

Detecção de anticorpos anti-pestivírus em ovinos com histórico de problema reprodutivo no Estado de São Paulo*

Natália Carrillo Gaeta¹⁺, Huber Rizzo², Enoch Brandão de Sousa Meira Jr¹, Edviges Maristela Pituco³, Lúria Hiromi Okuda³, Claudia Pestana Ribeiro³ e Lilian Gregory¹

ABSTRACT. Gaeta N.C., Rizzo H., Meira Jr E.B.S., Pituco E.M., Okuda L.H., Ribeiro C.P. & Gregory L. [Detection of antibodies against pestivirus in sheep with history of reproductive disorder in the State of São Paulo.] Detecção de anticorpos anti-pestivírus em ovinos com histórico de problema reprodutivo no Estado de São Paulo. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 38(2):153-156, 2016. Departamento de Clínica Médica. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Orlando Marques de Paiva, 87, Cidade Universitária, São Paulo, SP 05508-270, Brasil. E-mail: natalia.gaeta@hotmail.com

Pestivirus are responsible for reproductive disorders in sheep and, although they are widely studied in other countries, Brazil lacks information on the prevalence of virus in sheep flocks. To investigate the occurrence of pestiviruses in the State of São Paulo, 268 samples of serum sheep with a history of reproductive problems from 28 properties were collected. Using virus neutralization as the diagnostic technique, it was found two (1%) positive animals, with antibody titer of 20, with both females showing a history of reproductive problems, one with neonatal death and another, showing uterine secretion. Two properties studied showed reactive animals (7%). In five of these (18%), bovine co-creation was observed. There were no associations between any reagent animals and the risk factors studied. This work is one of the pioneers in the study of the prevalence of anti-pestivirus antibodies in Brazilian sheep flocks. The low frequency and low viral titer observed suggest that pestivirus are not an important agent related to the presence of reproductive disorders in sheep herds.

KEY WORDS. SÉRUM neutralization, small ruminants, *Flavivirus*, buiatrics.

RESUMO. *Pestivirus* são responsáveis problemas reprodutivos em ovinos e, embora sejam amplamente estudados em outros países, o Brasil carece de informações acerca da prevalência destes vírus nos rebanhos ovinos. Para investigar a ocorrência de pestivirus no Estado de São Paulo, foram colhidas 268 amostras de soro ovino com histórico de problemas reprodutivos, em 28 propriedades localizadas em municípios do estado de São Paulo. Uti-

lizando a virusneutralização como técnica diagnóstica, verificou-se dois (1%) animais soropositivos, apresentando título de anticorpos de 20, com ambos apresentando histórico de problemas reprodutivos, sendo um, morte neonatal e outro, secreção uterina. Duas propriedades estudadas apresentaram animais reagentes (7%). Em cinco delas (18%), observou-se co-criação com bovinos. Não foram observadas quaisquer associações entre os animais

* Recebido em 23 de setembro de 2015.

Aceito para publicação em 12 de janeiro de 2016.

¹ Médico-veterinário. Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo (USP), Av. Prof. Orlando Marques de Paiva, 87, Cidade Universitária, São Paulo, SP, 05508 270. E-mails: ejmeira@hotmail.com; lgregory@usp.br; +Autora para correspondência, E-mail: natalia.gaeta@hotmail.com - bolsista FAPESP.

² Médico-veterinário, PhD, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, PE, 52171-900. E-mail: hubervet@gmail.com

³ Médico-veterinário, PhD, Laboratório de Vírus de Bovídeos, Instituto Biológico, Av. Conselheiro Rodrigues Alves, 1252, Vila Mariana, São Paulo, SP, 04014-002. E-mails: pituco@biologico.sp.gov.br; okuda@biologico.sp.gov.br; ribeiro@biologico.sp.gov.br

reagentes e os fatores de risco estudados. A baixa frequência e o baixo título viral encontrados indicam que o pestivirus não está associado aos problemas reprodutivos nos rebanhos de ovinos no Brasil. O presente trabalho é um dos pioneiros no estudo da prevalência de anticorpos anti-pestivirus em rebanhos ovinos brasileiros.

PALAVRAS-CHAVE. Virusneutralização, pequenos ruminantes, *Flavivirus*, buiatria.

INTRODUÇÃO

A Família *Flaviviridae* contém três gêneros: *Flavivirus*, *Pestivirus* e *Hepacivirus*. O gênero *Pestivirus* contém três vírus de importância veterinária: o vírus da Diarreia Viral Bovina tipo 1 (BVDV-1), o vírus da Diarreia Viral Bovina tipo 2 (VDBV-2), o vírus da Peste Suína Clássica (CSF) e o vírus da doença das fronteiras (BDV) (Vilcek et al. 2014, Giammaroli et al., 2015). São espécies relacionadas estruturalmente e antigenicamente, que podem ocasionar infecção cruzada (Nettleton et al. 1998). As espécies do gênero *Pestivirus* apresentam o gene E2, responsável por codificar a glicoproteína gp53 imunodominante, importante na estimulação da imunidade (Chase et al. 2004, Vilcek et al. 2005, Dubois et al. 2008, Liu et al. 2010). Por este motivo, observa-se reatividade cruzada entre BVDV, BDV e CSF.

BVDV e BDV causam problemas reprodutivos em pequenos ruminantes, embora o BVDV tenha maior importância na clínica de bovinos. Os rebanhos ovinos acometidos por pestivirus podem apresentar principalmente diminuição da qualidade do sêmen (Brock et al. 2008), animais estéreis, diminuição da taxa de concepção, abortamentos, natimortos, malformações fetais, nascimento de cordeiros fracos (Nettleton 1995).

A transmissão pode ocorrer a partir de contato direto, inseminação artificial com sêmen de animais persistentemente infectados (Gardiner & Barlow 1981), transmissão iatrogênica e transmissão vertical (Sawyer 1992).

O diagnóstico dos pestivirus pode ser realizado por diversas técnicas (Brock et al. 2008) sendo a virusneutralização utilizada com mais frequência, dado sua sensibilidade e especificidade capaz de identificar e mensurar os anticorpos neutralizantes (OIE 2008), embora seja uma técnica que demanda tempo e laboratórios com cultivo celular (Sandvik 1999).

Apesar dos pestivirus em ovinos sejam amplamente estudados em outros países (Heckert et al. 1994, Zaghawa 1998, Celedón et al. 2001, Berriatua et al. 2006, Valdazo- González et al. 2008), são pou-

cos os trabalhos que avaliam a soro-prevalência destes em rebanhos ovinos no Brasil (Calderón et al. 2009).

Diante da falta de dados e da necessidade de se construir um panorama da prevalência de ovinos positivos para pestivirus, no Brasil, este trabalho teve como objetivo avaliar a ocorrência de ovinos soro reagentes para pestivirus com histórico de problemas reprodutivos no Estado de São Paulo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Fez-se um estudo transversal, com avaliação de 263 ovinos pertencentes a 28 propriedades das seguintes cidades do Estado de São Paulo: Presidente Prudente, Itu, Valinhos, Itatinga, Piracaia, Itapevi, Vargem, Pedra Bela, Campinas, Jundiaí, Morungaba, Piedade, Itupeva, Emanuel, Pirassununga, São Paulo, Indaiatuba, Atibaia e Pedra Bela.

Foram estudados 28 machos e 235 fêmeas, selecionados a partir do exame físico geral e específico do sistema reprodutivo, de acordo com o preconizado por Feitosa (2008) e da análise do histórico reprodutivo dos animais. As avaliações proporcionaram a detecção dos seguintes problemas reprodutivos: aborto, repetição de cio, parto prematuro, distocia, morte fetal, nascimento de cordeiro fraco, secreção uterina, prolapso uterino, absorção fetal, ausência de parto, baixo índice de fertilidade, para as fêmeas e falta de libido, cegueira, epidídimo espesso, degeneração testicular, infertilidade, e epididimite, para os machos (Figuras 1 e 2).

O sorodiagnóstico da infecção por *Pestivirus* foi realizado através da soro-neutralização, recomendada pela OIE (2015). As amostras foram inativadas a 56°C por 30 minutos inicialmente. A técnica foi realizada de forma qualitativa e quantitativa em placas de microtitulação com 96 cavidades de fundo chato com triagem em duplicata e diluição 1:10, com diluições seriadas na base logarítmica 2. Após a adição de meio essencial mínimo (MEM) e da amostra, adicionou-se 200 DICT₅₀/50 µL da cepa viral BVDV-1 NADL. As placas foram incubadas em estufa com 5% de CO₂ a 37°C por uma hora. Em seguida, receberam 50 µL de suspensão células MDBK (Madin-Darby bovine kidney) na concentração de 2 x 10⁵ células/mL, com incubação à 37°C em estufa com 5% de CO₂ por quatro dias. A titulação foi realizada com as amostras reagentes na triagem, com diluições variando entre 1:10 e 1:5210, com o procedimento descrito anteriormente. Para a leitura das placas, utilizou-se microscópio invertido, buscando pela presença de amostras reagentes a partir do título 10. O título viral utilizado foi 10^{5,3}DICT/50 µL.

A associação entre a presença de animais reagentes com os problemas reprodutivos bem como com co-criação com bovinos, ovinos e suínos e a determinação dos fatores de risco foram avaliados mediante o teste qui-quadrado e a ODDS RATIO, respectivamente, considerando nível de significância de 5%. O software SPSS 16 for Windows foi utilizado para as análises.

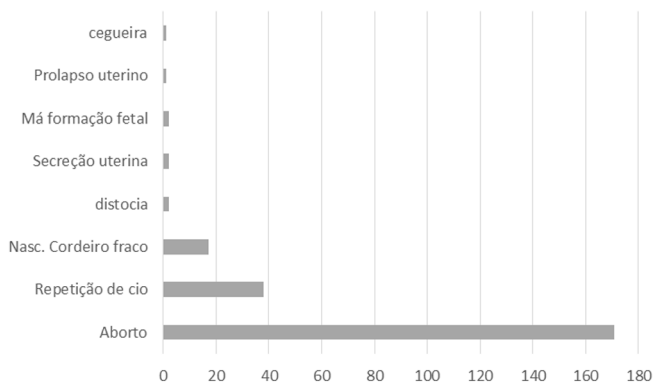


Figura 1. Frequência de problemas reprodutivos observados nos machos estudados, estado de São Paulo, 2015.

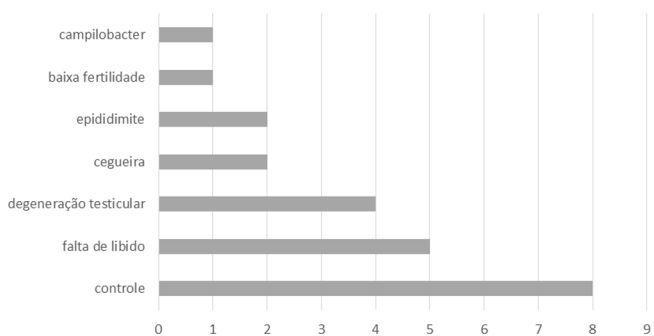


Figura 2. Frequência de problemas reprodutivos observados nas fêmeas estudadas, estado de São Paulo, 2015.

RESULTADOS

Dos 268 animais avaliados, somente dois (1%) foram soropositivos, apresentando título de anticorpos de 20. Ambos apresentaram histórico de problemas reprodutivos, sendo um, morte neonatal e outro, secreção uterina.

Somente duas propriedades estudadas apresentaram animais reagentes (7%). Em cinco delas (18%), observou-se co-criação com bovinos, sendo a fêmea com histórico de morte neonatal, pertencente a uma delas. Observou-se, também, co-criação de ovinos com caprinos (11%) e suínos (1%). Não foram observadas quaisquer associações entre os animais reagentes e os fatores de risco estudados ($p > 0,05$).

DISCUSSÃO

A detecção de pestivirus em ovinos no Brasil é uma área carente de informações que ajudem a construir um panorama da prevalência destes vírus nas criações. Desta maneira, este trabalho é um dos pioneiros nesta área. Somando-se ao presente trabalho, existem poucas evidências da circulação de pestivirus em rebanhos ovinos no Brasil.

A baixa frequência de animais reagentes pode estar associada à ausência ou baixa frequência

de BDV nos rebanhos brasileiros. Pescador et al. (2004) reportaram desordem neurológica associado a infecção por *Pestivirus*, sendo ele BVDV ou BDV, podendo ser a primeira e única evidência do vírus da Doença das Fronteiras, no Brasil. Calderón et al. (2009), observaram 5% de ovinos sororreagentes, frequência maior que a encontrada pelo presente trabalho.

Fora do país, as prevalências são mais altas. Valdazo-González et al. (2008) observaram prevalência de 28,6% em ovinos na Espanha. Danuser et al. (2009), na Suíça, verificaram que 56,1% das infecções foram induzidas por BDV-1 e 43,9% por BVDV. Já Zaghawa (2010) observaram prevalência de 27,5% no Egito. Na América do Sul, Flores et al. (2010) e Aceros et al. (2012) relataram prevalência de 69,5% em borregas sendo 73,6% delas com problemas reprodutivos e 2,1% e 4,9% de BVDV e BDV em ovinos no Peru, respectivamente.

Embora as frequências de infecção por pestivirus sejam baixas em rebanhos ovinos, os rebanhos bovinos apresentam alta prevalência (Quincozes et al. 2007, Brito et al. 2010, Chaves et al. 2012). Um dos animais sororreagentes pertencia a propriedade com criação consorciada com bovinos. A co-criação com bovinos é considerada fator de risco para a transmissão de pestivirus aos rebanhos ovinos (Krametter-Froetscher et al. 2010).

Fêmeas com infecção por pestivirus podem apresentar diversos problemas reprodutivos, tais como esterilidade, diminuição da taxa de concepção, abortamentos, natimortos, malformações fetais e nascimento de cordeiros fracos (Nettleton 1995). Embora tenha sido observada morte neonatal e secreção uterina nos animais reagentes, a presença de diversos outros sinais que também indicam problemas reprodutivos nos animais não reagentes, somados a baixa frequência e o baixo título viral obtido, indicam que o pestivirus não é causador de problemas reprodutivos nos rebanhos ovinos e que é provável a presença de outras condições infecciosas ou não, que podem ser a causa das desordens observadas.

CONCLUSÃO

O presente trabalho é um dos pioneiros no estudo da ocorrência de anticorpos anti-pestivirus em rebanhos ovinos brasileiros. Observou-se baixa frequência e título viral nos animais estudados embora houvesse criação consorciada com bovinos. Desta forma, sugere-se a presença de outras causas infecciosas ou não que possam estar relacionadas aos problemas reprodutivos associados.

Agradecimentos. Gostaríamos de agradecer a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro, ao Laboratório de Víruses de Bovídeos do Instituto Biológico pelo apoio técnico às ações realizadas no laboratório.

REFERÊNCIAS

- Aceró N.L., Gerónimo H.R., Ramierz M.A. & Perez N.F. Seroprevalência de pestivirus de ruminantes em reprodutores de una empresa de la sierra central del Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 23:504-509, 2012.
- Berriatua E., Barandika J.F., Aduriz G., Hurtado A., Eestévez L., Atzeandio R. & García-Pérez A.L. Flock-prevalence of border disease virus infection in Basque dairy-sheep estimated by bulk-tank milk analysis. *Veterinary Microbiology*, 118:37-46, 2006.
- Brito W.M.E.D., Alfaia B.T., Caixeta S.P.M.B., Ribeiro A.C.C., Miranda T.D.M.T., Barbosa A.C.V.C., Barthasson D.L., Linhares D.C. & Faria B.O. Prevalência da infecção pelo Vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) no Estado de Goiás, Brasil. *Revista de Patologia Tropical*, 39:7-20, 2010.
- Brock K.V., Grooms D.L. & Givens M.D. Reproductive disease and persistent infections, p.145-156. In: Goyal S.M. & Ridpath J.F. (Eds), *Bovine Viral Diarrhea Virus: Diagnosis, Management, and Control*. 1st ed. Blackwell Publishing, Iowa, 2005.
- Calderón R.G., Silva A.A., Ferreira D.O.L., Marcondes J., Pituco E.M. & Dias A. Ocorrência do Vírus Parainfluenza-3, Vírus Respiratório Sincicial, Vírus da Diarreia Viral Bovina e Herpesvírus Tipo 1 em rebanhos ovinos da região de Botucatu-SP. *Ciência Animal Brasileira*, [S.I.]:563-568, 2009.
- Celedón M., Sandoval A., Droguett J., Calfio R., Ascencio L., Pizarro J. & Navarro C. Pesquisa de anticuerpos seroneutralizantes para pestivirus y herpesvirus en ovinos, caprinos y camélidos sudamericanos de Chile. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 33:165-172, 2001.
- Chaves N.P., Bezerra D.C., De Sousa V.E., Santos H.P. & Pereira H. Frequência e fatores associados à infecção pelo Vírus da Diarreia Viral Bovina em bovinos leiteiros não vacinados no Estado do Maranhão. *Arquivos do Instituto Biológico*, 79:495-502, 2012.
- Danuser R., Vogt H.R., Kaufmann T., Peterhans E. & Zanoni R. Seroprevalence and characterization of pestivirus infections in small ruminants and new world camelids in Switzerland. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*, 151:109-117, 2009.
- Flores D., Rivera H., Gavidia C. & Manchego A. Anticuerpos contra el virus de la diarrea viral bovina y su asociación con problemas reproductivos en borregos de una empresa ovejera de la sierra central del Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 21: 113-118, 2010.
- Gardiner A.C. & Barlow R.M. Vertical transmission of Border Disease infection. *Journal of Comparative Pathology*, 91:467-470, 1981.
- Giammarioli M., Rossi E., Casciari C., Bazzicchi M., Claudia T. & De Mia G.M. Genetic characterization of border disease virus (BDV) isolates from small ruminants in Italy. *Virus Genes*, 50:321-324, 2015.
- Heckert R.A., Dubuc C. & Briscoe M.R. Prevalence of border disease virus infection in a small group of Canadian sheep. *Canadian Veterinary Journal*, 35:379-381, 1994.
- Krametter-Froetscher R., Duenser M., Preyler B., Theiner A., Benetka V., Moestl K. & Baumgartner W. Pestivirus infection in sheep and goats in West Austria. *Veterinary Journal*, 186:342-346, 2010.
- Nettleton P.E.G. Ruminant Pestiviruses. *British Veterinary Journal*, 151:615-642, 1995.
- Nettleton P.F.G., Gilray J.A., Russo P. & Dlissi E. Border disease of sheep and goats. *Veterinary Research*, 29:327-340, 1998.
- OIE. Border Disease. Terrestrial Manual, Disponível em: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.07.01_BORDER_DIS.pdf>. Acesso em: 3 Set 2015.
- OIE. Bovine Viral Diarrhoea. Terrestrial Manual. Disponível em: <<http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>>. Acesso em: 4 Set 2015.
- Pescador C.A., Corbellini L.G., Driemeier D., Gonçalves R.K. & Cruz C.E.F. Neurological disorder associated with pestivirus infection in sheep in Rio Grande do Sul, Brazil. *Ciência Rural*, 34:935-938, 2004.
- Quincozes C.G., Fischer G., Hübner S.D.O., Vargas G.D.A., Vidor T. & Brod C.S. Prevalência e fatores associados à infecção pelo vírus da diarreia viral bovina na região Sul do Rio Grande do Sul. Prevalence and factors associated with bovine viral diarrhea virus infection in South of Rio Grande do Sul. *Semina: Ciências Agrárias*, 28:269-276, 2007.
- Sawyer M.M. Border Disease of sheep: the disease in the newborn, adolescent and adult. *Comparative Immunology Microbiology and Infectious Disease*, 15:171-177, 1992.
- Valdazo-González B., Álvarez M. & Sandvik T. Prevalence of border disease virus in Spanish lambs. *Veterinary Microbiology*, 128:269-278, 2008.
- Vilcek S., Leskova V., Meyer D., Postel A. & Becher P. Molecular characterization of border disease virus strain Aveyron. *Veterinary Microbiology*, 171:87-92, 2014.