <sup>-6</sup>	0,94%

**Determinação do índice de inibição viral:** o índice de inibição viral do extrato bruto de *Kalanchoe brasiliensis* quando utilizado como virucida, ou seja, a ED<sub>50</sub>, neste caso, é de 10<sup>-4,48</sup>. Quanto à interferência na interação vírus-célula, não foi possível calcular nas doses não-citotóxicas.

**Determinação do índice terapêutico:** o índice terapêutico para o extrato bruto de *Kalanchoe brasiliensis* é de 88,16% quando utilizado como virucida.

A atividade virucida de sumo de plantas do gênero *Kalanchoe*, especificamente, *Kalanchoe pinnata* e *Kalanchoe diagremontiana* foi demonstrada em experimentos russos, mostrando vantagens como alta atividade neutralizante viral em diluições de 1:2 a 1:8000 e não-inativação pelo éter, álcool e periodato de potássio foi demonstrada, contudo a adição de soro bovino ou proteínas purificadas resulta na precipitação de compostos e conseqüente supressão da atividade virucida do sumo (SHIROBOKOV *et al.*, 1981). *Kalanchoe pinnata* e *Kalanchoe tubiflora* também apresentaram atividade antitumoral (SUPRATMAN *et al.*, 2001) e *Kalanchoe brasiliensis* demonstrou atividade antiinflamatória e imunomodulatória (IBRAHIM *et al.*, 2002). Com este trabalho, evidencia-se também seu potencial virucida. Demonstradas, pois, suas propriedades antiinflamatórias, imunomodulatórias e antivirais, a *Kalanchoe brasiliensis* revela-se um ingrediente promissor para a formulação de medicamentos para o tratamento das herpesvíroses.

#### 4. CONCLUSÕES

O extrato bruto de *Kalanchoe brasiliensis* apresenta uma atividade virucida razoável e índice terapêutico relativamente alto (88,16%) *in vitro*, podendo ser utilizado em formulações para o tratamento das manifestações clínicas do BHV-1 em bovinos. São necessários testes *in vivo* para avaliação de seu potencial na redução da liberação de vírus infectivos para o ambiente e na diminuição do curso clínico da doença.

## **CAPÍTULO V**

### **PERSPECTIVAS DO TRATAMENTO HOMEOPÁTICO NAS INFECÇÕES HERPÉTICAS DE BOVINOS**

## RESUMO

SCHIAVO, Paula Amorim. **Perspectivas do tratamento homeopático nas infecções herpéticas de bovinos**. Seropédica: UFRRJ, 2005. 111 p. VI capítulos. (Dissertação, Mestrado em Medicina Veterinária).

A Homeopatia baseia-se na cura pelo semelhante e na administração de substâncias de origem animal, vegetal ou mineral em quantidades infinitamente pequenas. Assim, a administração de substâncias que provoquem certos sintomas em um determinado indivíduo sadio, porém sensível, é capaz de curar os mesmos sintomas na doença natural, quando diluídas e dinamizadas, embora os sintomas não sejam, nestas duas ocasiões, provocados pelo mesmo agente mórbido. A dimensão da importância dos tratamentos fitoterápicos e homeopáticos aumentou com a exigência de produtos animais livres de resíduos e com a possibilidade de agregação de valor à carne e ao leite com o sistema de produção orgânico. Sucesso no uso dos bioterápicos homeopáticos utilizando o próprio agente causal das doenças foi obtido em infecções como a gripe, a varíola, a tuberculose, a tripanossomose e a ceratoconjuntivite infecciosa bovina. Da mesma forma, a utilização do herpesvírus, diluído e dinamizado homeopaticamente, poderia atuar na prevenção da virose e no tratamento dos animais acometidos. Os medicamentos homeopáticos podem estimular a resposta imunológica de indivíduos infectados, diminuindo a eliminação de vírus infectivos para o ambiente; reduzindo os danos provocados pela doença no próprio doente; abreviando o curso da doença; ou prevenindo a infecção de indivíduos suscetíveis não-infectados, diminuindo a incidência da doença. São necessários estudos documentados para avaliação do potencial desta ferramenta no controle das infecções pelo BHV-1 em rebanhos bovinos brasileiros.

**Palavras chave:** BHV-1, homeopatia, herpes, bovinos.

## ABSTRACT

SCHIAVO, Paula Amorim. **Perspectives of Homeopathic Therapeutics in Bovine Herpesvirus Infections**. Seropédica: UFRRJ, 2005. 111 p. VI chapters. (Dissertation, Master Science in Veterinary Medicine).

Homeopathy is based on *similia similibus curantur*, given to the animal exactly the same symptoms to stimulate a greater response by taking animal, vegetal or mineral substances in minimal concentrations. Giving substances to the animal that elicits certain symptoms in normal but sensible animals can treat the same symptoms in the natural illness, when these substances are diluted and dynamized, even if the symptoms are not caused by the same agent. Crescent concern on phytotherapy and homeopathy is because the exigency of animal products free of and the possibility of increasing its commercial value with organic production. Success using homeopathical biotherapies with the natural agent of each infection has been observed with influenza, small pox, tuberculosis, tripanossomiasis, and infectious bovine keratoconjunctivits. So, herpesvirus could be diluted and dynamized for using in the control of the disease and for treating animals infected with BHV-1. Homeopathic preparations could stimulate the immune response of infected animals, decreasing virus shedding to the nature; abbreviate the clinical course of the disease diminishing the damages caused by the virus in the host organism; or preventing the infection of sensible animals, and then decreasing the incidence of the disease. Studies are required for access the potential of this tool in the control of BHV-1 infections in Brazilian cattle herds.

**Palavras chave:** BHV-1, homeopathy, Herpesviridae, cattle.

## 1. INTRODUÇÃO

A Homeopatia, modalidade terapêutica estabelecida a partir de observações e experimentações feitas por Samuel Hahnemann (1842), baseia-se na cura pelo semelhante e na administração de substâncias de origem animal, vegetal ou mineral em quantidades infinitamente pequenas.

Assim, a administração de substâncias que provoquem certos sintomas em um determinado indivíduo sadio, porém sensível, é capaz de curar os mesmos sintomas na doença natural, quando diluídas e dinamizadas, embora os sintomas não sejam, nestas duas ocasiões, provocados pelo mesmo agente mórbido.

A dimensão da importância dos tratamentos fitoterápicos e homeopáticos aumentou com a exigência de produtos animais livres de resíduos (BRASIL,1999) e com a possibilidade de agregação de valor à carne e ao leite com o sistema de produção orgânico. Além disso, o custo destes tratamentos é reduzido quando comparados aos tratamentos convencionais.

## 2. DISCUSSÃO

### O tratamento das Herpesvíroses na Homeopatia

A Herpesvírose caracteriza-se, na Classificação Hahnemanniana de Doença, por doença dinâmica crônica miasmática da diátese da Sicose, entre outros motivos por estabelecer-se em condições de deficiência de imunoglobulinas A e propiciar a formação de vesículas no tecido infectado; assim, medicamentos antissépticos poderiam ser usados na terapêutica *in vivo* desta enfermidade.

### O uso de bioterápicos na Homeopatia

De acordo com a 2ª edição do Manual de Normas Técnicas para Farmácia Homeopática de 1995 (ABFH, 1995), os bioterápicos são definidos como preparações medicamentosas de uso homeopático obtidas a partir de produtos biológicos quimicamente indefinidos como secreções, excreções, tecidos e órgãos, patológicos ou não, produtos de origem microbiana e alérgenos que servem de matéria prima para estas preparações.

A utilização de bioterápicos homeopáticos na prevenção e tratamento de infecções virais já é conhecida há tempos pelos homeopatas, como, por exemplo, nos casos dos bioterápicos *Influenzinum* e *Variolinum*, que constam inclusive de algumas Matérias Médicas (BOERICKE, 1997) e utilizados, respectivamente, no combate às infecções pelos vírus Influenza e pelo poxvírus humano causador da Varíola.

Os primeiros relatos do emprego de bioterápicos datam de 1676, quando Fludd utilizou o escarro tuberculoso no tratamento da tuberculose. Em 1820, o primeiro veterinário homeopata francês, Wilhelm Lux, descreve o uso da secreção nasal de animal doente na diluição de 30 CH no tratamento do mormo equino com êxito (COSTA, 1980).

COSTA (1980), baseado em fundamentação teórica e prática, afirmou que agentes microbianos, dinamizados homeopaticamente até 30 DH se constituem em agentes profiláticos e curativos das infecções e infestações correspondentes com a condição básica de serem inicialmente dinamizados vivos em soro fisiológico, contendo

três bilhões de micróbios por cultura viva, número que deve ultrapassar a infecção a ser tratada.

NASI *et al.* (1982) propuseram o tratamento de camundongos infectados por *Trypanosoma cruzi* com o bioterápico preparado com o referido agente etiológico da Doença de Chagas. Foi observado que os animais tratados apresentaram redução da parasitemia, assim como maior tempo de sobrevivência em relação ao grupo controle. Após o tratamento dos animais infectados, o xenodiagnóstico e a hemocultura revelaram resultado negativo.

BUFFA & AUBAGNA (1995) empregaram um bioterápico de secreção ocular de animais com ceratoconjuntivite infecciosa bovina no tratamento da doença, observando que a metade dos animais tratados com o bioterápico apresentou melhora do quadro clínico com recuperação total das estruturas oculares afetadas, sem recidivas. Tais resultados foram superiores quando comparados ao grupo tratado pela terapia convencional (gentamicina intrapalpebral, dexametasona, cloranfenicol e prednisolona).

Um bioterápico para o tratamento de infecções pelo Herpes Simplex já foi elaborado (COSTA, 2002). Da mesma forma, a utilização do Herpesvírus, diluído e dinamizado homeopaticamente, poderia atuar na prevenção da virose e no tratamento dos animais acometidos.

### **3. CONCLUSÕES**

Considerando que a utilização da Homeopatia para o tratamento de animais de produção não se constitui opção dispendiosa como a utilização dos fármacos antivirais disponíveis no mercado, e que os medicamentos homeopáticos possam trazer benefícios ao estimular a resposta imunológica dos indivíduos infectados, diminuindo a eliminação de vírus infectivos para o ambiente; reduzindo os danos provocados pela doença no próprio doente; abreviando o curso da doença; ou prevenindo a infecção de indivíduos suscetíveis não-infectados, diminuindo a incidência da doença, são necessários estudos documentados para avaliação do potencial desta ferramenta no controle de infecções pelo BHV-1 em rebanhos bovinos brasileiros.

**CAPÍTULO VI**  
**CONTROLE DAS INFECÇÕES PELO HERPESVÍRUS BOVINO**  
**TIPO 1 NO BRASIL**

## RESUMO

SCHIAVO, Paula Amorim. **Controle das Infecções pelo Herpesvírus Bovino Tipo 1 (BHV-1) no Brasil**. Seropédica: UFRRJ, 2005. 111 p. VI capítulos. (Dissertação, Mestrado em Medicina Veterinária).

O BHV-1 está disseminado nos rebanhos bovinos brasileiros, causando problemas reprodutivos, oculares, respiratórios, encefalomiélites e infecções sistêmicas em bezerros, nascimento de animais débeis e quadros de enterite, causando a morte de neonatos. A presença do BHV-1 é objeto de restrições ao comércio internacional de animais e seus produtos, como sêmen, embriões e produtos de biotecnologia. É importante ressaltar que a tendência na maioria dos países é a eliminação da doença, que será a próxima barreira sanitária ao comércio internacional de bovinos e correlatos na União Européia. Assim, a necessidade de adoção de medidas de controle desta virose é urgente. A vacinação não protege os indivíduos da infecção e não pode ser a única ferramenta de controle da infecção em um rebanho. Neste artigo, são discutidos particularidades da doença, vacinação, tratamento e estratégias de controle para esta virose.

**Palavras chave:** BHV-1, controle, viroses bovinas, vacina.

## ABSTRACT

SCHIAVO, Paula Amorim. **Controlling Bovine Herpesvirus Type 1 (BHV-1) Infection in Brazil**. Seropédica: UFRRJ, 2005. 111 p. VI chapters. (Dissertation, Master Science in Veterinary Medicine).

BHV-1 is spread among Brazilian herds, causing reproductive and respiratory disorders, ocular diseases, encephalomyelitis and systemic infection in calves, weak animals, and enteric disease, which leads young calves to death. The absence of BHV-1 in a herd is a limitation condition for international trade of cattle and its products, such as semen, embryos and biotechnology products. It is important to notice that most of the countries are carrying eradication programs against BHV-1 and it may be the next barrier in the international trade of cattle in the European Union. In most countries eradication programs have started. Therefore, we must take control measures for this disease. Vaccination doesn't protect animals from the disease and can't be the unique tool to the control of the infection in a cattle herd. In this paper, it has been discussed properties of the disease, vaccination measures and treatment and control strategies.

**Key words:** BHV-1, control, cattle viruses, vaccine.

## 1. INTRODUÇÃO

Infecções pelo Herpesvírus Bovino (BHV-1) causam grandes perdas econômicas e sanitárias na pecuária, com grande repercussão sobre a nutrição, produção de leite e reprodução (ALFIERI, 2000). Algumas entidades clínicas da infecção pelo BHV-1 têm uma denominação específica como Rinotraqueíte Infeciosa e Vulvovaginite Pustular Infeciosa. Outras manifestações clínicas incluem conjuntivites, abortos, encefalomyelites, mastites, metrites, infertilidades, infecções sistêmicas em animais jovens e enterites (LEMAIRE *et al.*, 1994). Infecções bacterianas secundárias podem levar a quadros mais severos (OIE, 2004a).

O impacto econômico da infecção pelo BHV-1 pode ser observado pelo retardo do crescimento de animais jovens, queda da produção leiteira, abortos e natimortos e a reduzida eficiência reprodutiva de matrizes e touros (LEMAIRE *et al.*, 1994). Acrescentam-se as restrições ao comércio internacional de animais vivos e seus produtos, como sêmen, embriões e produtos de biotecnologia, previstas no Código Internacional de Saúde Animal (OIE, 2004b). A herpesvírose bovina, além das perdas econômicas, pode apresentar sintomatologia semelhante à da Febre Aftosa e outras enfermidades vesiculares, de forma que o diagnóstico diferencial de laboratório passou a ser exigido. A alta incidência de animais positivos representa um sério risco para a atividade pecuária, considerando-se a insidiosidade da infecção, que apresenta uma forma latente (subclínica), facilmente despercebida dos profissionais e criadores envolvidos com a bovinocultura (GRÉGIO, 1999).

O vírus está distribuído mundialmente, atingindo bovídeos domésticos e selvagens, mas foi erradicado da Áustria, Dinamarca, Finlândia, Suíça e Suécia, e programas de controle foram iniciados em outros países europeus (OIE, 2004a). No Brasil a doença tem sido diagnosticada por sorologia, o que demonstra ser a infecção mais freqüente do que o suposto. O BHV-1 encontra-se disseminado nos rebanhos bovinos leiteiros e de corte de diversos estados brasileiros (CONTREIRAS *et al.*, 1986; PITUCO, 1988; ANUNCIACÃO *et al.*, 1989; RAVAZZOLO *et al.*, 1989; LOVATO *et al.*, 1995; VIDOR *et al.*, 1995; GRÉGIO, 1999). Tanto no Brasil como em outros países da América do Sul há grande variedade de resultados, em consequência do uso de diferentes técnicas de amostragem, de diagnóstico laboratorial e de diferenças regionais. Entretanto, conclui-se que o BHV-1 está distribuído nos vários países afetando rebanhos

bovinos de corte e leite e provocando distúrbios respiratórios e reprodutivos. Há necessidade de pesquisas mostrando o impacto econômico desta doença no Brasil (PITUCO & DEL FAVA, 1998).

Pelos prejuízos causados pela doença, vários métodos têm sido utilizados, em todo o mundo, para o diagnóstico e controle da IBR/IPV. A tendência na maioria dos países é a eliminação da doença. A importância da doença tem sido tão marcante que a enfermidade será a próxima barreira sanitária ao comércio internacional de bovinos e correlatos na União Européia (VAN OIRSCHOT *apud* TEIXEIRA *et al.*, 2001). Autoridades sanitárias da União Européia devem estender a todos os países-membro a aplicação de medidas para erradicação da IBR (CASTRUCCI *et al.*, 2004). Há, portanto, urgência na definição de novas estratégias de controle da infecção, que serão de grande interesse no combate da doença em todo o mundo.

## 2. DISCUSSÃO

### Perspectivas de tratamento

Como em toda enfermidade viral, o tratamento é de pouco ou nenhum resultado. Casos não complicados de doença respiratória ou genital causada pelo BHV-1 duram 5-10 dias (OIE, 2004a). É recomendado o uso de antibióticos em caso de infecções bacterianas secundárias que possam complicar o quadro clínico. É imprescindível o isolamento dos doentes. (ARBOLEDA *et al.*, 1996).

Como os sintomas clínicos podem ser suscitados por imunodepressão natural ou induzida por corticóides, uma alternativa seria o uso de imunomoduladores. Em seus experimentos, Castrucci *et al.* (2000) verificaram que o uso de um bioterápico com o parapoxvírus ovino inativado<sup>1</sup> reduziu a severidade dos sintomas da IBR e reduziu significativamente a liberação de vírus nos animais tratados, mas a amostragem foi baixa. Uma desvantagem do uso de imunomoduladores comerciais seria o custo do tratamento.

As drogas antivirais encontradas no mercado são poucas e caras, não sendo aplicáveis em Medicina Veterinária. Grandes esperanças são depositadas nas pesquisas de atividade antiviral e imunomoduladora de substâncias naturais, como alternativa eficiente e economicamente viável de tratamento, respectivamente, pela menor possibilidade da existência de resistência viral, como acontece com o aciclovir, já que são compostos novos; e pela disponibilidade na natureza.

Um flavonóide da soja já demonstrou atividade anti-BHV-1 *in vitro* (AKULA *et al.*, 2002): genisteína, uma isoflavona da soja, limita a replicação do BHV-1 *in vitro* por sua capacidade de inibir a atividade da tirosina quinase, inibindo a fosforilação da glicoproteína E (gE) e a replicação do BHV-1 de maneira dose-dependente. Uma possível aplicação é alimentar os bovinos com produtos de soja ricos em genisteína antes de ou durante períodos de estresse (AKULA *et al.*, 2002).

