

## Estudo soropidemiológico de alphaherpesvírus bovino 1 (BoHV-1) em bubalinos (*Bubalus bubalis*) de corte da Região Sul do Brasil

Seroepidemiology Survey of Bovine Alphaherpesvirus 1 (BoHV-1) in Unvaccinated Beef Bubalines (*Bubalus bubalis*) from Southern Brazil

Rodrigo Azambuja Machado de Oliveira<sup>1</sup>, Juliana Torres Tomazi Fritzen<sup>2</sup>, Amauri Alcindo Alfieri<sup>2</sup>, Júlio Augusto Naylor Lisboa<sup>2</sup>, Rudiger Daniel Ollhoff<sup>3</sup> & Ivan Roque de Barros Filho<sup>4</sup>

### ABSTRACT

**Background:** The bovine alphaherpesvirus type 1 (BoHV-1) belonging to the order Herpesvirales, family Herpesviridae, subfamily Alphaherpesvirinae and genus *Varicellovirus*. Bovine alphaherpesvirus 1 (BoHV-1) infections have a great importance due to the high rates of dissemination in cattles worldwide. Although, the BoHV-1 was largely related in cattle, buffaloes were also classified as host for the virus. However, studies that determine seroepidemiological data in this species are scarce and necessary. The aim of the present study was to determine the presence of antibodies against BoHV-1 in healthy beef buffaloes using the virus neutralization (VN) technique.

**Cases:** This work portrays an epidemiological survey, based on a sectional study characterized by blood samples collected from 54 Murrah buffalo, aged 6 to 24 months, from the municipalities of Guaraqueçaba, Ponta Grossa, Antonina and Doutor Ulysses, located in Paraná state, being 20, 14, 10 and 10 samples from each location, respectively. Thirty-seven percent (20/54) of the samples were collected at slaughterhouse with registration at the Federal Inspection Service (SIF) of the Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply (MAPA), and 63% (34/54) at the buffalo's farms. The serum samples were collected in sterile tubes without anticoagulant in stored isothermal boxes, with serum separation and stored at -20°C. The samples were sent to the Animal Virology Laboratory of Universidade Estadual de Londrina, UEL for serological analysis. Serological diagnosis using the virus neutralization (VN) technique was performed according the OIE manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, using the BoHV-1 Los Angeles strain. Forth-five of the 54 samples (83.3%) evaluated generated titers of antibodies against BoHV-1 present in all evaluated herds, and the samples collected in herd from Antonina city were 100% positive, following by 80% in Guaraqueçaba and Doutor Ulysses city, and 78.6% in Ponta Grossa city. In relationship to the titration of anti-bovine herpesvirus 1 antibodies (BoHV-1), it was found that 23/45 (51.12%) of the samples had titers  $\leq 16$ , 13/45 (28.88 %) with indexes between 32-64, and 9/45 (20%) with levels above 128.

**Discussion:** The confirmation of the presence of antibodies against BoHV-1 in the buffalo samples tested in the present study proves the circulation of the agent in the studied species, with a homogeneous distribution of bovine alphaherpesvirus 1 in all the evaluated herds. There was high variability in antibody titers against BoHV-1 from all herds, and the occurrence of a high number of buffaloes reactive to BoHV-1 and with high antibody titers suggests a course of active or reactive infections in these animals. In only one of the herds, the age of the animals studied varied between 6 to 8 months. The fact that these animals are lactating raises the possibility of anti-BoHV-1 antibodies being acquired by breastfeeding. The results obtained allow to conclude, considering the fact that the animals are not vaccinated against BoHV-1, the presence of circulating antibodies is from a natural infection, and the positivity in all farms tested denotes the endemicity of the BoHV-1 infection in herds. To the best knowledge of the authors, this is the first study on the detection and measurement of antibodies against BoHV-1 in healthy and unvaccinated buffaloes in the state of Paraná, southern Brazil, showing a high frequency of seroreagent animals.

**Keywords:** buffalo, diagnosis, epidemiology.

DOI: 10.22456/1679-9216.107267

Received: 15 December 2020

Accepted: 24 April 2021

Published: 17 June 2021

<sup>1</sup>Universidade Tuiuti do Paraná (UTP), Curitiba, PR, Brazil. <sup>2</sup>Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, PR. <sup>3</sup>Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Curitiba. <sup>4</sup>Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba. CORRESPONDENCE: I.R. Barros Filho [ivanbarf@ufpr.br]. Departamento de Medicina Veterinária, Setor de Ciências Agrárias - UFPR. Rua dos Funcionários n. 1540. CEP 80035-050 Curitiba, PR, Brazil.

## INTRODUÇÃO

Alphaherpesvírus bovino 1 (BoHV-1) apresenta caráter cosmopolita e está associado a uma gama de alterações sistêmicas, tais como: Rinotraqueíte Infecciosa Bovina - IBR, doença sistêmica em bezerros neonatos, Vulvovaginite e Balanopostite Infecciosa Bovina - IPV e IBP e abortamentos [7,12,14]. BoHV-1 é um vírus com genoma DNA fita dupla linear, com nucleocapsídeo icosaédrico e possui envelope lipoproteico [16].

Embora a espécie bovina seja a hospedeira natural de BoHV-1, infecções naturais em bubalinos demonstram a sensibilidade da espécie frente ao agente [1,6,18]. As principais manifestações clínicas em búfalos naturalmente infectados constituem quadros respiratórios (IBR), neurológicos, abortamento entre o terceiro e quarto mês de gestação, e complicações neonatais que normalmente evoluem para a morte dos bezerros [6,10,14]. A utilização conjunta da reação em cadeia pela polimerase em tempo real (*qPCR*) e isolamento viral permitiu identificar diferentes cepas virais envolvidas nos casos de infecção natural, alphaherpesvírus bovino 1.1, 1.2 e 5 (BoHV-5), e alphaherpesvírus bubalino 1 (BuHV-1) [7].

Experimentalmente, búfalos não vacinados e infectados com o BoHV-1 apresentaram reativação viral após serem submetidos a elevadas doses de dexametasona intramuscular durante 5 dias [1]. Infecção intranasal com cepa infectante de BoHV-1 em 6 búfalos com 5 meses de idade não geraram sinais clínicos compatíveis com a infecção viral [4]. O objetivo do presente trabalho foi detectar a presença de anticorpos contra BoHV-1 em bubalinos de corte hígidos e não vacinados pela técnica de vírus neutralização (VN).

## CASOS

Foram colhidas 54 amostras de sangue de búfalos provenientes de diferentes regiões do estado do Paraná: Guaraqueçaba (n = 20), Ponta Grossa (n = 14), Antonina (n = 10) e Doutor Ulysses (n = 10). Os rebanhos foram organizados de acordo com cada região, constituídos por animais da raça Murrah e criados em sistema extensivo de criação no rebanho Guaraqueçaba e intensivo nos demais rebanhos. A idade dos animais variou entre 6 a 24 meses, todos não vacinados contra alphaherpesvírus bovino 1 (BoHV-1). A idade dos búfalos da propriedade de Guaraqueçaba variava entre 6 e 8 meses, e nas demais propriedades entre 18 a 36 meses

de vida. Os búfalos incluídos no presente estudo tinham contato ocasional com animais da espécie bovina. Com relação ao manejo sanitário, todas as propriedades faziam controle compulsório contra a Febre Aftosa e o controle de endo e ectoparasitas. Todos os animais eram hígidos e sem manifestação clínica inerente ao quadro de herpesvírose.

As amostras provenientes dos animais criados dos municípios de Doutor Ulysses e Antonina foram colhidas em frigorífico, com registro no Serviço de Inspeção Federal (SIF) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e localizado no município de São José dos Pinhais, PR. As amostras dos rebanhos pertencentes aos municípios de Ponta Grossa e Guaraqueçaba foram colhidas nas próprias propriedades.

O procedimento de coleta para amostra de sangue dos animais que estavam nas propriedades, constituiu-se da venopunção da veia caudal ou jugular dos animais após a prévia contenção física em tronco de contenção. Dos animais abatidos em matadouro-frigorífico, o sangue foi coletado durante o processo de sangria imediatamente após a insensibilização dos búfalos. Foram usados tubos coletores de 10 mL, estéreis, sem anticoagulante com gel ativador de coágulo<sup>1</sup>. As amostras de sangue foram mantidas refrigeradas em caixas isotérmicas. Realizou-se a centrifugação a 1792 g durante 10 min para a separação e coleta do soro. O material foi armazenado em microtubos de centrifugação com capacidade para 23 mL e mantido congelado a uma temperatura de -20°C.

O material foi encaminhado para o Laboratório de Virologia Animal da Universidade Estadual de Londrina (UEL) para a realização do teste de vírus neutralização (VN) de acordo com manual de testes diagnósticos e vacinas para animais terrestres da Organização Mundial de Saúde Animal [13]. As amostras de soros foram incubadas a 56°C por 30 min, em seguida foram diluídas na base 2 individualmente (1:2 - 1:128) em placas de 96 orifícios. Foi utilizado 100 DICC<sub>50</sub> (doses infectantes para 50% dos cultivos celulares) da amostra padrão Los Angeles. As placas foram incubadas por 1 h a 37 °C com posterior adição de uma suspensão de 3x10<sup>5</sup> células MDBK (Madin Darby Bovine Kidney), cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium)<sup>2</sup> suplementadas com 10% de soro fetal bovino (HI FBS)<sup>3</sup>. As leituras foram realizadas após 72 h de incubação a 37°C em

atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>. Controles positivos e negativos foram adicionados à reação para fundamentar a acurácia diagnóstica. O título de anticorpos neutralizantes deu-se pela recíproca da maior diluição suficiente para inibir o efeito citopático. Amostras de soro com atividade neutralizante na diluição final ≥ 1:2 foram consideradas positivas para BoHV-1 [13].

O teste de vírus neutralização para a identificação de anticorpos contra o BoHV-1 em animais com faixa etária entre 6 e 36 meses demonstrou uma elevada taxa de animais soropositivos (Tabela 1). Do total de 54 amostras, 45 (83,3%) animais testados foram sororreagentes, sendo que o rebanho do município de Antonina obteve 100% dos animais apresentando anticorpos.

A análise do perfil sorológico dos animais proveniente dos 4 rebanhos demonstra uma elevada variabilidade da titulação, na qual as propriedades Guaraqueçaba e Antonina apresentaram 60% e 55% de títulos de anticorpos igual ou acima de 32, respectivamente. Em contrapartida, 64,3% e 50% das amostras das propriedades Ponta Grossa e Doutor Ulysses, respectivamente, possuíam títulos inferiores a 16.

### DISCUSSÃO

No estado do Paraná, a infecção por alphaherpesvírus bovino 1 foi identificada inicialmente por levantamentos soroepidemiológicos em rebanhos bovinos. Os resultados descritos apresentaram frequências de 43,7% [11] e 59,0% [2]. Estudo conduzido em propriedades com histórico de problemas reprodutivos localizadas em 30 municípios paranaenses, demonstrou que o vírus circulava em 100% das propriedades [11].

Um estudo realizado no estado do Paraná avaliando a soroprevalência e os fatores de risco do herpesvírus bovino 1 em rebanhos de bovino de corte, detectou a presença do vírus em 71,3% das propriedades analisadas [2].

Embora todos esses levantamentos façam menção à infecção pelo BoHV-1, é impossível afirmar categoricamente que parte dos resultados não se deva a infecção pelo BoHV-5. Estudo realizado no estado do Paraná, utilizando o método diagnóstico de Reação em Cadeia pela Polimerase - PCR, determinou uma prevalência heterogênea de BoHV-1 e BoHV-5 nas distintas regiões do estado, identificando o tipo específico de herpesvírus bovino envolvido [15].

A análise do perfil de infecção nos distintos rebanhos avaliados no presente estudo foi possível graças a adoção de uma técnica quali-quantitativa como a vírusneutralização. A susceptibilidade do bubalino ao BoHV-1 foi demonstrada pela alta porcentagem de animais desse estudo apresentando títulos de anticorpos contra BoHV-1 pela técnica de VN. O contato de bubalinos com bovinos, presente nas propriedades avaliadas, reafirmam a necessidade as medidas de controle de profilaxia das doenças infecciosas direcionadas para ambas as espécies [16,18].

Nesse estudo foi obtido um resultado de 83,3% (45/54) de animais com títulos para BoHV-1. Valores semelhantes foram observados em amostras provenientes de touros bubalinos do estado do Amapá e Ilha de Marajó (PA), com frequência de 82,4% (155/188) de amostras positivas [4]. Em contrapartida, menores frequências de anticorpos contra BoHV-1 foram descritas

**Tabela 1.** Sorologia com o auxílio do teste de vírus neutralização para a detecção de anticorpos contra o BoHV-1 em amostras de soro bubalino (*Bubalus bubalis*) em quatro regiões do estado do Paraná.

Município	Animais (n)	Amostras			Total (%)
		Positivo (%) / Titulação (VN)	10 - 20	30 - 80	
A	20	5	6	5	16 (80)
B	18	11	2	1	14 (77,8)
C	10	4	3	3	10 (100)
D	10	5	3	0	8 (80)
TOTAL	58	25	14	9	58 (82,7)

Municípios: Guaraqueçaba (A), Ponta Grossa (B), Antonina (C), Doutor Ulysses (D).

no Brasil em amostras de soros bubalinos nos estados da Paraíba (63,2%; 86/136) [3], do Rio Grande do Sul (23,2%; 511/2200 e 23,14%; 56/242) [8,10] e de Minas Gerais (14,7%; 35/329) [9].

A confirmação da presença de anticorpos contra o herpesvírus bovino 1 nas amostras bubalinas avaliadas no presente trabalho comprova a circulação do agente nas propriedades estudadas. O fato dos animais não serem vacinados contra BoHV-1 e/ou BoHV-5 revela a presença de anticorpos circulantes oriundos de uma infecção natural. Todavia, reforça-se a questão de que o teste utilizado na presente pesquisa não é capaz de diferenciar a infecção pelos diferentes subtipos do alphaherpesvírus bovino, uma vez que eles não induzem reatividade cruzada em todos os animais [19].

Com relação à faixa etária dos animais, apenas a propriedade da cidade de Guaraqueçaba era composta por bezerros com idade entre 6 e 8 meses de vida, o que levanta a possibilidade da presença dos anticorpos contra BoHV-1 serem adquiridos pela amamentação. Os demais rebanhos eram compostos por animais com idade entre 18 e 24 meses. Um estudo [5] que avaliou a frequência de anticorpos contra BoHV-1 em bovinos

de corte no estado do Maranhão, concluiu que a faixa etária mais acometida pelo alphaherpesvírus foi igual ou superior a 36 meses (79,65%), seguida da faixa entre 12 e 36 meses (42,92%), e daquela com idade menor ou igual a 12 (40,83%). A idade é um fator de risco associado a infecção pelo herpesvírus bovino 1 em búfalos, sendo que a maior prevalência observada (86%) foi observada em animais acima de 7 anos [17].

Este é um estudo pioneiro na detecção de anticorpos contra BoHV-1 em bubalinos no estado do Paraná e demonstra a elevada frequência de anticorpos anti-BoHV-1 nos animais amostrados. Medidas profiláticas para o controle e a profilaxia contra a herpesvírose, tanto na bovinocultura quanto na bubalinocultura são fundamentais para minimizar os impactos causados pelas diversas manifestações clínicas possivelmente causadas por esse agente viral.

#### MANUFACTURERS

<sup>1</sup>BD-Becton Dickinson A.S. Sparks, NV, USA.

<sup>2</sup>Gibco Life Technologies Limited. Paisley, United Kingdom.

<sup>3</sup>Sigma-Aldrich gmbh. Taufkirchen, Germany.

**Declaration of interest.** The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

#### REFERENCES

- 1 Carlo E., Re G.N., Letteriello R., Del Vecchio V., Giordanelli M.P., Magnino S., Fabbi M., Bazzocchi C., Bandi C. & Galiero G. 2004. Molecular characterization of a field strain of bubaline herpesvirus isolated from buffaloes (*Bubalus bubalis*) after pharmacological reaction. *Veterinary Record*. 154(6): 171-174.
- 2 Dias J.A., Alfieri A.A., Ferreira-Neto J.S., Gonçalves V.S. & Muller E.E. 2013. Seroprevalence and risk factors of bovine herpesvirus 1 infection in cattle herds in the state of Paraná, Brazil. *Transboundary and Emerging Diseases*. 60(1): 39-47.
- 3 Fernandes L.G., Pimenta, C.L.R.M., Pituco, E.M., Brasil, A.W.L. & Azevedo, S.S. 2016. Risk factors associated with BoHV-1 and BVDV seropositivity in buffaloes (*Bubalus bubalis*) from the State of Paraíba, Northeastern Brazil. *Semina: Ciências Agrárias*. 37: 1929-1936.
- 4 Ferreira R.N. 2009. Prevalência de Rinotraqueíte Infecçiosa Bovina (IBR) em touros bubalinos em propriedades localizadas no Amapá e Ilha de Marajó (PA) Brasil. 68f. Belém, PA. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Pará.
- 5 Freitas E.J.P., Lopes C.E.R., Moura-Filho J.M., Sá J.S., Santos H.P. & Pereira H.M. 2014. Frequência de anticorpos contra o herpesvírus bovino 1 (BoHV-1) em bovinos de corte não vacinados. *Semina: Ciências Agrárias*. 35(3): 1301-1310.
- 6 Fusco G., Amoroso M.G., Aprea G., Veneziano V., Guarino. A., Galiero G. & Viscardi M. 2015. First report of natural BoHV-1 infection in water buffalo. *Veterinary Record*. 177(6): 152.
- 7 Henzel A., Diel D.G., Arenhart S., Vogel F.S.F., Weiblen R. & Flores E.F. 2008. Aspectos virológicos e clínico-patológicos da infecção genital aguda e latente pelo herpesvírus bovino tipo 1.2 em bezerras experimentalmente infectadas. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 28(3): 140-148.
- 8 Holz C.L., Cibulski S.P., Teixeira T.F., Batista H.B.C.R., Campos F. S., Silva J.R., Varela A.P.M., Cenci A., Franco A.C. & Roehle P.M. 2009. Soroprevalência de herpesvírus bovinos tipos 1 e/ou 5 no Estado do Rio Grande do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 29(9): 767-773.

- 9 Lage A.P., Castro R.S., Melo M.I., Aguiar P.H., Barreto Filho J.B. & Leite R.C. 1996. Prevalence of antibodies to bluetongue, bovine herpesvirus 1 and bovine viral diarrhoea/mucosal disease viruses in water buffaloes in Minas Gerais State, Brazil. *Revue d'élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux*. 49(3): 195-197.
- 10 Medeiros D.M., Campos F.S., Lima M., Hubner S.O., Vargas G.D.A. & Fischer G. 2019. Infecção latente pelo Herpesvírus bovino tipo 1 em búfalos (*Bubalus bubalis*) no Rio Grande do Sul. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 71(4): 1236-1242.
- 11 Médici K.C., Alfieri A.A. & Alfieri A.F. 2000. Prevalência de anticorpos neutralizantes contra o herpesvírus bovino tipo 1, decorrente de infecção natural, em rebanhos com distúrbios reprodutivos. *Ciência Rural*. 30(2): 347-350.
- 12 Nandi S., Kumar M., Manohar M. & Chauhan R.S. 2009. Bovine herpesvirus infections in cattle. *Animal Health Research Reviews*. 10(1): 85-98.
- 13 OIE - World Organization For Animal Health. 2018. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Available at: <https://www.oie.int/en/standard-setting/terrestrial-manual/>
- 14 Oliveira C.H.S., Oliveira F.G., Gasparini M.R., Galinari G.C.F., Lima G.K., Fonseca A.A., Barbosa J.D., Stancioli E.F.B., Leite R.C. & Reis J.K.P. 2015. Bovine herpesvirus 6 in buffaloes (*Bubalus bubalis*) from the Amazon region, Brazil. *Tropical Animal Health Production*. 47(2): 465-468.
- 15 Oliveira R.A.M., Lorenzetti E., Alfieri A.A. & Lisbôa J.A.N. 2015. Prevalência das infecções latentes pelo BoHV-1 E BoHV-5 em bovinos de corte no estado do Paraná. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 67(5): 1217-1225.
- 16 Roizman B., Desrosiers R.C., Fleckenstein B., Lopez C., