

Frequência de anticorpos contra o herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) em bovinos de corte não vacinados

Frequency of antibodies against bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1) in beef cattle not vaccinated

Ermilton Junio Pereira de Freitas¹; Carlos Eduardo Rabêlo Lopes²; José Manoel de Moura Filho³; Janaira Silva Sá⁴; Hamilton Pereira Santos⁵; Helder de Moraes Pereira^{5*}

Resumo

O herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1), é responsável por manifestações clínicas como a rinotraqueíte infecciosa bovina, abortamentos, conjuntivite, balanopostite e vulvovaginite pustular infecciosa. Esse vírus tem sido responsável por grandes prejuízos produtivos e reprodutivos em diversos rebanhos do país. Deste modo, o objetivo desse trabalho foi estimar a frequência de anticorpos contra o BoHV-1 em fêmeas bovinas de corte não vacinadas, identificar a faixa etária mais acometida, bem como, realizar um estudo dos fatores de risco associados à infecção do vírus e avaliar a técnica ELISA indireto utilizando a soroneutralização (SN) como padrão de referência. O estudo foi realizado em 48 rebanhos de corte, distribuídos em 12 municípios da Microrregião de Imperatriz, Maranhão. As amostras foram coletadas de fêmeas bovinas estratificadas em três faixas etárias, ≤ 12 meses, entre 12 e 36 meses e ≥ 36 meses de idade. Os testes empregados foram: ELISA indireto e SN. Em cada rebanho, foi aplicado um questionário epidemiológico, com o objetivo de obter informações sobre manejo sanitário e reprodutivo, para o estudo de fatores de risco. A frequência de anticorpos contra o BoHV-1 na Microrregião de Imperatriz foi de 63,23% (n=698), os municípios de Açailândia e Buritirana, apresentaram maiores frequências, ambos com 80,44% (n=74). a faixa etária mais acometida, foram a dos animais com idade ≥ 36 meses com frequência de 79,65% (n=497) de animais reagentes, seguidos pelas faixas > 12 meses e < 36 meses com 42,92% (n=103) e ≤ 12 com 40,83% (n=98). Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que a frequência de anticorpos contra o BoHV-1 é alta; entre as faixas etárias mais acometidas foram a dos animais com idade ≥ 36 meses; foram considerados fatores de risco para a transmissão do vírus, retorno ao cio (OR=1,874), reposição de animais oriundos de outros estados/região (OR=1,365) e a criação de caprinos/ovinos associados com bovinos (OR=1,348); a técnica ELISA indireta apresentou concordância moderada quando comparada a técnica de SN, que é a técnica padrão ouro de diagnóstico para BoHV-1.

Palavras-chave: ELISA indireto, soroneutralização, IBR, bovino de corte

¹ Discente de Doutorado do programa em Ciência Animal, Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, MG. E-mail: ermilton_medvet@yahoo.com.br

² Médico Veterinário, Universidade Estadual do Maranhão, UEMA, São Luís, MA. E-mail: k_du9@hotmail.com

³ Prof. do Instituto Federal do Maranhão, IFMA, Caxias, MA. E-mail: manoelmoura@hotmail.com

⁴ M.e em Ciência Animal, UEMA, São Luís, MA. E-mail: janaira_medvet@yahoo.com.br

⁵ Profs. Adjuntos IV do curso de Medicina Veterinária, UEMA, São Luís, MA. E-mail: hpsluiza@yahoo.com.br; helderpereirap@yahoo.com.br

* Autor para correspondência

Abstract

Bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1), is responsible for clinical manifestations such as infectious bovine rhinotracheitis, abortion, conjunctivitis, infectious pustular vulvovaginitis and balanoposthitis. This virus has been responsible for major losses in different productive and reproductive herds in the country. Thus, the objective of this study was to estimate the frequency of antibodies against BoHV-1 in beef heifers not vaccinated in Microregion of Imperatriz, Maranhao, and identify the age group most affected by the virus, as well as a study of factors associated with virus infection and to evaluate the indirect ELISA using the serum neutralization (SN) as a reference standard. The study was conducted in 48 herds, cutting, distributed in 12 counties of Microregion of Imperatriz. The samples were collected from female cattle stratified into three age groups, ≤ 12 months, between 12 and 36 months and ≥ 36 months of age. The samples were subjected to two serological tests, ELISA and SN. In each herd, an epidemiological questionnaire was applied in order to obtain information on management and reproductive sanitary, for the study of risk factors. The frequency of antibodies against BoHV-1 in Microregion of Imperatriz was 63.23%, and the municipalities of Açailândia Buritirana showed the highest frequencies, both with 80.44%, the most affected age group, the Microregion, was animals aged ≥ 36 months (69.65%). Based on the results we can conclude that the frequency of antibodies against BoHV-1 is high, between the age groups most affected were the animals aged ≥ 36 months were considered risk factors for virus transmission, return to estrus (OR=1.874), recovery of animals from other states / region (OR=1.365) and the creation of goat / sheep associated with bovine (OR=1.348), the indirect ELISA technique showed moderate concordance when compared to SN technique, which is the gold standard technique for diagnosis of BoHV-1.

Key words: Indirect ELISA, neutralization, IBR, beef bovine

Introdução

Os bovinos são susceptíveis a várias enfermidades, e apesar da Microrregião de Imperatriz constituir uma pecuária desenvolvida e tecnificada, problemas sanitários ainda ocorrem, ocasionados principalmente por falhas na informação e falta de conhecimento sobre alguns agentes infecciosos, como por exemplo, o herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1), que é o vírus responsável por ocasionar a Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR), bem como a Vulvovaginite Pustular Infecciosa (IPV).

Este vírus pertence à família *Herpesviridae*, subfamília *Alfaherpesvirinae* (PORTERFIELD, 1989; ROIZMAN et al., 1992; FAUQUET et al., 2005) e gênero *Varicellovirus* (FAUQUET et al., 2005). A espécie Bovina é a principal fonte de infecção do BoHV-1, sendo portanto as principais vias de eliminação, a secreção respiratória, ocular, genital (muco prepucial e muco vaginal), e sêmen de animais infectados (LEMAIRE; PASTORET; THIRY, 1994; ENGELS; ACKERMANN, 1996; CALDERON et al., 2003). O diagnóstico laboratorial da infecção pelo BoHV-1 pode ser

etiológico ou sorológico. As técnicas sorológicas mais utilizadas na detecção de anticorpos específicos incluem a Soroneutralização (SN) e Ensaios Imunoenzimáticos (EIE) (TAKIUCHI; ALFIERI; ALFIERI, 2001).

Diversos estudos têm sido realizados em todo Brasil, demonstrando a ampla distribuição desse vírus. No estado do Goiás a soroprevalência para o BoHV-1, realizada através da técnica de SN foi de 51,9% (BARBOSA; BRITO; ALFAIA, 2005) e 84,5% (AFFONSO et al., 2010), no Paraná Dias et al. (2008) pesquisaram através do teste ELISA indireto, e encontraram uma prevalência de 64,41% de animais reagentes; Bezerra et al. (2012) avaliando rebanhos bovinos leiteiros da região Amazônica maranhense obtiveram com frequência de 69,25% de amostras reagentes.

Considerando a importância que a enfermidade possui dentro dos rebanhos bovinos, principalmente aqueles voltados à exploração de corte, juntamente aos poucos dados epidemiológicos da ocorrência de BoHV-1 nos rebanhos do Maranhão, em especial a Microrregião de Imperatriz, aliado a

prática deficiente e/ou inexistente de sanidade nas propriedades e a ausência de programas de assistência técnica especializada, este trabalho tem por objetivo, estimar a frequência de anticorpos contra o BoHV-1 em fêmeas bovinas de corte não vacinadas na Microrregião de Imperatriz, Maranhão; bem como identificar a faixa etária mais acometida e fatores de riscos associados a infecção; além de avaliar a técnica ELISA indireto para a detecção de anticorpos, utilizando a técnica de soroneutralização como padrão de referência.

Material e Métodos

Esta pesquisa foi desenvolvida na Microrregião de Imperatriz, localizada a noroeste do Estado do Maranhão, composta pelos municípios de Açailândia, Amarante, Buritirana, Davinópolis, Cidelândia, Governador Edison Lobão, Imperatriz, Itinga do Maranhão, João Lisboa, Lageado Novo, Montes Altos, Ribamar Fiquene, São Francisco do Brejão, São Pedro da Água Branca, Senador La Rocque e Vila Nova dos Martírios.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética e Experimentação Animal – CEEA do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA, conforme protocolo nº 010/2010, para a execução da pesquisa.

A escolha dos rebanhos foi realizada de forma aleatória, através de sorteio, e estes apresentaram pré-requisitos como, número igual ou superior a 200 fêmeas bovinas por rebanho e sem histórico de vacinação anterior para IBR. Deste modo, somente 12 (doze) municípios atenderam as exigências. Para determinar o tamanho da amostra coletada utilizou-se a seguinte expressão proposta por Triola (1999) e modificada por Callegari e Jacques (2003).

A partir do cálculo, obteve-se 1102 amostras, com ajuste estatístico para 1104, a fim de que, a distribuição do número de amostras fossem homogêneas, entre os 12 municípios selecionados. Deste modo, foram trabalhados quatro rebanhos

por município, sendo selecionadas aleatoriamente 23 fêmeas bovinas estratificadas por faixa etária. O percentual de animais dentro de cada faixa etária foi definido de acordo com dados obtidos por Melo et al. (2002); Vieira et al. (2003) e Barbosa, Brito e Alfaia (2005). Com base nesta característica, definiu-se 20% (n=240) para animais com idade \leq 12 meses, 20% (n=240) para animais entre 12 e 36 meses e 60% (n=624) para animais com idade igual ou acima de 36 meses.

Para a realização das coletas das amostras de sangue de fêmeas bovinas de corte, os animais foram contidos fisicamente com o auxílio de troncos de contenção ou troncos de vacinação; em seguida utilizou-se álcool a 70%, a fim de promover a desinfecção da área a ser puncionada. Posteriormente, as amostras de sangue foram coletadas através da venopunção jugular ou coccígea média, com auxílio de agulhas estéreis, adaptadores e tubos a vácuo de 10 ml. Após a coleta, as amostras foram mantidas à temperatura ambiente em posição inclinada, até a completa retração do coágulo. Estas foram acondicionadas em caixas isotérmicas, contendo gelo reciclável e encaminhadas ao Laboratório de Diagnóstico de Doenças Infecciosas do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA. O sangue foi centrifugado a 2000 rotações por minuto (rpm), durante 5 minutos. Em seguida as alíquotas de soro foram transferidas para tubos do tipo Eppendorf® em duplicatas e estocadas a -20° C, até a realização dos testes sorológicos.

O processamento das amostras para o teste ELISA indireto, foi realizado no laboratório de doenças infecciosas e leitura no laboratório de imunodiagnóstico, do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Maranhão; o processamento e leitura das amostras para o teste de soroneutralização (SN) foi realizado no laboratório de virologia do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais. A identificação de bovinos portadores de

anticorpos anti-BoHV-1 foi realizada mediante a técnica de ELISA-indireta, utilizando Kit comercial (Bovine Rhinotracheitis virus antibody test kit, HerdChek[®], IDEXX Laboratories, EUA), seguindo as orientações do fabricante, utilizando o comprimento de onda de 450nm.

Foi comparada o sistema do ELISA indireto para detecção de anticorpos contra o BoHV-1 utilizando a microtécnica de soroneutralização (SN) descrita por Britsch (1978), como técnica de referência. Os soros foram inativados a 56°C por 30 minutos em banho maria, examinados em duplicatas pelo teste de SN, em microplacas de 96 cavidades, foram diluídos a 1:2 em meio essencial mínimo (MEM) e homogeneizados até diluição final de 1:256.

A amostra viral utilizada foi a cepa de referência IBR colorado 1 (ATCC, VR-864) com títulos de $10^{3,64}$ em 50µl. O vírus foi adicionado ao soro e incubado durante uma hora em estufa com tensão de CO₂ controlada a 5%, em temperatura de 37°C. Após esse período foram utilizadas 50µl de suspensão de células de rim de bovino (MDBK), contendo 3×10^5 células/ml, em seguida incubadas durante 72 horas em estufas com tensão de CO₂ controlada a 5%, em temperatura de 37°C. Foram consideradas positivas as amostras que neutralizaram 50% das cavidades calculadas de acordo com o método de Reed e Muench (1938) a leitura foi realizada em microscópio de campo invertido. Foram consideradas amostras de soro reagentes para presença de anticorpos aquelas que neutralizaram o vírus a partir da diluição 1:4.

Foi aplicado um questionário epidemiológico a fim de determinar fatores de risco associados à infecção para o vírus como: ocorrência de conjuntivite, abortamento, retorno ao cio, nascimento de bezerro fraco, destino dado ao feto abortado, presença do médico veterinário, o tipo de manejo reprodutivo adotado na propriedade, uso do piquete maternidade para vacas prenhes, reposição de animais e criação

associada de caprinos e/ou ovinos com bovinos. A concordância entre as duas técnicas foi realizada através do índice *Kappa* (GART; BUCK, 1966), o qual determinou sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, negativo e concordância entre os testes.

A presente pesquisa trabalhou com uma variável quantitativa, cujas amostras foram calculadas com base na fórmula descrita por Triola (1999); Callegari e Jacques (2003). Essas amostras foram classificadas como aleatória por conglomerado e que ao final foi obtida a frequência do vírus segundo os rebanhos, estratos, municípios e na Microrregião como um todo. Os dados obtidos foram analisados através dos programas MINITAB[®] 16/2010, onde foram submetidos ao teste de Qui-quadrado com um intervalo de confiança de 95% para comparação das frequências em cada município e, por conseguinte na Microrregião; GraphPad InStat versão 3.05/2000 para medir a associação entre variáveis, foi aplicado o teste Exato de Fisher. Para a estimativa do risco, foi utilizado o Odds Ratio (OR), o nível de significância foi fixado em 5% ($p < 0,05$) e OpenEpi, versão 2.3.1/2011 para determinações do índice *kappa*, de sensibilidade, especificidade, valores preditivo positivo e negativo e da concordância do ELISA indireto.

Resultados e Discussão

Das 1104 amostras de soro sanguíneo avaliados, 63,23 % (n=698) foram reagentes, 2,26 % (n=25) suspeitas e 34,51 % (n=381) não reagentes contra o BoHV-1. Entre os municípios que compõem a Microrregião de Imperatriz, os Municípios de Açailândia e Buritirana obtiveram as maiores frequências, com 80,44% (n=74), seguidos de Imperatriz, Ribamar Fiquene, Cidelândia e Governador Edison Lobão com 75% (n=69), 69,56% (n=64), 64,13% (n=59) e 64,13% (n=59), respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1. Distribuição das frequências de anticorpos contra o herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) em bovinos de corte não vacinados nos Municípios que compõem a Microrregião de Imperatriz, Maranhão, 2012.

Municípios	Reagente		Suspeito		Não reagente	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Cidelândia	59 ^{aA}	64,13	3	3,26	30	32,61
Açailândia	74 ^{bB}	80,44	2	2,17	16	17,39
Buritirana	74 ^{bcC}	80,44	2	2,17	16	17,39
Amarante	54 ^{adD}	58,70	0	0,00	38	41,30
Lageado novo	45 ^{deE}	48,91	0	0,00	47	51,09
João Lisboa	46 ^{defF}	50,00	7	7,61	39	42,39
Imperatriz	69 ^{cgG}	75,00	1	1,09	22	23,91
Senador la roque	48 ^{defhH}	52,17	0	0,00	44	47,83
Ribamar Fiquene	64 ^{cdgil}	69,56	1	1,09	27	29,35
Gov. Edison Lobão	59 ^{dfgijJ}	64,13	4	4,35	29	31,52
Itinga	58 ^{dfghijL}	63,04	3	3,26	31	33,70
Montes Altos	48 ^{defhijlmM}	52,17	2	2,18	42	45,65
Total	698	63,23	25	2,26	381	34,51

Letras minúsculas distintas na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significativa entre cada município e letras maiúsculas distintas na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significativa entre todos os Municípios (Qui-quadrado; $P < 0,05$). IC = 95%.

Fonte: Elaboração dos autores.

Estes resultados assemelham-se aos descritos por Bezerra et al. (2012) em rebanhos bovinos leiteiros da região Amazônica maranhense com frequência de 69,25% de amostras reagentes. Já Dias et al. (2008) relataram uma frequência de 64,41%, utilizando a técnica ELISA indireto, em fêmeas com idade ≥ 24 meses de idade, no Estado do Paraná e Barbosa, Brito e Alfaia (2005), no Estado do Goiás, que através da técnica de SN observaram uma frequência de 51,9% e Rocha et al. (2001), em trabalho desenvolvido no Estado de Minas Gerais utilizando as técnicas ELISA e SN encontraram uma frequência de 58,2% de amostras reagentes. Diferindo, porém de Lovato et al. (1995), que encontraram uma frequência de 18,8%, através da SN, Médici, Alfieri e Alfieri (2000a), que obtiveram uma frequência de 43,7% em rebanhos com problemas reprodutivos; Eiras et al. (2009), na Galícia, região noroeste da Espanha, utilizando a técnica ELISA indireto, que encontraram uma frequência de 26,6% de amostras reagentes.

Vieira et al. (2003), no Estado do Goiás através da técnica ELISA, encontraram uma frequência de 83% de amostras reagentes, Affonso et al. (2010),

no Estado do Goiás, avaliaram amostras de animais na linha de abate de frigoríficos localizados na região metropolitana de Goiânia e encontraram uma frequência de 84,5% de amostras reagentes, demonstrando resultados superiores aos encontrados nessa pesquisa.

As diferenças entre os resultados podem ser justificadas pelas diferenças entre o tipo de criação, manejo de animais, grupo ou faixa etária dos animais utilizados na pesquisa, além de fatores geográficos, população amostrada, tipo de exploração utilizada na propriedade que podem influenciar na diferença encontrada.

A frequência de animais reagentes contra o BoHV-1 é alto, o que demonstra que o vírus está presente em toda Microrregião de Imperatriz. Apesar de essa região apresentar uma pecuária tecnificada, foi possível notar um desconhecimento dos proprietários com relação a esse vírus, responsável por ocasionar tantos prejuízos na criação de bovinos, os pecuaristas têm informações em sua maioria apenas sobre enfermidades que estão inseridas nos programas oficiais de controle do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA),

como febre aftosa, brucelose, tuberculose e raiva, além de algumas clostridioses.

Todos os 12 Municípios que compuseram a área de estudo apresentaram amostras de soro sanguíneo reagentes contra o BoHV-1, com frequências variando de 48,91% (n=45) à 80,44% (n=74), discordando dos resultados obtidos por Lovato et al. (1995) no Rio Grande do Sul, que encontraram 91,9%; Rocha et al. (2001) em Minas Gerais, 93,4% e Vieira et al. (2003) em Goiás, 97,5% dos Municípios estudados, o que demonstrou uma ampla distribuição do vírus nos rebanhos estudados.

Entre todos os Municípios avaliados obteve-se diferença significativa ($p < 0,05$). Os Municípios de Açailândia e Buritirana obtiveram maiores frequências e diferiram dos Municípios de

Cidelândia, Amarante, Lageado Novo, João Lisboa, Senador La Rocque, Governador Edison Lobão, Itinga do Maranhão e Montes Altos ($p < 0,05$), o mesmo não foi observado entre os Municípios de Imperatriz e Ribamar Fiquene ($p > 0,05$) (Tabela 1).

Avaliando a variável faixa etária, verificou-se que a mais acometida foi de animais com idade ≥ 36 meses com frequência de 79,65% (n=497) de animais reagentes, seguidos da faixa > 12 meses e < 36 meses com 42,92% (n=103) e ≤ 12 com 40,83% (n=98). Entre todas as faixas etárias avaliadas apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa entre as faixas ≤ 12 meses e > 12 meses e < 36 meses ($p > 0,05$), já as mesmas apresentaram diferença estatisticamente com a faixa ≥ 36 meses ($p < 0,05$) (Tabela 2).

Tabela 2. Distribuição por faixa etária das frequências de anticorpos contra o herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) em bovinos de corte não vacinados da Microrregião de Imperatriz, Maranhão, 2012.

Faixa etária	Reagente		Suspeito		Não reagente	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
≤ 12 meses	98 ^{aA}	40,83	9	3,75	133	55,42
> 12 e < 36 meses	103 ^{aB}	42,92	5	2,08	132	55,00
≥ 36 meses	497 ^{bC}	79,65	11	1,76	116	18,59
Total	698	63,23	25	2,26	381	34,51

Letras minúsculas distintas na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significativa entre cada faixa etária e letras maiúsculas distintas na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significativa entre todas as faixas etárias (Qui-quadrado; $P < 0,05$), entre as propriedades. IC = 95%.

Fonte: Elaboração dos autores.

Os resultados corroboram com os achados de Lovato et al. (1995), Melo et al. (2002), Vieira et al. (2003), Barbosa, Brito e Alfaia (2005), Dias et al. (2008) e Eiras et al. (2009), que em seus estudos observaram uma maior frequência de animais reagentes para o BoHV-1 em animais mais velhos. De acordo com Barbosa, Brito e Alfaia (2005), os animais mais velhos têm mais oportunidades de exposição ao agente, principalmente quando estes entram na fase reprodutiva.

Todos os rebanhos apresentaram animais reagentes, a frequência variou de 21,74% (n=5) até 95,65% (n=22). Houve diferença estatisticamente significativa entre todos os rebanhos ($p < 0,05$). Esses resultados discordam dos encontrados por

Lovato et al. (1995), que encontrou pelo menos um animal reagente em 54,4% dos rebanhos, Vieira et al. (2003) que encontrou em 97,5% e Barbosa, Brito e Alfaia (2005) que encontrou em 98,5%.

Foram avaliadas dez variáveis do questionário epidemiológico para verificar os prováveis fatores de risco associados à infecção pelo BoHV-1, nessa avaliação 2,26% (n=25) das amostras foram desconsideradas, que foram as amostras suspeitas no teste ELISA indireto. Dentre as variáveis as que foram consideradas fatores de risco foi retorno ao cio, reposição de animais de outros estados/região e criação de caprinos/ovinos associados à criação de bovinos. As variáveis, nascimento de bezerros fracos, aborto deixado na pastagem, ausência de piquetes

maternidades, apesar de não apresentaram grande risco, obtiveram o valor de “p” significativo ($p < 0,05$), o que nos permite afirmar que as variáveis tiveram associação com a transmissão do BoHV-1 (Tabela 3).

Em estudos realizados por Dias et al. (2008), foram considerados fatores de risco número maior ou igual a 23 fêmeas com idade ≥ 24 meses, compra de reprodutores, pasto comum com outras propriedades, histórico de aborto e presença de animais silvestres de vida livre. Barbosa, Brito e Alfaia (2005) avaliaram variáveis como tipo de exploração, tipo de criação, tipo de ordenha, uso de inseminação artificial, raça, presença de outros animais domésticos ou silvestres, assistência veterinária, piquete maternidade, entre outros, mas nenhuma das variáveis foram consideradas fatores de risco para transmissão do vírus.

A infecção causada pelo BoHV-1 pode ocasionar conjuntivite e aborto (GIBBS; RWEYEMANN,

1977), além de mortalidade embrionária precoce e/ou tardia, com repetições deaios a intervalos regulares e/ou irregulares (STRAUB, 1991) e nascimento de bezerros fracos (WYLER; ENGELS; SCHWYZR, 1989), sinais clínicos observados em outras enfermidades como diarreia viral bovina, neosporose, brucelose, entre outras doenças que necessitam de diagnóstico diferencial.

A ausência de piquetes maternidade é um importante fator de risco para transmissão do vírus, uma vez que esses animais apresentam nessa fase uma baixa na defesa imunológica, o animal portador latente pode reativar o vírus, se for exposto a fatores predisponentes estressantes, que diminuem a resistência imunológica, e com isso períodos de reexcreção viral (COLODEL et al., 2002), a manutenção desses animais em locais separados minimiza a transmissão para outros bovinos do rebanho.

Tabela 3. Análise univariada da associação dos fatores de risco com a infecção do herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) em bovinos de corte não vacinados da Microrregião de Imperatriz, Maranhão, 2012.

Variáveis		Reagentes		Não reagentes		Total	Or	Ic 95%	Valor de p	
		Nº	%	Nº	%					
Conjuntivite	Sim	207	62,16	126	37,84	333	30,86	0,8532	0,6525-1,116	0,2699
	Não	491	65,82	255	34,18	746	69,14			
Abortamentos	Sim	606	64,13	336	35,67	942	87,71	0,8822	0,6028-1,291	0,5664
	Não	92	67,15	45	32,85	137	12,69			
Retorno ao cio	Sim	485	69,88	209	30,12	694	64,32	1,874	1,447-2,426	0,0001*
	Não	213	55,32	172	44,68	385	35,68			
Bezerros fracos	Sim	404	62,15	246	37,85	650	60,24	0,7541	0,5825-0,9763	0,0372*
	Não	294	68,53	135	31,47	429	39,76			
	Pastagem	456	61,62	284	38,38	740	78,56	0,5566	0,3928-0,7887	0,0009*
Destino do aborto	Queima/ Enterra	150	74,26	52	25,74	202	21,44			
	Não	345	64,13	193	35,83	538	49,86	0,952	0,7416-1,222	0,7029
Assistência veterinária	Sim	353	65,25	188	34,75	541	50,14			
	Mn	462	63,90	261	36,10	723	67,01	0,9001	0,6891-1,176	0,4567
Manejo reprodutivo	Mn+Ia	236	66,29	120	33,71	356	32,99			
	Não	55	49,11	57	50,89	112	10,38	0,4862	0,3279-0,7209	0,0004*
Piquetes maternidades	Sim	643	66,49	324	33,51	967	89,62			
	Outros estados/ região	266	69,09	119	30,91	385	35,68	1,356	1,040-1,767	0,0282*
Reposição de animais	Região	432	62,25	262	37,75	694	64,32			
	Sim	398	67,80	189	32,20	587	54,40	1,348	1,049-1,732	0,0213*
Criação de caprinos/ ovinos	Não	300	60,98	192	39,02	492	45,60			

OR – Odds Ratio; IC – intervalo de confiança; MN – Monta natural; IA – Inseminação artificial; (*) Associação significativa em nível de 5%; Teste Exato de Fisher.

Fonte: Elaboração dos autores.

Dias et al. (2008), afirmaram que aquisição de animais sem controle sanitário, é um importante fator na introdução da doença em propriedades livres. Bovinos em contato com outras espécies animais, mesmo que não exerçam papel importante na disseminação do vírus, podem atuar como transmissores mecânicos quando se deslocam de um local a outro dentro e entre propriedades (VAN SCHAİK et al., 2001), nos rebanhos que apresentavam criação associada com caprinos e/ou ovinos, foi possível notar que as instalações como cercas de divisão de piquetes principalmente, eram apropriadas apenas para criação de bovinos, o que facilita o trânsito desses animais, em toda a propriedade bem como acesso a propriedades vizinhas.

Para comparação entre as técnicas, ELISA indireto e SN foram desconsideradas amostras suspeitas no teste ELISA e que apresentaram efeito citotóxico no teste de SN. Das 1073 amostras de soro avaliadas 43,90% (n=471) foram reagentes nos dois testes. O índice *Kappa* encontrado, com um intervalo de confiança de 95%, entre as duas técnicas foi de 0,57, o que indica um grau moderado de concordância entre as duas técnicas (LANDIS; KOCH, 1977). Utilizando a SN como referência o ELISA indireto apresentou sensibilidade de 97,31% e especificidade de 61,63%. O valor preditivo positivo foi de 67,63% e o valor preditivo negativo foi de 96,54% e concordância de 77,73% (Tabela 4).

Esses resultados discordam dos realizados por Médici, Alfieri e Alfieri (2000b), que encontraram sensibilidade de 100%, especificidade de 94,88%, índice *Kappa* de 0,94 e concordância de 97,05%, porém apesar de terem usado kit comercial proveniente da mesma empresa do kit utilizado nessa pesquisa foram utilizados comprimentos de onda no leitor de ELISA entre 620 e 650nm. Teixeira et al. (2001), desenvolveram e padronizaram um ELISA de bloqueio monoclonal e compararam os resultados aos encontrados no teste de SN, a sensibilidade do teste desenvolvido foi de 92,37%, especificidade de 92,56%, valor preditivo negativo de 93,83%, valor

preditivo positivo 90,83%, concordância de 92,48% e índice *Kappa* de 0,85. Ferreira et al. (2005), avaliaram a técnica ELISA indireta com a técnica de SN, a sensibilidade foi de 98,3%, especificidade de 95,2%, valor preditivo positivo de 95,2%, valor preditivo negativo de 98,3%, concordância de 97,7% e índice *Kappa* de 0,93. Oliveira et al. (2011), compararam a técnica ELISA indireto e SN, de sangue total e soro sanguíneo coletados em papel filtro, no soro sanguíneo o ELISA apresentou sensibilidade de 95%, especificidade 94%, valor preditivo positivo 80%, valor preditivo negativo 99% e índice *Kappa* 0,83; no sangue ele apresentou sensibilidade de 91%, especificidade 97%, valor preditivo positivo 87%, valor preditivo negativo 98% e índice *Kappa* 0,86.

Cortez et al. (2001), avaliaram o desempenho de um kit comercial para ELISA, comparada a técnica de SN como padrão de referência, analisando soros sanguíneos de búfalos, encontrou uma sensibilidade próximo aos nossos resultados com 97,7%, especificidade e índice *Kappa* inferior ao encontrado em nosso trabalho com 46,06% e 0,44, respectivamente; Vieira et al. (2003), encontrou o índice *Kappa* de 0,68.

As diferenças encontradas neste trabalho podem ser justificadas pelo fato das técnicas ELISA, serem em sua maioria desenvolvida e padronizada pelos mesmos autores, os kits comerciais utilizados por outros pesquisadores, foram realizados há alguns anos, e embora alguns trabalhos tenham utilizados kits comerciais provenientes da mesma empresa, na qual foi obtido o kit para realização deste trabalho, foi possível verificar diferenças dentro da metodologia, como por exemplo, no emprego do comprimento de onda utilizado na configuração do leitor de ELISA.

Ferreira et al. (2005), afirmaram que apesar da técnica de SN, constituir a técnica padrão ouro de diagnóstico do BoHV-1, é uma técnica laboriosa, demorada e requer a manutenção de linhagens celulares para sua realização; de acordo com eles

a técnica ELISA indireto tem como principal vantagem a rapidez na conclusão dos resultados e a possibilidade de automação que padroniza os resultados finais. Apesar dos dois testes nesse trabalho terem apresentado concordância moderada, é um teste que ainda deve ser recomendado, pois apresentou características essenciais a um teste de triagem, como por exemplo, valores altos para sensibilidade e valor preditivo negativo.

Conclusões

Com base nos resultados obtidos nesta pesquisa, pode-se concluir que a frequência de anticorpos contra o BoHV-1 é alta e que a faixa etária mais acometida foi a de animais com idade ≥ 36 meses. Foram considerados fatores de risco para a transmissão do vírus, retorno ao cio, reposição de animais oriundos de outros estados/região e a criação de caprinos/ovinos associados com bovinos. A técnica ELISA indireta apresentou concordância moderada quando comparada a técnica de SN, que é a técnica padrão ouro de diagnóstico para BoHV-1, podendo ser recomendada, pois apresenta características essenciais a um teste de triagem.

Referências

AFFONSO, I. B.; AMORIL, J. G.; ALEXANDRINO, B.; BUZINARO, M. G.; MEDEIROS, A. S. R.; SAMARA, S. I. Anticorpos contra o herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) nas dez regiões de planejamento do Estado de Goiás, Brasil. *Ciência Animal Brasileira*, Goiânia, v. 11, n. 4, p. 892-898, out./dez. 2010.

BARBOSA, A. C. V. C.; BRITO, W. M. E. D.; ALFAIA, B. T. Soroprevalência e fatores de risco para a infecção pelo herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) no estado de Goiás, Brasil. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 35, n. 6, p. 1368-1373, 2005.

BEZERRA, D. C.; CHAVES, N. P.; SOUSA, V. E.; SANTOS, H. P.; PEREIRA, H. M. fatores de risco associados à infecção pelo herpesvírus bovino tipo 1 em rebanhos bovinos leiteiros da região amazônica maranhense. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v. 79, n. 1, p. 107-111, jan./mar. 2012.

BRITSCH, V. The modification of the infectious bovine rhinotracheitis virus serum neutralization test. *Acta Veterinaria Scandinavica*, Kobenhavn, v. 19, n. 4, p. 497-505, 1978.

CALDERON, S. J. J.; CORREA, S. V. M.; CORREA, S. J. C.; ISLAS, A. A. Seroprevalence of and risk factors for infectious bovine rhinotracheitis in beef cattle herds of Yucatan, Mexico. *Preventive Veterinary Medicine*, Colorado, v. 57, n. 4, p. 199-208, 2003.

CALLEGARI-JACQUES, S. M. Testes não-paramétricos. In: CALLEGARI-JACQUES, S. M. *Bioestatística: princípios e aplicações*. Porto Alegre: Artmed, 2003. cap. 18, p. 165-184.

COLODEL, E. M.; NAKAZATO, L.; WEIBLEN, R.; MELLO, R. M.; SILVA, R. R. P.; SOUZA, M. A.; FILHO, J. A. O.; CARON, L. Meningoencefalite necrosante em bovinos causada por herpesvírus bovino no Estado de Mato Grosso, Brasil. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 32, n. 2, p. 293-298, 2002.

CORTEZ, A.; HEINEMANN, M. B.; ALFIERI, A. A.; MÉDICI, K. C.; ALFIERI, A. F.; OLIVEIRA, D. B.; MEYER, A. D.; SOARES, R. M.; SAKAMOTO, S. M.; AMARAL, R.; BARUSELLI, P. S.; FUJII, T.; RICHTZENHAIN, L. J. Comparação das técnicas de ELISA indireto e de soroneutralização na detecção de anticorpos contra o BHV-1 em amostras de soro bubalino (*Bubalus bubalis*). *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, São Paulo, v. 38, n. 3, p. 146-148, 2001.

DIAS, J. A.; ALFIERI, A. A.; MÉDICI, K. C.; FREITAS, J. C.; FERREIRA NETO, J. S.; MULLER, E. E. Fatores de risco associados à infecção pelo herpesvírus bovino 1 em rebanhos bovinos da região Oeste do Estado do Paraná. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 28, n. 3, p. 161-168, 2008.

EIRAS, C.; DIÉGUEZ, F. J.; SANJUÁN, M. L.; YUS, E.; ARNAIZ, I. Prevalence of serum antibodies to bovine herpesvirus-1 in cattle in Galicia (NW Spain). *Spanish Journal of Agricultural Research*, v. 7, n. 4, p. 800-806, 2009.

ENGELS, M.; ACKERMANN, M. Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. *Veterinary Microbiology*, v. 53, n. 1-2, p. 3-15, 1996.

FAUQUET, C. M.; MAYO, M. A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L. A. (Ed.). *Virus taxonomy, viiiith report of the international committee on taxonomy of viruses*. London: Elsevier/Academic Press, 2005. p. 757-778.

- FERREIRA, M. C.; MÉDICI, K. C.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Desenvolvimento e avaliação de um ensaio imunoenzimático para o diagnóstico sorológico da infecção pelo herpesvírus bovino 1. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 26, n. 3, p. 363-372, 2005.
- GART, J. J.; BUCK, A. A. Comparison of a screening test and a reference test in a epidemiology studies. *American Journal of Epidemiology*, Oxford, v. 83, n. 3, p. 593-602, 1966.
- GIBBS, E. P. J.; RWEYEMANN, M. M. Bovine herpesviruses. Part I. Bovine herpesvirus 1. *Veterinary Bulletin*, Weybride, v. 47, n. 5, p. 317-343, 1977.
- LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*, Washington, v. 33, n. 1, p. 159-174, 1977.
- LEMAIRE, M.; PASTORET, P. P.; THIRY, E. Le contrôle de l'infection par Le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine. *Annales de Médecine Vétérinaire*, Liège, v. 138, n. 3, p. 167-180, 1994.
- LOVATO, L. T.; WEIBLEIN, R.; TOBIAS, F. L.; MORAES, M. P. Herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1): inquérito soro-epidemiológico no rebanho leiteiro do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 25, n. 3, p. 425-430, 1995.
- MÉDICI, K. C.; ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F. Ensaio imunoenzimático comercial no diagnóstico sorológico das infecções por herpesvírus bovino 1. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 30, n. 2, p. 343-346, 2000b.
- _____. Prevalência de anticorpos neutralizantes contra o herpesvírus bovino tipo 1, decorrente de infecção natural, em rebanhos com distúrbios reprodutivos. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 30, n. 2, p. 347-350, 2000a.
- MELO, C. B.; LOBATO, Z. I. P.; CAMARGOS, M. F.; SOUZA, G. N.; MARTINS, N. R. S.; LEITE, R. C. Distribuição de anticorpos para herpesvírus bovino 1 em rebanhos bovinos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v. 54, n. 6, p. 575-580, 2002.
- OLIVEIRA, A. P.; DAVID, C.; ESTEVES, P. A.; SPILKI, F. R.; SILVA, A. D.; HOLZ, C.; SIMONETTI, A. B. Blood or serum collected on filter paper for detection of antibodies to bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1). *Acta Scientiae Veterinariae*, Porto Alegre, v. 39, n. 1, p. 948, 2011.
- PORTERFIELD, J. S. *Andrewes' viruses of vertebrates*. 5th ed. London: Baillière Tindall, 1989. 457 p.
- REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating 50 per cent end point. *American Journal of Hygiene*, Baltimore, v. 27, n. 39, p. 493-497, 1938.
- ROCHA, M. A.; GOUVEIA, Z. I. P.; LOBATO, R. C.; LEITE, R. C. Pesquisa de anticorpos para IBR em amostragem de demanda no Estado de Minas Gerais, 1990-1999. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v. 53, n. 6, p. 645-647, 2001.
- ROIZMAN, B.; DESROSIERS, R. C.; FLECKENSTEIN, B.; LOPEZ, C.; MINSON, A. C.; STUDDERT, M. J. The family herpesviridae: an update. The herpesvirus study group of the international committee on taxonomy of viruses. *Archives of Virology*, Germany, v. 123, n. 3-4, p. 425-490. 1992.
- STRAUB, O. C. BHV-1 Infectious: Relevance and spread in Europe. *Compendium in Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, Oxford, v. 14, n. 2, p. 175-186, 1991.
- TAKIUCHI, E.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Herpesvírus bovino tipo 1: tópicos sobre a infecção e métodos de diagnóstico. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 22, n. 2, p. 203-209, jul./dez. 2001.
- TEIXEIRA, M. F. B.; ESTEVES, P. A.; SCHMIDT, C. S.; SPILKY, 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*, Seropédica, v. 21, n. 1, p. 33-37, 2001.
- TRIOLA, M. F. *Introdução à estatística*. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 1999. 410 p.
- VAN SCHAİK, G.; SCHUKKEN, Y. H.; NIELEN, M.; DIJKHUIZEN, A. A.; BENEDICTUS, G. Risk factors for introduction of BHV1 into BHV1 free dutch dairy farms: a case control study. *Veterinary Quarterly*, London, v. 23, n. 2, p. 71-76, 2001.
- VIEIRA, S.; BRITO, W. M. E. D.; SOUZA, W. J.; ALFAIA, B. T.; LINHARES, D. C. L. Anticorpos para o herpesvírus bovino 1 (BoHV-1) em bovinos do estado de Goiás. *Ciência Animal Brasileira*, Goiânia, v. 4, n. 2, p. 131-137, jul./dez. 2003.
- WYLER, R.; ENGELS, M.; SCHWYZR, M. Infectious bovine rhinotracheitis/vulvovaginitis (BHV-1). In: WITTMANN, G. *Herpesvirus diseases of cattle, horses and pigs*. Boston: Kluwer Academic Publishers, 1989. p. 1-72.