---

<sup>1</sup> Baypamun®, Bayer, retirado da linha comercial.

## Controle

Em alguns países, testes sorológicos e subsequente sacrifício têm sido empregados. Em outros, vacinas vivas e inativadas têm sido utilizadas para o controle da doença. Medidas preventivas têm sido tomadas para melhorar os programas de controle e erradicação da doença, como por exemplo o controle do trânsito de animais em áreas livres da doença (KIT *et al.*, 1992).

Na simulação do programa de erradicação da Holanda, a incerteza relativa à fatores como disseminação local e reativação do BHV-1 tiveram o maior impacto sobre a previsão de período necessários e custos para erradicação do BHV-1. O desconhecimento da taxa de reativação anual em animais latentemente infectados afetou os custos em 43 milhões de Euros. Estimou-se um período médio de 334 semanas com custos médios de 106 milhões de Euros para alcançar a prevalência de 5% nas vacas da população leiteira (VONK NOORDEGRAAF *et al.*, 2002). O modelo usado para simulação apontou como fatores de maior risco o alto número de gado comprado a cada ano, a densidade dos rebanhos num raio de 1 km e a densidade da população bovina dentro do raio de 1 km (VONK NOORDEGRAAF *et al.*, 2004).

Na Suíça, o programa nacional teve como diretrizes a prevenção da transmissão através da restrição do trânsito de animais para áreas sorologicamente positivas, sacrifício de animais com sorologia positiva e de reservatório, e monitoramento sorológico do rebanho e ações legais adotadas pelo governo para a manutenção do programa. Entretanto, este programa de controle é apropriado para países com território e rebanhos pequenos, tornando-se inviável e altamente dispendioso quando aplicado em países com limites e rebanhos grandes (KIT *et al.*, 1992).

Na Dinamarca, a análise da prevalência para o projeto de erradicação foi avaliada sob duas perspectivas: primeiro, em relação às exigências internacionais, depois, pela necessidade nacional de detectar rapidamente as reses infectadas, envolvendo a determinação do sistema de prevalência mais sensível para detecção dos animais portadores. O programa de erradicação dinamarquês começou em 1983, se tornando compulsório em 1985, e foi baseado na testagem e subsequente abate dos animais positivos, aliada à movimentação controlada de gado. Antes, porém, a IBR havia sido erradicada dos centros de inseminação artificial, em 1979. O país foi declarado livre da doença em fevereiro de 1991. A erradicação elevou o preço do sêmen e da carne no mercado internacional, reduziu o número de abortos e a mortalidade e

aumentou a produtividade dos rebanhos. Hoje, o programa de monitoramento dinamarquês inclui também a testagem para Leucose Enzoótica Bovina e BVD (GREINER, 2003).

Na legislação dinamarquesa para a IBR a vacinação foi proibida desde o início do programa. Observou-se que a vacinação não reduzia a transmissão da doença, além de ser dispendiosa (GREINER, 2003).

Recomenda-se um período de quarentena de 2 a 3 semanas antes da introdução de gado, e então apenas o gado soronegativo deve ser admitido no rebanho (OIE, 2004a). A proteção contra a entrada do vírus em rebanhos livres não têm recebido a importância devida. VAN SCHAIK *et al.* (2002) ressaltam a necessidade de evitar o contato direto entre animais de outra origem e os profissionais devem ser instruídos para usar roupa protetora antes de manejarem o gado. MARS *et al.* (2000) aconselham uma distância de pelo menos 4,4 metros entre populações bovinas para reduzir a transmissão do BHV-1. Na Dinamarca, rebanhos próximos a um foco suspeito de IBR num raio de 2 km são testados (GREINER, 2003). Não esquecer outras possibilidades de entrada do vírus na propriedade. Na Alemanha, um rebanho inteiro era soronegativo para o BHV-1, e após um incêndio na fazenda foi demonstrada a infecção pelo BHV-1 (embora sem sinais clínicos), creditando-se aos bombeiros e vizinhos das comunidades rurais próximas (com vários rebanhos positivos para o BHV-1) a responsabilidade pela introdução do BHV-1 no rebanho (STRAUB, 2002). É importante considerar inclusive a veiculação mecânica do vírus por materiais, insetos (JOHNSON *et al.*, 1991), outras espécies animais e até verminoses (GRAAT *et al.*, 2001).

PITUCO *et al.* (1997) tiveram sucesso no controle da infecção em 10 rebanhos bovinos leiteiros em sistema semintensivo utilizando as seguintes medidas:

- hiperimunização (vacinação semestral dos soropositivos);
- eliminação gradual dos soropositivos;
- monitoramento sorológico dos negativos;
- quarentena;
- utilização de sêmen livre de BHV-1.

## **Vacinação**

Várias vacinas convencionais e fabricadas a partir de novas tecnologias estão disponíveis, mas é difícil traçar uma conclusão sobre sua eficácia, já que elas vêm sendo estudadas em pesquisas isoladas.

As vacinas devem proteger os bovinos da doença clínica e reduzir notavelmente a subsequente liberação de vírus do ambiente. Ainda, não devem induzir doença, aborto ou qualquer reação local ou sistêmica, e devem ser geneticamente estáveis (OIE, 2004a).

As vacinas inativadas parecem ser mais seguras, já que as vacinas atenuadas podem ocasionar abortos (RADOSTITS *et al.*, 2002). Além disso, as vacinas atenuadas comerciais podem estabelecer latência (CASTRUCCI *et al.*, 2002a; CASTRUCCI *et al.*, 2002b).

Uma vacina comercial tetravalente disponível também em nosso mercado não é capaz de proteger os animais da infecção, embora abrevie o curso da doença (PATEL, 2004; PETERS *et al.*, 2004). KERKHOFES *et al.* (2003) obtiveram um melhor desempenho das vacinas inativadas frente às vacinas vivas modificadas disponíveis comercialmente.

Apesar do comércio de vacinas contra BHV-1 com vírus inativado ou termosensível estar autorizado no Brasil, normas oficiais não foram determinadas pelas autoridades sanitárias para o combate da doença, o que tem suscitado muitas controvérsias com relação a condutas a serem adotadas (PITUCO & DEL FAVA, 1998).

Vários problemas são observados em programas de controle usando a vacinação. O principal é a não-distinção entre os animais vacinados e os doentes. Neste ponto, as vacinas marcadoras seriam ferramentas úteis. As vacinas deletadas, apesar de não protegerem da infecção nem da excreção de vírus subsequente, protegem da doença clínica (KAASHOEK *et al.*, 1998; VAN ENGELBURG *et al.*, 1995). Contudo, o uso de vacinas vivas modificadas sob imunidade passiva produz infecções agudas e latentes mesmo nos animais imunizados passivamente, sendo que estes últimos se tornam portadores latentes soronegativos (HAGE *et al.*, 1998), que até mesmo os ensaios para detecção de imunidade celular falham em detectar (LEMAIRE *et al.*, 2000a).

Em 1995, vacinas marcadoras de mutantes deletadas se tornaram disponíveis. O uso de um ELISA para detecção da gE tornou possível a distinção de bovinos infectados de bovinos vacinados com uma vacina marcadora (OIE, 2004a). Baseando-se na virulência residual e imunogenicidade, escolhe-se os mutantes gG- ou gE-deletados para incorporação em vacinas, dependendo da cinética da resposta de anticorpos anti-gG e anti-gE após a infecção com vírus de campo. Foi sugerido que cepas virulentas teriam

menor potencial de inibição da excreção viral após a infecção, num mesmo experimento que demonstrou que a deleção da gC não diminui a virulência do BHV-1, enquanto a deleção da gI reduz quase por completo a virulência (KAASHOEK *et al.*, 1998). Uma vacina expressando a gC induziu a formação de anticorpos e resposta linfoproliferativa, mas ainda não suficientes para proteger os bezerros da infecção nem da doença (GUPTA *et al.*, 2001). Um plasmídeo vetor do DNA para a gD foi usado como vacina, sem sucesso, não conferindo proteção nem mesmo contra a doença clínica (CASTRUCCI *et al.*, 2004).

As vacinas marcadoras mais usadas são as que empregam o BHV-1 deletado da glicoproteína E (gE) do envelope. A gE é observada nas junções intercelulares de cultivos infectados, e se sabe ser envolvida na transmissão célula-a-célula do BHV-1 (NAKAMICHI *et al.*, 2002). Neste caso, os testes sorológicos buscariam anticorpos contra a gE nos soros, e os animais positivos seriam gradualmente eliminados. A deleção da gE parece ser um bom marcador, que permite a diferenciação entre animais com anticorpos vacinais e, até mesmo, anticorpos adquiridos passivamente através do colostro de vacas imunizadas com vacinas deletadas, porém não previnem a infecção pelo vírus de campo (TOUSSAINT *et al.*, 2004; SCHYNTS *et al.*, 2001; LEMAIRE *et al.*, 1999). Ainda assim, resultados falso-positivos ocorrem, pois a fonte de antígeno geralmente consiste numa preparação viral bruta na qual a gE é associada com outras glicoproteínas de envelope (LEHMANN *et al.*, 2002). Outro problema é o custo dos kits para estes testes.

A vacinação intranasal com uma vacina viva deletada da gE suscitaria uma resposta rápida que diminuiria a liberação de vírus de campo numa infecção por contato, apesar de não prevenir a infecção (KAASHOEK & VAN OIRSCHOT, 1996). Quando as vacinas são aplicadas pela via intramuscular, a excreção de vírus é menor, comparando com a via intranasal; entretanto, não protegem dos sinais clínicos (CASTRUCCI *et al.*, 2002b). Num experimento avaliando o desempenho de oito vacinas comerciais, nenhuma delas foi capaz de prevenir a excreção de vírus pelos bezerros vacinados e, uma gE-deletada, três atenuadas para uso intranasal e outra para uso intramuscular não preveniram nem mesmo a doença clínica (CASTRUCCI *et al.*, 2002b).

Mesmo as vacinas gE-negativas provocam a excreção de vírus pelos animais vacinados (CASTRUCCI *et al.*, 2002b; STRAUB, 1996). LEMAIRE *et al.* (2001) demonstraram que o BHV-1 gE-negativo estabelece latência com posterior reexcreção

viral após um único contato intranasal. Além disso, quando a vacina gE-negativa é usada em bezerros imunizados passivamente, pode determinar portadores soronegativos do vírus vacinal (LEMAIRE *et al.*, 2001). Cepas gE-deletadas “de campo” já foram isoladas de vacas vacinadas oito meses antes (DISPAS *et al.*, 2003). Sugere-se que a incorporação de uma mutação do gene relacionado à latência nas vacinas vivas modificadas possa prevenir a reativação do vírus vacinal (PEREZ *et al.*, 2005).

Vacinas de DNA e vacinas recombinantes são novas esperanças. A seleção das glicoproteínas para inclusão em vacinas de subunidades, bem como suas concentrações, são os aspectos mais críticos para a produção deste tipo de vacina (CASTRUCCI *et al.*, 2002b). ZAKHARTCHOUK *et al.* (1999) verificaram que a recombinação da gD com o adenovírus bovino tipo 3 induz imunidade. Anos antes, BOSCH *et al.* (1996) verificaram que a proteção conferida pela vacina gE-deletada é melhor que a vacina de subunidades de gD. A fusão da VP 22 na vacina com um plasmídeo contendo o código para a gD melhoraria substancialmente o desempenho desta vacina recombinante (ZHENG *et al.*, 2005). GOGEV *et al.* (2004) usaram uma formulação solúvel quitosana-glicol como adjuvante para uma vacina intranasal de subunidade gD com boa resposta.

Vacinas de DNA combinadas, por exemplo, codificando tanto a gB quanto a gD, também parecem induzir melhores respostas celulares e humorais que vacinas com plasmídeos isolados (CASELLI *et al.*, 2005).

A contaminação das vacinas contra BHV-1 produzidas em cultivo celular com o vírus da diarreia viral bovina (BVD) é outro problema das vacinas inativadas, já que este último pode não apresentar efeito citopatogênico, dificultando sua detecção. Em fevereiro de 1999, uma vacina contra IBR contaminada com uma cepa agressiva do BVDV foi usada acidentalmente em um rebanho na Holanda. Somente os bovinos com anticorpos contra a BVD sobreviveram (VERBERNE, 2000). KLEIBOEKER *et al.* (2003), usando uma vacina polivalente comercial ativa modificada, formulada para aplicação parenteral, verificaram viremia por BVDV1 3 a 10 dias após a inoculação.

A importância da vacinação não é negligenciada; contudo, a vacinação não pode ser a única medida de controle da herpesvirose em um rebanho, e a tomada de medidas importantes como identificação, isolamento e gradativa eliminação dos animais portadores se torna difícil com o emprego das imunizações.

De maneira geral, as medidas de controle devem objetivar diminuir a incidência de animais infectados pelo BHV-1 até níveis que permitam a sua erradicação do rebanho.

O primeiro e indispensável passo para qualquer programa de erradicação deveria ser a identificação detalhada do rebanho, começando pelo plantel, por aptidão (leite ou carne) e tipo de produção e data do início das atividades, ficha de diagnósticos veterinários e status para outras doenças, propósito da criação, por exemplo, exportação, abate, comércio de reprodutores e de sêmen. Um sistema de identificação por números (brincos, por exemplo) deve ser adotado para possibilitar um banco de dados com o código de identificação do animal, data de nascimento, sexo, raça, pelagem, local de nascimento, fontes de alimento, todos os locais onde o animal passou, data de cada movimentação e data da morte, bem como nome e endereço do proprietário. Os eventos seriam registrados no máximo sete dias depois de ocorrido. A taxa de contato com uma rês de outro rebanho tem de ser conhecida em cada rebanho. No comércio interno, um sistema de mensagens computadorizados deve ser usado entre os estados-membro. Este foi o modelo utilizado no programa de erradicação dinamarquês (GREINER, 2003).

### 3. CONCLUSÕES

Há 30 anos se busca uma vacina que previna, ao menos, as manifestações clínicas das infecções pelo BHV-1 (KAHRS, 1974). O estudo isolado da eficácia das vacinas produzidas desde então não permitiu uma conclusão e este assunto será ainda tema de calorosos debates.

As medidas de controle propostas excluem totalmente o uso de vacinas atenuadas, que podem tornar o animal persistentemente infectado. O uso de vacinas que não permitam a diferenciação entre animais infectados e animais vacinados também é desencorajado.

Como primeiro passo para a definição de um programa de controle das infecções pelo BHV-1, há necessidade de um sistema de identificação e registro do rebanho bovino

Assim, propomos as seguintes medidas de controle para a infecção:

- identificação detalhada do rebanho;
- levantamento sorológico inicial e, depois, adoção de um programa de monitoramento constante (pelo menos duas vezes ao ano);
- manutenção da boa saúde dos animais, com especial atenção para a diminuição do estresse no manejo e prevenção dos desequilíbrios nutricionais;
- controle do trânsito de animais na propriedade;
- controle do trânsito de técnicos e profissionais entre os ambientes;
- controle dos insetos e verminoses;
- controle dos materiais que possam participar na veiculação mecânica;
- utilização de sêmen e produtos controlados para o BHV-1;
- testes sorológicos antes da introdução de novos animais no rebanho;
- admissão na propriedade de animais livres da infecção, exclusivamente;
- isolamento e descarte dos animais positivos.

Estas medidas visam diminuir a incidência de animais infectados pelo BHV-1 até níveis que permitam a sua erradicação do rebanho.

#### 4. CONCLUSÕES GERAIS

- O BHV-1 está disseminado em rebanhos de corte e de leite do Estado do Rio de Janeiro. Medidas urgentes devem ser tomadas para o controle da infecção.
- O teste de neutralização em microplacas pode ser usado para determinar o título de anticorpos no colostro.
- Para o diagnóstico das infecções em vacas prenhes ou recém-paridas, colher amostras tanto do soro quanto do colostro e proceder à determinação de anticorpos, já que a testagem de um dos dois isoladamente falha em identificar todas as matrizes infectadas.
- São necessários estudos para avaliação do potencial de bioterápicos homeopáticos como ferramentas para o controle da infecção pelo BHV-1.
- O extrato bruto de *Kalanchoe brasiliensis* pode ser usado em formulações tópicas para o controle das lesões pelo BHV-1 em bovinos.
- É necessário proceder a identificação detalhada dos animais de todos os rebanhos e o controle do trânsito de animais como primeiros passos para um programa de controle das infecções pelo BHV-1.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABFH. *Manual de Normas Técnicas para Farmácia Homeopática* 2ª ed., 1997.

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

AKULA, S.M.; HURLEY, D.J.; WIXON, R.L.; WANG, C.Y.; CHASE, C.C.L. Effect of genistein on replication of bovine herpesvirus type 1. *American Journal of Veterinary Research*, v.63, n.8, p.1124-1128, 2002.

ALFIERI, A. Bovine Herpesvirus type 1: seroprevalence and virus isolation in beef and dairy herds in Brazil. *Virus Reviews & Research*, v.5, n.2, suppl.1, p.42-43, 2000.

ANUNCIÇÃO, A.V.M.; LEITE, R.C.; MOREIRA, E.C. Presença de anticorpos para o herpesvírus bovino 1 (BHV-1) em bovinos nos Estados de Minas Gerais, Goiás e Rio de Janeiro, através da prova de hemaglutinação passiva. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.41, n.5, p.433-441, 1989.

ARBOLEDA, J.J.; RODAS, J.D.; OSSA, J.E.; ZULUAGA, F.N. Espectro clínico y epidemiológico de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, v.9, n.1-2, p.3-13, 1996.

ANDRADE, C. M. *Meios e soluções comumente empregados em laboratórios*. 1ª ed. Seropédica: Ed. Universidade Rural, 2000.

BOERICKE, W. *Manual de Matéria Médica Homeopática*, 9ª ed. São Paulo: Robe Editorial, 1997.

BOHRER, J.L.; FILARDI, L.S.; SIMON, F.; IKUNO, A.A.; MUELLER, S.B.K. Presença de anticorpos contra o vírus da rinotraqueíte infecciosa dos

bovinos/vulvovaginite pustular infecciosa (IBR/IPV) em capivaras (*Hydrochoerus hydrochoeris*, Lin). *Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo*, v.54, n.1-4, p.45-48, 1987.

BOSCH, J.C.; KAASHOEK, M.J.; KROESE, A.H.; VAN OIRSCHOT, J.T. An attenuated bovine herpesvirus 1 marker vaccine induces a better protection than two inactivated marker vaccines. *Veterinary Microbiology*, v.52, n. 3-4, p. 223-234, 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa nº 42, de 22 de dezembro de 1999.

BRINKER, F. *Formulas for Healthful Living*. Sandy: Ecletic Medical Publications. 1995.

BUFFA, J. A.; AUBAGNA, M. D. Eficacia de los autosodes en el tratamiento de la queratoconjuntivitis infecciosa bovina. *Revista Homeopatica*, v. 29, p. 25-27, 1995.

CARDOS, S.M.S.; ANUNCIÇÃO, A.V.M.; FIGUEIREDO, A. Presence of antibodies to bovine herpesvirus 1 in the serum of goats in Bahia State, Brazil. *Arquivos da Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia*, v.14, n.1, p.150-163, 1991.

CASELLI, E.; BONI, M.; DI LUCA, D.; SALVATORI, D.; VITA, A.; CASSAI, E. A combined bovine herpesvirus 1 gB-gD DNA vaccine induces immune response in mice. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, v. 28, n. 2, p. 155-66, 2005.

CASTRUCCI, G.; FERRARI, M.; MARCHINI, C.; SALVATORI, D.; PROVINCIALI, M.; TOSINI, A.; PETRINI, S.; SARDONINI, Q.; LO-DICO, M.; FRIGERI, F.; AMICI, A. Immunization against bovine herpesvirus-1 infection. Preliminary tests in calves with a DNA vaccine. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, v. 27, n.3, p. 171-179, 2004.

CASTRUCCI, G.; FRIGERI, F.; SALVATORI, D.; FERRARI, M.; DICO, M.L.; ROTOLA, A. SARDONINI, Q.; PETRINI, S.; CASSAI, E.; LO-DICO, M. A study on

latency in calves by five vaccines against bovine herpesvirus-1 infection. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, v.25, n.4, p.205-215, 2002a.

CASTRUCCI, G.; FRIGERI, F.; SALVATORI, D.; FERRARI, M.; SARDONINI, Q.; CASSAI, E.; DICO, M.L.; ROTOLA, A.; ANGELINI, R.; LO-DICO, M. Vaccination of calves against bovine herpesvirus-1: assessment of the protective value of eight vaccines. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, v.25, n.1, p.29-41, 2002b.

CASTRUCCI, G.; OSBURN, B.I.; FRIGERI, F.; FERRARI, M.; SALVATORI, D.; DICO, M.L.; BARRECA, F.; LO DICO, M. The use of immunomodulators in the control of infectious bovine rhinotracheitis. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, v.23, n.3, p.163-173, 2000.

CHEATHAN, W.J.; CRANDELL, R.A.: Occurrence of intranuclear inclusions in tissue cultures infected with infectious bovine rhinotracheitis. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, v.96, n.3, p.536-538, 1957.

CONTREIRAS, E.C.; KIMURA, L.M.S.; ROMJIN, P.C.; LOPES, A.S.; GRÜNE, A. Detecção de anticorpos anti-rinotraqueíte infecciosa bovina/vulvovaginite pustular infecciosa (IBR/IPV) em rebanho bovino no Estado do Rio de Janeiro. In: XX CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 1986, Cuiabá/MT. *Anais...* 1986. p.229.

CORTESE, V.S.; MORLEY, P.S. Effects of perinatal vaccination on humoral and cellular immune responses in cows and young calves. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v.208, n.3, p.393-400, 1996.

COSTA, R.A. *Homeopatia Atualizada*. Petrópolis: RA Costa Editora, 1980. 111 p.

COSTA, R. *Nosódios Vivos*. Rio de Janeiro: Farmácia Homeopática Átomo, 2002. 62 p.

DIMITROVA, Z.; DIMOV, B.; MANOLOVA, N.; PANCHEVA, S.; ILIEVA, D.; SHISHKOV, S. Antiherpes effect of *Melissa officinalis* L. extracts. *Acta Microbiologica Bulgarica*, v.29, p.65-72, 1993.

DISPAS, M.; SCHYNTS, F.; LEMAIRE, M.; LETELLIER, C.; VANOPDENBOSCH, E.; THIRY, E.; KERKHOF, P. Isolation of a glycoprotein E-deleted bovine herpesvirus type 1 strain in the field. *Veterinary Record*, v.153, n.7, p.209-212, 2003.

ENGELS, M. Some aspects of the pathogenesis of the BHV-1 and BHV-5 infections. *Virus Reviews & Research*, v.5, n.2, suppl. 1, p.25, 2000.

FUCHS, M.; HUBERT, P.; DETTERER, J.; RZIHA, H.J. Detection of bovine herpesvirus type 1 in blood from naturally infected cattle by using a sensitive PCR that discriminates between wild-type virus and virus lacking glycoprotein E. *Journal of Clinical Microbiology*, v.37, p.2498–2507, 1999

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

GLOTOV, A.G.; GLOTOVA, T.I.; SERGEEV, A.A.; BELKINA, T.V.; SERGEEV, A.N. [Antiviral activity of different drugs in vitro against viruses of bovine infectious rhinotracheitis and bovine diarrhea] *Vopr. Virusol.*, v.49, n.5, p. 43-46, 2004.

GOGEV, S.; DE FAYS, K.; VERSALI, M.F.; GAUTIER, S.; THIRY, E Glycol chitosan improves the efficacy of intranasally administrated replication defective human adenovirus type 5 expressing glycoprotein D of bovine herpesvirus 1. *Vaccine*, v.22, n. 15-16, p. 1946-53, 2004.

GRAAT, E.A.M.; DE JONG, M.C.M.; FRANKENA, K.; FRANKEN, P. Modelling the effect of surveillance programmes on spread of bovine herpesvirus 1 between certified cattle herds. *Veterinary Microbiology*, v.79, p.193-208, 2001.

GRÉGIO, C. R. V. *Perfil de anticorpos neutralizantes para o vírus da rinotraqueíte infecciosa dos bovinos no rebanho do Estado do Rio de Janeiro*. Dissertação (Mestrado). Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Veterinária, UFRRJ, Seropédica, RJ, 1999.

GREINER, M. Report on International EpiLab Project 5. 2003. Disponível em: <[http://www.dfvf.dk/Files/Filer/EpiLab/Internal%20reports/EpiLab\\_Bi-Annual\\_report\\_2001-2002.pdf](http://www.dfvf.dk/Files/Filer/EpiLab/Internal%20reports/EpiLab_Bi-Annual_report_2001-2002.pdf)>. Acesso em: 14 dez. 2004, 12:41

GUPTA, P.K.; SAINI, M.; GUPTA, L.K.; RAO, V.D.; BANDYOPADHYAY, S.K.; BUTCHAIHAH, G.; GARG, G.K.; GARG, S.K. Induction of immune responses in cattle with a DNA vaccine encoding glycoprotein C of bovine herpesvirus-1. *Veterinary Microbiology*, v.78, n.4, p. 293-305, 2001.

HAGE, J.J.; GLAS, R.D.; WESTRA, H.H.; MARIS-VELDHUIS, M.A.; VAN OIRSCHOT, J.T.; RIJSEWIJK, F.A. Reactivation of latent bovine herpesvirus 1 in cattle seronegative to glycoproteins gB and gE. *Veterinary Microbiology*, v.60, n.2-4, p.87-98, 1998.

HAHNEMANN, S. *Organon da arte de curar* 6<sup>a</sup> ed. São Paulo: Robe Editorial: 2001. 248 p.

IBRAHIM, A.; SAW, S.P.; FATIMAH, I.; SAHAREE, A.A. Isolation of infectious bovine rhinotracheitis virus from buffalo in Malaysia. *Veterinary Record*, v.113, n.8, p. 182-183, 1983.

IBRAHIM, T.; CUNHA, J.M.; MADI, K.; DA FONSECA, L.M.; COSTA, S.S.; GONÇALVES KOATZ, V.L. Immunomodulatory and anti-inflammatory effects of *Kalanchoe brasiliensis*. *Int. Immunopharmacol.*, v.2, n.7, p.875-83, 2002.

INGLIS, D.M.; BOWIE, J.M.; ALLAN, M.J.; NETTLETON, P.F. Ocular disease in red deer calves associated with a herpesvirus infection. *Veterinary Record*, v.113, n.8, p. 182-183, 1983.

JOHSON, G.D.; CAMPBELL, J.B.; MINOCHA, H.C.; BROCE, A.B. Ability of *Musca autumnalis* (Diptera: Muscidae) to acquire and transmit bovine herpesvirus 1. *Journal of Medical Entomology*, v.28, n.6, p.841-846, 1991.

KAASHOEK, M.J.; RIJSEWIJK, F.A.; RUULS, R.C.; KEIL, G.M.; THIRY, E.; PASTORET, P.P.; VAN OIRSCHOT, J.T. Virulence, immunogenicity and reactivation

of bovine herpesvirus 1 mutants with a deletion in the gC, gG, gI, gE, or in both the gI and gE gene. *Vaccine*, v.16, n.8, p.802-809, 1998.

KAASHOEK, M.J.; VAN OIRSCHOT, J.T. Early immunity induced by a live gE-negative bovine herpesvirus 1 marker vaccine. *Veterinary Microbiology*, v.53, n.1-2, p.191-197, 1996.

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

KAHRS, R.F. Rational basis for an immunization program against the common disease of the bovine respiratory tract. *Canadian Veterinary Journal*, v.15, p.252-256, 1974.

KEIL, G.M.; HOHLE, C.; GIESOW, K.; KONIG, P. Engineering glycoprotein B of bovine herpesvirus 1 to function as transporter for secreted proteins: a new protein expression approach. *Journal of Virology*, v.79, n.2, p.791-799, 2005.

KENDRICK, J.W.; McENTREE, K. The effect of artificial insemination with semen contaminated with IBR-IPV virus. *Cornell Veterinarian*, v.57, p.3-11, 1987.

KERKHOFS, P.; RENJIFO, X.; TOUSSAINT, J.F.; LETELLIER, C.; VANOPDENBOSCH, E.; WELLEMANS, G. Enhancement of the immune response and virological protection of calves against bovine herpesvirus type 1 with an inactivated gE-deleted vaccine. *Veterinary Record*, v.152, n.22, p.681-686, 2003.

KIT, S.; OTSUKA, H.; KIT, M. A blocking ELISA for distinguishing infectious bovine rhinotracheitis virus (IBRV) infected animals from those vaccinated gene deleted marker vaccine. *Journal of Virology Methods*, v.40, p.45-56, 1992.

KLEIBOEKER, S.B.; LEE, S.M.; JONES, C.A.; ESTES, D.M. Evaluation of shedding of bovine herpesvirus 1, bovine viral diarrhea virus 1, and bovine viral diarrhea virus 2 after vaccination of calves with a multivalent modified-live virus vaccine. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v.222, n.10, p. 1399-1403, 2003.

KRAMPS, J.A.; BANKS, M.; BEER, M.; KERKHOF, P.; PERRIN, M.; WELLENBERG, G.J.; OIRSCHOT, J.T. Evaluation of tests for antibodies against bovine herpesvirus 1 performed in national reference laboratories in Europe. *Veterinary Microbiology*, v.102, n.3-4, p. 169-181, 2004.

LEHMANN, D.; SODOYER, R.; LETERME, S.; CREVAT, D. Improvement of serological discrimination between herpesvirus-infected animals and animals vaccinated with marker vaccines. In: ESVV Veterinary Herpesvirus Symposium, 1<sup>st</sup>, 2001, University of Zurich, Switzerland. *Veterinary Microbiology*, v.86, n.1-2, p. 59-68, 2002.

LEHMKUHL, H.D.; CUTLIP, R.C.; BOLIN, S.R.; BROGDEN, K.A. Seroepidemiologic survey for antibodies to selected viruses in the respiratory tract of lambs. *American Journal of Veterinary Research*, v. 146, n.12, p. 2601-2604, 1985.

LEITE, F.; ATAPATTU, D.; KUCKLEBURG, C.; SCHULTZ, R.; CZUPRYNSKI, C.J. Incubation of bovine PMNs with conditioned medium from BHV-1 infected peripheral blood mononuclear cells increases their susceptibility to *Mannheimia haemolytica* leukotoxin. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.103, n.3-4, p.187-193, 2005.

LEMAIRE, M.; SCHYNTS, F.; MEYER, G.; GEORGIN, J.P.; BARANOWSKI, E.; GABRIEL, A.; ROS, C.; BELAK, S.; THIRY, E. Latency and reactivation of a glycoprotein E negative bovine herpesvirus type 1 vaccine: influence of virus load and effect of specific maternal antibodies. *Vaccine*, v. 19, n.32, p. 4795-4804, 2001.

LEMAIRE, M.; MEYER, G.; BARANOWSKI, E.; SCHYNTS, F.; WELLEMAN, G.; KERKHOF, P.; THIRY, E. 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, n.11, p. 4233-4237, 2000a.

LEMAIRE, M.; WEYNANTS, V.; GODFROID, J.; SCHYNTS, F.; MEYER, G.; LETESSON, J.J.; THIRY, E. Effects of bovine herpesvirus type 1 infection in calves

with maternal antibodies on immune response and virus latency. *Journal of Clinical Microbiology*, v.38, n.5, p. 1885-1894, 2000b.

LEMAIRE, M.; SCHYNTS, F.; MEYER, G.; THIRY, E. Antibody response to glycoprotein E after bovine herpesvirus type 1 infection in passively immunised, glycoprotein E-negative calves. *Veterinary Record*, v. 144, n.7, p.172-176, 1999.

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

LENNETE, E.H.; LENNETE, D.A.; LENNETE, E.T.: *Diagnostics procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections*. 7<sup>th</sup> ed. Washington, D.C.: American Public Health Association, 1995. 633p.

LINHARES, R.E.C.; FELIPE, A.M.M.; NOZAWA, C.M.; ROMAN, JR, W.A.; MELLO, J.P.C. Antiviral activity of plant extracts to polio- and herpesvirus. In: XIII NATIONAL MEETING OF VIROLOGY, 2002. Águas de Lindóia/SP. *Virus Reviews & Research*, v.7, n.1, suppl. 1, p.76, 2002.

LOVATO, L.T.; WEIBLEN, R.; TOBIAS, F.L.; MORAES, M.P. Herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1): Inquérito soropidemiológico no rebanho leiteiro do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Rural*, v.5, n.3, p.425-430, 1995.

MARS, M.H.; DE JONG, M.C.M.; VAN MAANEN, C.; HAGE, J.J.; VAN OIRSCHOT, J.T. Airborne transmission of bovine herpesvirus 1 infections in calves under field conditions. *Veterinary Microbiology*, v.76, p.1-13, 2000.

MOREIRA, S.P.G.; SAMARA, S.I.; FERREIRA, F.; BUZINARO, M.G.; CARVALHO, A.A.B.; DIAS, F.C.: Monitoring of Serum Neutralizing Antibodies against Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus in Calves. *Virus Reviews & Research*, v.5, n.2 sup.1, p.120, 2000.

MURPHY, F.A.; GIBBS, E.P.J.; HORZINEK, M.C.; STUDDERT, M.J. *Veterinary Virology* 3<sup>rd</sup> ed. San Diego: Academic Press. 1999. p.301-325.

MWEENE, A.S.; OKAZAKI, K.; KIDA, H. Detection of viral genome in non-neural tissues of cattle experimentally infected with bovine herpesvirus 1. *Japanese Journal of Veterinary Research*, v.44, p.165–174, 1996.

NAKAMICHI, K.; MATSUMOTO, Y.; OTSUKA, H. Bovine herpesvirus 1 glycoprotein G is necessary for maintaining cell-to-cell junctional adherence among infected cells. *Virology*, v.294, n.1, p.22-30, 2002.

NASI, A. M. T. T.; RIBEIRO, R. D.; LOPES, R. A. Emploi de biotherapiques dans le traitement de souris infectees par *Trypanosoma cruzi* resultats preliminaires. *Annales Homeopathiques Françaises*, v. 24, n. 3, p. 53-64, 1982.

OIE (WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH). *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, 5<sup>th</sup> ed., 2004a. Part 2, Section 2.3, Chapter 2.3.5. Disponível em: <[http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A\\_00056.htm](http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00056.htm)>. Acesso em: 09 out. 2004, 00:06.

OIE (WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH). *Terrestrial Animal Health Code*, 12<sup>th</sup> ed., 2004b. Part 2, Section 2.3, Chapter 2.3.5. Disponível em: <[http://www.oie.int/eng/normes/mcode/en\\_chapitre\\_2.3.5.htm](http://www.oie.int/eng/normes/mcode/en_chapitre_2.3.5.htm)>. Acesso em: 09 out. 2004, 02:04.

PATEL, J.R. Evaluation of a quadrivalent inactivated vaccine for the protection of cattle against diseases due to common viral infections. *Journal of South African Veterinary Association*, v.75, n.3, p. 137-146, 2004.

PEREZ, S.; INMAN, M.; DOSTER, A.; JONES, C. Latency-related gene encoded by bovine herpesvirus 1 promotes virus growth and reactivation from latency in tonsils of infected calves. *Journal of Clinical Microbiology*, v.43, n.1, p. 393-401, 2005.

PETERS, A.R.; THEVASAGAYAM, S.J.; WISEMAN, A.; SALT, J.S. Duration of immunity of a quadrivalent vaccine against respiratory diseases caused by BHV-1, PI3V, BVDV, and BRSV in experimentally infected calves. *Preventive Veterinary Medicine*, v.66, n.1-4, p.63-77, 2004.

PITUCO, E.M.; DEL FAVA, C. Situação do BHV-1 na América do Sul. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE HERPESVÍRUS BOVINO (TIPO 1 E 5) E VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA (BVDV), 1998, Santa Maria/RS. *Anais...* 1998. p.75-87.

PITUCO, E.M.; STEFANO, E.; OKUDA, L.H.; PARAVENTI, R.; COELHO, P.V.; BILYNSKYJ, M.C.V. 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, n.17, supl., p.29, 1997.

PITUCO, E.M. *Ocorrência da Rinotraqueíte Infecciosa dos Bovinos/Vulvovaginite Pustular Infecciosa (IBR/IPV) em Rebanhos Bovinos criados nos Estados de São Paulo, Rio Grande do Sul, Paraná e Minas Gerais*. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP, São Paulo, 1988.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C.; HINCHCLIFF, K.W. *Clínica Veterinária*. 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2002. p.1053-1062.

RAVAZZOLO, A.P.; DAL PIZZOL, M.; MOOJEN, V. 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 da UFRGS*, v.17, p.95-98. 1989.

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

ROIZMAN, B.; DESROSIERS, R.C.; FLECKENSTEIN, B.; LOPEZ, C.; MINSON, A.C.; STUDDERT, M.J. Family Herpesviridae. *Archives of Virology*, v.10, suppl., p.114-127, 1995.

ROIZMAN, B.; CARMICHAEL, L.E.; DEINHARDT, F.; DE THE, G.; NAHMIAS, A.J.; PLOWRIGHT, W.; RAPP, F.; SHELDRIK, P.; TAKAHASHI, M.; WOLF, K. Herpesviridae: Definition, provisional nomenclature and taxonomy. *Intervirology*, v.16, p.201-217, 1981.

SCHYNTS, F.; LEMAIRE, M.; ROS, C.; BELAK, S.; THIRY, E. Establishment of latency associated with glycoprotein E (gE) seroconversion after bovine herpesvirus 1 infection in calves with high levels of passive antibodies lacking gE antibodies. *Veterinary Microbiology*, v. 82, n.3, p. 211-222, 2001.

SHIROBOKOV, V.P.; EVTUSHENKO, A.I.; LAPCHIK, V.F.; SHIROBOKOVA, D.N.; SUPTTEL, E.A. [Antiviral activity of representatives of the family Crassulaceae]. *Antibiotiki*, v.26, n.12, p.897-900, 1981.

STRAUB, O.C. Kann BHV-1 als Folge eines Stallbrandes: einen seronegativen Rinderbestand infizieren? [BHV-1 infection in a herd of cattle resulting from a fire]. *Tierärztliche Umschau*, v.57, n.8, p.412-413, 2002.

STRAUB, O.C. Experiences with two BHV-1 Marker Vaccines. In: XIX WORLD BUIATRICS CONGRESS, 1996, Edinburgh. *Proceedings...* 1996. p.39-41.

SUPRATMAN, U.; FUJITA, T.; AKIYAMA, K.; HAYASHI, H.; MURAKAMI, A.; SAKAI, H.; KOSHIMIZU, K.; OHIGASHI, H. Anti-tumor promoting activity of bufadienolides from *Kalanchoe pinnata* and *K. daigremontiana* x *tubiflora*. *Biosci Biotechnol Biochem.*, v. 65, n.4, p.947-9, 2001.

TEIXEIRA, M.F.B.; ESTEVES, P.A.; SCHMIDT, C.S.; SPILKI, F.R.; SILVA, T.C.; DOTTA, M.A.; ROEHE, P.M. ELISA de bloqueio monoclonal para o diagnóstico sorológico de infecções pelo herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.21, n.1, p.33-37, 2001.

TIZARD, I. *Imunologia Veterinária: Uma Introdução*. 6ª ed. São Paulo: Roca, 2002. 382 p.

TOUSSAINT, J.F.; RZIHA, H.J.; BAUER, B.; LETELLIER, C.; KERKHOF, P. Effects of hypervaccination with bovine herpesvirus type 1 gE-deleted marker vaccines on the serological response and virological status of calves challenged with wild-type virus. *Veterinary Record*, v. 155, n. 18, p.553-558, 2004.

VAN ENGELBURG, F.A.; KAASHOEK, M.J.; VAN OIRSCHOT, J.T.; RIJSEWIJK, F.A. A glycoprotein E deletion mutant of bovine herpesvirus 1 infects the same limited number of tissues in calves as wild-type virus, but for a shorter period. *Journal of General Virology*, v.76, n.9, p. 2387-2392, 1995.

VAN OIRSCHOT, J.T. Comunicação pessoal a Teixeira *et al.*, 2001. In: TEIXEIRA, M.F.B.; ESTEVES, P.A.; SCHMIDT, C.S.; SPILKI, F.R.; SILVA, T.C.; DOTTA, M.A.; ROEHE, P.M. ELISA de bloqueio monoclonal para o diagnóstico sorológico de infecções pelo herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.21, n.1, p.33-37, 2001.

VAN OIRSCHOT, J.T.; STRAVER, P.J.; VAN LIESHOUT, J.A.H.; QUAK, J.; WESTENBRINK, F.; VAN EXSEL, A.C.A. A subclinical infection of bulls with bovine herpesvirus type 1 at an artificial insemination centre. *Veterinary Record*, v.132, p.32-35, 1993.

VAN SCHAIK, G.; SCHUKKEN, Y.H.; NIELEN, M.; DIJKHUIZEN, A.A.; BARKEMA, H.W.; BENEDICTUS, G.; VAN SCHAIK, G. Probability of and risk factors for introduction of infectious diseases into Dutch SPF dairy farms: a cohort study. *Preventive Veterinary Medicine*, v.54, n.3, p.279-289, 2002.

VERBERNE, L.R.M. BVD-aanpak: vaccinatie en eradicatie. [The approach to BDV: vaccination and eradication]. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde*, v.125, n.7, p.218-221, 2000.

VIDOR, T.; HALFEN, D.C.; LEITE, T.E.; COSWIG, L.T. Herpes Bovino Tipo 1 (BHV-1): I.Sorologia de rebanhos com problemas reprodutivos. *Ciência Rural*, v. 25, n. 3, p.421-424, 1995.

VONK NOORDEGRAAF, A.V.; LABROVIC, A.; FRANKENA, K.; PFEIFFER, D.U.; NIELEN, M.; Simulated hazards of loosing infection-free status in a Dutch BHV1 model. *Preventive Veterinary Medicine*, v.62, n.1, p.51-58, 2004.

VONK NOORDEGRAAF, A.V.; NIELEN, M.; FRANKEN, P.; DIJKHUIZEN, A.A. Simulation modelling of BHV1-control programme at national level, with special attention to sensitivity analysis. *Livestock Production Science*, v.76, n.1-2, p.153-170, 2002.

WHETSTONE, C.A.; EVERMANN, J.F. Characterization of bovine herpesvirus isolated from six shepp and four goats by restriction endonuclease analysis and radioimmunoprecipitation. *American Journal of Veterinary Research*, v.49, n.6, p.781-785, 1988.

WIGG, M.D.; COSTA, S.S.: *Curso de Mecanismo de Ação e Emprego de Antivirais*. VI Semana de Microbiologia e Imunologia do IMPPG/UFRJ. Rio de Janeiro: UFRJ,2000.

WILLIAMS, J.R.; EVERMANN, J.F.; BEED, R.F.; SCOTT, E.S.; DILBECK, P.M.; WHETSTONE, C.A.; STONE, D.M. Association of bovine herpesvirus type 1 in a llama with broncopneumonia. *Journal of Veterinary. Diagnostic Investigation*, v.3, n.3, p.258-260, 1991.

WINKLER, M.T.C.; DOSTER, A.; SUR, J.H.; JONES, C. Analysis of bovine trigeminal ganglia following infection with bovine herpesvirus 1. In: ESVV Veterinary Herpesvirus Symposium, 1<sup>st</sup>, 2001, University of Zurich, Switzerland. *Veterinary Microbiology*, v.86, n.1-2, p.139-155, 2002.

WINKLER, M.T.C.; DOSTER, A.; JONES, C. Bovine herpesvirus 1 can infect CD4+ T lymphocytes and induce programmed cell death during acute infection of cattle. *Journal of Virology*, v.73, p.8657–8668, 1999.

WYNN, S.G.; MARSDEN, S. *Manual of natural Veterinary Medicine*. St.Louis: Mosby Inc, 2003. 740 p.

YAZICII, Z.; BASKIN, Y.; BASKIN, H.; GECER, O.; BAHAR, I.H.; OZKUL, A. Study of programmed cell death in bovine herpesvirus 1 infected MDBK cells and the possible role of nitric oxide in this process. *Acta Veterinaria Hungarica*, v.52, n.3, p.287-297, 2004.

ZAKHARTCHOUK, A.N.; PYNE, C.; MUTWIRI, G.K.; PAPP, Z.; BACA-ESTRADA, M.E.; GRIEBEL, P.; BABIUK, L.A.; TIKOO, S.K. Mucosal immunization of calves with recombinant bovine adenovirus-3: induction of protective immunity to bovine herpesvirus-1. *Journal of General Virology*, v.80, n.5, p. 1263-1269, 1999.

ZARNKE, R.L. Serologic survey for selected microbial pathogens in Alaskan wildlife. *Journal of Wildlife Diseases*, v.19, n.4, p. 324-329, 1983.

ZHENG, C.; BABIUK, L.A.; VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S. Bovine herpesvirus 1 VP22 enhances the efficacy of a DNA vaccine in cattle. *Journal of Virology*, v.79, n.3, p. 1948-1953, 2005.

## ANEXOS

## **Anexo I: Titulação pelo Método de Reed & Muench (1938)**

Para calcular o número de partículas infecciosas de uma determinada suspensão viral ou a dose citotóxica de uma substância se aplica o método de diluição limite, onde a atividade de um vírus ou solução mata ou infecta uma percentagem determinada (considerada o ponto final) dos elementos inoculados. Esta diluição limite se denomina **Dose Infecciosa Mínima** ou **Dose Mínima Letal**.

Quando se toma como referência o 100%, resulta ser muito imprecisa a sua determinação exata, quando se trata de um valor limite. Por esta causa, é preferível tomar o valor 50% de atividade viral ou citotóxica como ponto final de referência, já que, neste caso, os valores flutuam em torno do ponto médio.

A dose mínima letal variará segundo o sistema hospedeiro e a ele deve ser feita referência o título obtido (em nosso caso, utilizam-se células da linhagem MDBK cultivadas em microplacas de 96 cavidades).

O material viral ou substância em suspensão é inoculado em diferentes diluições a certo número de hospedeiros susceptíveis (cultivos celulares) avaliando a resposta segundo:

- a) morte ou alteração morfológica do cultivo;
- b) degeneração do cultivo celular;
- c) multiplicação do vírus evidenciado por hemaglutinação.

O melhor método consiste em usar grandes números de unidades de prova em diluições muito próximas entre si e do valor que produz o 50% de reação. Este método se baseia na estimativa do número de respostas positivas sobre o total de respostas possíveis.

As diluições menores de vírus contêm mais doses infectantes de vírus que as maiores e entre elas haverá um gradiente de atividade, devendo-se determinar o 50% desta atividade, que se denominará **Dose Infectante 50%**.

O método de Reed & Muench (1938) é o mais comum para a interpolação do ponto final 50%. O valor estatístico deste método é dado pelo aumento do número de repetições que se obtêm no cômputo dos valores acumulativos das respostas positivas ou negativas. O ponto final 50% de uma suspensão viral é a diluição de vírus que produz o 50% de efeitos positivos.

## 1. Material empregado no teste:

### 1.1. Vírus ou substância

O isolamento ou cepa estandardizada, ou o composto preparado em solução, devidamente protocolado e classificado.

### 1.2. Meios de cultivo

De acordo com o substrato celular a empregar, com antibióticos e sem soro. Em nosso caso, utilizamos MEM Glasgow modificado adicionado de antibióticos e sem soro.

### 1.3. Cultivos celulares

Em monocamadas de cultivos celulares primários ou contínuos, com 24 a 72 horas de repique, com 80% de confluência.

### 1.4 Outros materiais

Pipetas graduadas decimais.

Tubos 13x100mm.

Estantes para tubos de ensaio

Agitador de tubos.

## 2. Método

2.1 Diluir o material viral em logaritmos decimais naturais, em tubos de hemólise: quantidade fixa de diluente em cada tubo (exemplo 1,8 mL), tomar 0,2 mL do vírus com pipeta e colocar no tubo pela parede, descartando a pipeta. Agitar e repetir as diluições seguintes, sempre trocando a pipeta. O material viral e as diluições devem ser mantidos em banhos de gelo.

2.2. Inocular 4 tubos por diluição pelo menos. O inóculo será de 0,1 mL, após prévia eliminação do meio de crescimento (os tubos controle com 0,1 mL de meio).

2.3. Incubar a 37 °C durante 30 minutos, para adsorção do vírus.

2.4. Adicionar 1,9 mL de meio de manutenção ou sem soro, começando pelo controles e diluições maiores.

## 3. Interpretação

A observação do efeito citopático se realiza as 24-48-72 e 96 horas. Os dados devem ser anotados para cálculo do TICD<sub>50</sub>.

Diluição	Inoculados	Resultado		Acumulada		% Positivos
		Positivos	Negativos	Positivos	Negativos	
10 <sup>-1</sup>	6	6	0	24	0	100
10 <sup>-2</sup>	6	6	0	18	0	100
10 <sup>-3</sup>	6	4	2	12	2	85,7
10 <sup>-4</sup>	6	4	2	8	4	66,6
10 <sup>-5</sup>	6	3	3	4	7	36,3
10 <sup>-6</sup>	6	1	5	1	12	76,9
10 <sup>-7</sup>	6	0	6	0	18	0

Para proceder à acumulada de positivos parte-se da maior diluição para a menor diluição:

$$\begin{aligned}
 7 &= 0, \\
 6 &= 0+1=1, \\
 5 &= 1+3=4, \\
 4 &= 0+1+3+4=8, \\
 3 &= 0+1+3+4+4=12 \\
 2 &= 0+1+3+4+4+6=18 \\
 1 &= 0+1+3+4+4+6+6=24
 \end{aligned}$$

Para proceder à acumulada de negativos parte-se da menor diluição para a maior diluição:

$$\begin{aligned}
 1 &= 0 \\
 2 &= 0+0 \\
 3 &= 0+0=2=2 \\
 4 &= 0+0+2+2=4 \\
 5 &= 0+0+2+2+3=7 \\
 6 &= 0+0+2+2+3+5=12 \\
 7 &= 0+0+2+2+3+5+6=18
 \end{aligned}$$

Em seguida aplicar a fórmula:

$$\begin{aligned}
 &IS - 50 \\
 DP = & \frac{\text{-----}}{IS - II} = \text{Mantissa do log IS}
 \end{aligned}$$

DP – Distância proporcional

IS – Percentagem imediatamente superior a 50%.

II – Percentagem imediatamente inferior a 50%.

$$DP = \frac{66,6 - 50,0}{66,6 - 36,3} = \frac{16,6}{30,3} = 0,54$$

O número obtido é somado ao logaritmo da diluição imediatamente superior a 50%:

$$10^{-4.54}.$$

Encontrado o logaritmo, procurar o antilogaritmo

$$4.54 = 36.474.$$

O número encontrado corresponde a diluição do vírus igual a 1 TICD<sub>50</sub>.

Em geral a diluição de trabalho corresponde a 100 TICD<sub>50</sub>.

Neste caso será  $2.54 = 364$  (1/364).

## **Anexo II: Isolamento do Herpesvírus Bovino tipo 1 a partir de espécimens clínicos (OIE, 2004 a)**

Colher suabes nasais de 5 a 10 reses afetadas na fase aguda da infecção, quando há uma descarga nasal serosa e ainda não mucopurulenta. Para os casos de vaginite ou balanopostite, colher suabes genitais. Lavados prepuciais com salina também podem ser usados para o isolamento viral.

Os suabes devem ser friccionados vigorosamente contra as superfícies mucosas. Suspende em meio de transporte viral, constituído por meio de cultivo celular com antibióticos e 2 a 10% de soro fetal completamente isento de anticorpos, para proteger o vírus da inativação. Remeter rapidamente ao laboratório resfriado a 4°C.

No laboratório, agitar os suabes no meio de transporte para eluir o vírus e deixar em temperatura ambiente por 30 minutos. Remover os suabes, clarificar o meio de transporte centrifugando a 1500 x g por 10 minutos.

Os tecidos devem ser homogeneizados a 10-20% em meio de cultivo celular e então centrifugados a 1500 x g por 10 minutos.

O sobrenadante destes espécimens deve ser filtrado por membranas de 0,45 µm e usados para isolamento.

Vários cultivos de células bovinas podem ser usados para o isolamento viral, por exemplo, cultivos primários ou secundários de rim, pulmão ou testículo bovino, ou linhagens de tecidos pulmonares fetais ou traquéia bovina, ou linhagens celulares estabelecidas como MDBK (Madin Darby bovine kidney) e BT (bovine turbinate).

Quando do uso de placas de 24 cavidades para o isolamento, inocular 100 a 200 µL dos sobrenadantes nos cultivos celulares e, após um período de adsorção de uma hora, adicionar o meio de manutenção.

Observar diariamente a produção de efeito citopatogênico, que ocorre em 2-4 dias após a inoculação, geralmente antes de 72 horas e tem aspecto característico. Se após sete dias não se observar o efeito citopatogênico, uma passagem cega deve ser realizada.

A identificação do vírus se faz por neutralização ou métodos de detecção do antígeno usando antissoro monoespecífico ou anticorpos monoclonais. Para tanto, se fazem diluições decimais seriadas do sobrenadante teste e adiciona-se a cada diluição

antissoro monoespecífico ou soro controle negativo. Incuba-se a 37°C por uma hora, inocula-se as misturas em cultivos celulares e, após 3 a 5 dias, calcula-se o índice de neutralização viral (título viral na presença de soro controle negativo subtraído do título viral na presença de antissoro específico). Se o índice de neutralização for maior que 1,5, o isolado pode ser considerado BHV-1. Para abreviar o procedimento pode-se fazer o isolamento em duplicata, pré-incubando uma das amostras com antissoro monoespecífico e outra com soro negativo controle.

Os isolados de BHV-1 podem ser subtipados por análise com enzimas de restrição de DNA.