

ANTICORPOS NEUTRALIZANTES CONTRA *PESTIVIRUS* EM SOROS BOVINOS DO ESTADO DE PERNAMBUCO¹

ROBERTO S. CASTRO, LÚCIO E.H. MELO², SÍLVIO R.O. ABREU³,
ANA MARIA M. MUNIZ e ANA PAULA S. ALBUQUERQUE⁴

RESUMO - Foi realizado um estudo epidemiológico visando determinar a prevalência da infecção por *Pestivirus*, empregando-se a amostra NADL do vírus da Diarréia Bovina a Vírus/Doença das Mucosas (VDBV/DM), em bovinos do Estado de Pernambuco. Das 288 amostras de soros examinadas através da soroneutralização em microplacas, 209 (72,64%) apresentaram resultados positivos. A população foi estratificada segundo a faixa etária em: Estrato = E-I (6 a 12 meses), E-II (12 a 24 meses), E-III (24 a 36 meses), E-IV (acima de 36 meses). Observaram-se diferenças significativas (X^2 , $P < 0,05$) entre os índices dos estratos I (45,4%) e III (78,0%); I e IV (82,7%); e II (60,0%) e IV, o que indica associação positiva entre a idade e índice de positividade. Além disso, registrou-se diferença significativa (X^2 , $P < 0,05$) entre os índices de animais do sexo masculino (42,8%) e feminino (78,6%) positivos. Esses achados indicam intensa atividade de um vírus antígenicamente relacionado com a amostra NADL do VDBV/DM.

Termos para indexação: vírus da diarréia bovina/doença das mucosas, virose.

NEUTRALIZING ANTIBODIES AGAINST *PESTIVIRUS* IN BOVINE SERA FROM PERNAMBUCO STATE, BRAZIL

ABSTRACT - An epidemiological survey was performed to evaluate the prevalence of serum antibody to *Pestivirus* (NADL strain of BVD/MD virus) among cattle from Pernambuco State, Brazil. Of 288 sera, 209, (72.6%) were positive. The population was stratified according to age: E = estratum - I (6 to 12 months), E-II (12 to 24 months), E-III (24 to 36 months), E-IV (over 36 months). Statistically significant (X^2 ; $P < 0.05$) differences were found between the following: E-I (45.4%) and E-III (78.05%); E-I and E-IV (82.7%); and E-II (60.0%) and E-IV. This indicates a positive association between age and positive infection. Moreover, statistically significant (X^2 ; $P < 0.05$) difference between the rates recorded in males (42.8%) and females (78.6%) was observed. These findings indicate a high activity of a BVD/MD (NADL) antigenically related virus.

Index terms: bovine viral diarrhea/mucosal disease virus, viral disease.

INTRODUÇÃO

O vírus-da-diarréia-bovina, o vírus-da-doença-das-mucosas (VDBV/DM), o vírus-da-pesto-suína-clássica e o vírus-da-doença-das-fronteiras (VDF), pertencentes ao gênero *Pestivirus* da família Togaviridae são responsáveis por doenças que acometem bovinos, suínos, ovinos e caprinos, respectivamente. Esses agentes apresentam seme-

lhança, em suas estruturas antigênicas (Westaway et al. 1985). Esta semelhança é mais marcante entre certas amostras do VDBV/DM e VDF, o que tem suscitado a discussão sobre a possibilidade de se tratar de variantes antigênicas de uma mesma espécie, mais ou menos adaptadas a um hospedeiro determinado. A circunstância de que amostras de *Pestivirus* isoladas de ovinos podem infectar bovinos, e vice-versa, levou à necessidade de se considerar esta possibilidade, quando se estudam essas doenças onde diferentes espécies de animais são criadas juntas (Nettleton 1987).

A diarréia bovina e o vírus/doença das mucosas é uma grave enfermidade de bovinos, e resulta de uma complexa e ainda não bem esclarecida intera-

¹ Aceito para publicação em 7 de maio de 1993.

² Méd.-Vet., M.Sc., Prof.-Ass. Dep. Med. Vet. da UFRPE - Rua D. Manoel de Medeiros, s/n, CEP 52171-030 Recife, PE.

³ Méd.-Vet., Mestrando na UFRPE.

⁴ Médica Veterinária.

ção entre amostras citopatogênicas e não-citopatogênicas do vírus e fatores ambientais (Shimizu et al. 1989, Castrucci et al. 1990). A forma DM é mais grave que a DBV, que, por outro lado, ocorre com maior frequência e tem curso às vezes inaparente (Backer 1987).

No Brasil, são escassos os relatos de levantamentos sorológicos para pesquisa de anticorpos contra *Pestivirus* em bovinos (Wizigmann et al. 1972, Soares & Pereira 1974, Castro et al. 1992), apesar de ter sido descrita uma doença semelhante à forma DM e, posteriormente, isolado o VDBV (Vidor 1974).

Este trabalho foi conduzido com o objetivo de determinar a prevalência de bovinos soropositivos ao VDBV/DM (amostra NADL) no Agreste Meridional de Pernambuco, principal bacia leiteira do Estado.

MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi feita na microrregião do Agreste Meridional de Pernambuco, composta por 29 Municípios distribuídos entre a Zona da Mata e o Sertão. Nesta microrregião, a precipitação pluvial varia de 410,0 mm a 1.497,7 mm, com uma média em torno de 870,8 mm, e temperatura de 18,9°C a 27,8°C (Cunha & Mello 1984). Aí estão distribuídas, predominantemente, pequenas e médias propriedades que exploram bovinos, principalmente mestiços Zebu-Holandês (98% da população), submetidos a manejo semi-extensivo com práticas sanitárias pouco frequentes (Müller et al. 1981).

A amostragem seguiu, em linhas gerais, as recomendações de Astudillo (1979). Estimou-se, com base em um plano piloto, a prevalência em 65%. Assim, aplicando-se a fórmula: $n = p \cdot q \cdot z^2/d^2$ (p = prevalência esperada; $q = 100 - p$; z = intervalo de confiança; d = erro de amostragem); estimando-se $p = 65\%$, $z = 1,96$ (95% de confiança) e $d = 10\%$, obteve-se $n = 215$ amostras. Decidiu-se, com base na composição dos rebanhos (Müller et al. 1981), colherem-se 16 amostras por fazenda e duas propriedades por município estudado, compreendendo, assim, 18 propriedades e 9 municípios (Bom Conselho, Correntes, Garanhuns, Canhotinho, Iati, Lajedo, Catés, São José e Terezinha) e 288 amostras.

Foi empregada a soroneutralização (SN) em microplaca (Black 1970), usando a amostra NADL do VDBV/DM e células MDBK como substrato. Os testes foram conduzidos em duplicata e foram considerados positivos os resultados da diluição de 1:4 (soro: MEM-Eagle),

neutralizavam totalmente 100 DIC50/0,05 ml de vírus.

Foram calculados índices na amostra bruta e após estratificação, seguindo os critérios faixa etária e sexo/faixa etária.

Os resultados encontrados nos respectivos estratos foram comparados através do teste de Qui-quadrado (Sepiegel 1977).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da SN para pesquisa de anticorpos contra *Pestivirus* (VDBV/DM-NADL) estão apresentados na Tabela 1, na qual se observa que 72,6% dos soros testados foram positivos à SN, e que houve uma boa dispersão relativamente aos resultados encontrados nos diferentes municípios, registrando-se maior variação entre os de Lajedo (53,1%) e os de Correntes (89,6%). Esses achados indicam intensa atividade de um vírus antigenicamente relacionado com as amostras NADL do VDBV/DM, pois no Brasil não existem vacinas contra *Pestivirus* para uso em bovinos. Evidências semelhantes foram reportadas por outros autores ao examinarem amostras de soros bovinos colhidos nos estados do Rio Grande do Sul (Wizigmann et al. 1972), São Paulo (Soares & Pereira 1974) e Minas Gerais (Castro et al. 1992). Esses resultados devem ser interpretados com cautela, pois não é possível afirmar categoricamente que os animais reagentes foram expostos ao VDBV/DM, uma vez que na região estudada é prática comum o manejo conjunto de bovinos e pequenos ruminantes e pode ocorrer infecção cruzada entre estas espécies (Nettleton 1987). Entretanto, deve-se ressaltar que estudos conduzidos em vários países revelam os bovinos como os principais hospedeiros de *Pestivirus*. Assim, torna-se evidente a necessidade de estudos mais amplos, que incluam a pesquisa de anticorpos e/ou isolamento de *Pestivirus* em ruminantes outros, além dos bovinos.

É importante destacar que existem diferenças antigênicas entre as amostras do VDBV/DM, detectáveis através da SN (Hafez et al. 1976, Howard et al. 1987). Assim, se fossem empregadas outras amostras do vírus, resultados diferentes poderiam ser obtidos. Por outro lado, deve-se chamar a atenção para a possibilidade de parte da

TABELA 1. Distribuição de bovinos portadores de anticorpos contra *Pestivirus* (DBV/DM-NADL) em municípios do Agreste Meridional de Pernambuco, de acordo com a faixa etária. Recife, PE. 1991.

| Municípios | Estratos | | | | | | | | | |
|---------------------------------|---------------------|------|-----------------------|------|------------------------|------|-----------------------|------|-------|------|
| | I (6 a 12) meses | | II (12 a 24) meses | | III (24 a 36) meses | | IV (> de 36) meses | | Total | |
| | Pos. | Neg. | Pos. | Neg. | Pos. | Neg. | Pos. | Neg. | Pos. | Neg. |
| Bom Conselho | 2 | 2 | 3 | 7 | 5 | 2 | 16 | 3 | 26 | 14 |
| Correntes | 3 | 1 | 2 | 0 | 3 | 0 | 18 | 2 | 26 | 03 |
| Garanhuns | 2 | 0 | 1 | 1 | 3 | 1 | 15 | 4 | 21 | 06 |
| Canhotinho | 2 | 2 | 1 | 1 | 3 | 1 | 17 | 2 | 23 | 06 |
| Iati | 1 | 3 | 3 | 2 | 4 | 3 | 12 | 7 | 20 | 15 |
| Lajedo | 0 | 4 | 3 | 3 | 3 | 3 | 11 | 5 | 17 | 15 |
| Caetés | 0 | 4 | 2 | 1 | 6 | 0 | 10 | 3 | 18 | 08 |
| São João | 2 | 2 | 5 | 1 | 6 | 0 | 12 | 4 | 25 | 07 |
| Terezinha | 3 | 0 | 7 | 2 | 6 | 1 | 17 | 2 | 33 | 05 |
| Total | 15 | 18 | 27 | 18 | 39 | 11 | 128 | 32 | 209 | 79 |
| % animais testados | 11,5 | | 15,6 | | 17,4 | | 55,5 | | 100,0 | |
| % positivos dentro dos estratos | 45,4' | | 60,0" | | 78,0" | | 82,7' | | 72,6 | |

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatisticamente significativa (X^2 , $P < 0,05$).

população testada ser imunotolerante e, como tal, soronegativa, apesar de persistentemente infectada. Este fenômeno é observado quando há transmissão vertical antes de ser instalada a imunocompetência do feto bovino (McClurkin et al. 1984). Embora não se conheça a real situação no Brasil em relação à imunotolerância, esse fenômeno deve ocorrer com baixa frequência, em torno de 2%, por analogia ao que acontece em outros países (Backer 1987), o que não tem influência marcante sobre os resultados aqui relatados.

Os resultados referentes à população estratificada de acordo com a faixa etária mostram-se na Tabela 1. Observa-se que houve diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) entre os estratos I e III, I e IV e II e IV. Esses achados demonstram um crescimento nos índices de acordo com a idade. Situação semelhante já foi observada (Castro et al. 1992) e pode ser explicada devido ao maior tempo de exposição ao agente e à circunstância de que anticorpos neutralizantes contra

VDBV/DM podem persistir durante anos após a infecção (Dufel & Harkness 1985).

É necessário chamar a atenção para a interpretação dos resultados obtidos no estrato composto por animais entre 6 e 12 meses de idade, uma vez que, em alguns animais, anticorpos passivos podem persistir durante esse período (Coria & McClurkin 1978), o que pode ter levado a resultados falso-positivos e superestimativa dos reais resultados.

A estratificação da população de acordo com o sexo (Tabela 2) revelou que houve diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) entre os índices de fêmeas (78,6%) e machos (42,8%) positivos à SN. Adicionalmente, observou-se que fêmeas de idade superior a 24 meses apresentaram índice (82,5%) significativamente ($P < 0,05$) superior ao observado nas mais jovens (62,2%), e que não houve diferença entre os índices registrados nos machos dos estratos formados por animais mais jovens (42,4%) e mais velhos que 24 meses

TABELA 2. Distribuição de bovinos portadores de anticorpos contra *Pestivirus* (DBV/DM-NADL) em municípios do Agreste Meridional de Pernambuco, de acordo com a faixa sexo. Recife, PE, 1991.

| Municípios | Machos | | | | | | Fêmeas | | | | | |
|---------------------------------|--------------|------|---------------|------|-------------------|------|--------------|------|---------------|------|-------------------|------|
| | 6 a 24 meses | | > de 24 meses | | Total | | 6 - 24 meses | | > de 24 meses | | Total | |
| | Pos. | Neg. | Pos. | Neg. | Pos. | Neg. | Pos. | Neg. | Pos. | Net. | Pos. | Neg. |
| Bom Conselho | 2 | 4 | 2 | 1 | 4 | 5 | 3 | 5 | 19 | 4 | 22 | 9 |
| Correntes | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 4 | 0 | 20 | 1 | 24 | 1 |
| Garanhuns | 2 | 0 | 0 | 2 | 2 | 2 | 1 | 1 | 18 | 3 | 19 | 4 |
| Canhotinho | 1 | 2 | 1 | 0 | 2 | 2 | 2 | 1 | 19 | 3 | 21 | 4 |
| Iati | 2 | 2 | 0 | 2 | 2 | 4 | 2 | 3 | 16 | 8 | 18 | 11 |
| Lajedo | 1 | 3 | 0 | 1 | 1 | 4 | 2 | 4 | 14 | 7 | 16 | 11 |
| Caetés | 0 | 3 | 0 | 1 | 0 | 4 | 2 | 2 | 16 | 2 | 18 | 4 |
| São João | 2 | 3 | 2 | 0 | 4 | 3 | 5 | 0 | 16 | 4 | 21 | 4 |
| Terezinha | 3 | 1 | 1 | 1 | 4 | 2 | 7 | 1 | 22 | 2 | 29 | 3 |
| Total | 14 | 19 | 7 | 9 | 21 | 28 | 28 | 17 | 160 | 34 | 188 | 51 |
| % animais testados | 11,4 | | 5,6 | | 17,0 | | 15,6 | | 67,4 | | 83,0 ^a | |
| % positivos dentro dos estratos | 42,4 | | 43,7 | | 42,8 ² | | 62,2 | | 82,5 | | 78,6 ¹ | |

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatisticamente significativa (X^2 , $P < 0,05$).

(43,7%). As formas de transmissão do VDBV/DM (Backer 1987) não sugerem marcante predisposição à infecção de acordo com o sexo. A diferença observada pode ter sido, de alguma forma, influenciada pelo pequeno número de machos testados no estrato acima de 24 meses. Isto se torna mais evidente quando se comparam estes índices obtidos nos dois estratos do sexo feminino, em que foi reafirmada a relação entre idade e índice de positividade (Tabela 1), o que não foi evidenciado nos estratos formados por animais do sexo masculino, indicando, assim, uma possível subestimativa do índice observado nos machos mais velhos.

A infecção por *Pestivirus* (VDBV/DM) em bovinos tem sido associada a doença de nocividade econômica em vários países (Brownli et al. 1987, Harkness 1987), chegando a ser considerada como a principal causa de perdas consequentes da infecção viral de bovinos nos Estados Unidos (Kelling et al. 1990). Assim, a ampla distribuição desse agente no Brasil evidencia a necessidade de estudos mais aprofundados no sentido de estabelecer o modelo epidemiológico da infecção, avaliar a magnitude das perdas econômicas, e de conduzir

pesquisas fundamentais no sentido de esclarecer a patogenia, etiologia e formas alternativas e econômicas de controle, se for o caso, bem como fornecer subsídios para o estabelecimento da pertinente política sanitária.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Paulo P. de Leon, pelas sugestões; ao Prof. Dr. Rômulo Cerqueira Leite e ao Dr. Andrey P. Lage, pelo fornecimento de amostras de vírus e de células; e ao Sr. José Carlos da Silva, pela valiosa assistência técnica. Este trabalho foi financiado parcialmente pelo CNPq.

REFERÊNCIAS

- ASTUDILLO, V.M. Encuesta por muestreo para estudios epidemiológicos en poblaciones animales. Rio de Janeiro: Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, 1979. 60p. (Serie de Manuales Didácticos, 12).
- BACKER, J.C. Bovine viral diarrhea virus. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.190, p.1449-1458, 1987.

- BLACK, J.W. Use of the microtiter serumneutralization test for the diagnosis of IBR, BVD and other bovine and porcine viral diseases. **Proceedings U.S.A. Animal Health Association**, v.74, p.515-521, 1970.
- BROWNLIE, J.; CLARKE, M.C.; HOWARD, C.J.; POCKOCK, D.H. Pathogenesis and epidemiology of Bovine Virus Diarrhea Virus infection of cattle. **Annales de Recherches Vétérinaires**, v.18, p.157-166, 1987.
- CASTRO, R.S.; LEITE, R.C.; ABREU, J.J.; LAGE, A.P.; FERRAZ, I.B.; LOBATO, Z.I.P.; BAL-SAMÃO, S.L.E. Prevalence of antibodies to selected viruses in bovine embryo donors and recipients from Brazil, and its implications in international embryo trade. **Tropical Animal Health and Production**, v.24, p.173-176, 1992.
- CASTRUCCI, G.; FRIGERI, F.; OSBURN, B.I.; FERRARI, M.; SAWYER, M.M.; ALDROVANDI, V. A study of some pathogenetic aspects of Bovine Viral Diarrhea Virus infection. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v.13, p.41-49, 1990.
- CORIA, M.F.; McCLURKIN, A.W. Duration of active and colostrum-derived passive antibodies to Bovine Viral Diarrhea Virus in calves. **Canadian Journal Comparative Medicine**, v.42, p.239-243, 1978.
- CUNHA, J.B.; MELLO, J.L. **Dados climatológicos básicos do Nordeste**. Recife: SUDENE, 1984. 50p.
- DUFEL, S.J.; HARKNESS, J.W. Bovine Virus Diarrhea - Mucosal Disease infection in cattle. **Veterinary Record**, v.117, p.240-245, 1985.
- HAFEZ, S.M.; LIESS, B.; FREY, H.R. Studies on the natural occurrence of neutralizing antibodies against six strains of Bovine Viral Diarrhea virus in field sera of cattle. **Zentralblatt für Veterinärmedizin, Serie B**, v.23, p.669-677, 1976.
- HARKNESS, J.W. The control of Bovine Viral Diarrhea Virus infection. **Annales de Recherche Vétérinaires**, v.18, p.167-174, 1987.
- HOWARD, C.J.; BROWNLIE, J.; CLARKE, M.C. Comparison by the neutralization assay of pairs of non-cytopathogenic and cytopathogenic strains of Bovine Virus Diarrhea Virus isolated from cases of Mucosal Disease. **Veterinary Microbiology**, v.13, p.361-369, 1987.
- KELLING, C.L.; STINE, L.C.; RUMP, K.K.; PARKER, R.E.; KENNEDY, J.E.; STONE, R.T.; ROSS, G.S. Investigation of Bovine Viral Diarrhea Virus infection in a range beef cattle herd. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.197, p.589-593, 1990.
- McCLURKIN, A.W.; LITLEDIKE, E.T.; CUTLIP, R.C.; RANK, G.H.; CORIA, M.F.; BOLIN, S.R. Production of cattle immunotolerant to Bovine Viral Diarrhea Virus. **Canadian Journal Comparative Medicine**, v.48, p.156-161, 1984.
- MÜLLER, P.B.; ALEXANDRE, J.P.; GUEDES FILHO, A.; KIRST, P. **Custo de produção e eficiência produtiva de rebanhos leiteiros de Pernambuco**. Recife: EMATER-PE, 1981. 66p.
- NETTLETON, P.F. Pathogenesis and epidemiology of Border Disease. **Annales de Recherches Vétérinaires**, v.18, p.147-155, 1987.
- SHIMIZU, M.; SATOU, K.; NISHIOKA, N.; YOSHINO, T.; MOMOTANI, E.; ISHIKAWA, Y. Serological characterization of viruses isolated from experimental Mucosal Disease. **Veterinary Microbiology**, v.1, p.13-21, 1989.
- SOARES, L.; PEREIRA, O.A.C. Neutralizing antibodies against Bovine Viral Diarrhea-Mucosal Disease (BVD) virus in cattle sera from São Paulo State, Brazil. **Revista de Microbiologia**, v.5, p.1-5, 1974.
- SPIEGEL, M.R. **Statística**. São Paulo: McGraw Hill, 1977. p.331-361.
- VIDOR, T. Isolamento e identificação do vírus da Doença das Mucosas no Estado do Rio Grande do Sul. **Boletim do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor**, p.51-58, 1974. Especial 2.
- WESTAWAY, E.G.; BRINTON, M.A.; GAIDAMOVICH, S.Y.A.; HORZINEK, M.C.; IGARASHI, A.; KAARIAINEN, L.; LVOV, D.K.; PORTERFIELD, J.S.; RUSSEL, P.K.; TRENT, D.W. Togaviridae. **Intervirology**, v.24, p.125-139, 1985.
- WIZIGMANN, G.; VIDOR, T.; RICCI, Z.M.T. Investigações Sorológicas sobre a ocorrência e incidência dos vírus Parainfluenza-3, da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina e da Diarréia a Virus-Doença das Mucosas dos Bovinos no Estado do Rio Grande do Sul. **Boletim do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor**, p.52-58, 1972. Especial 1.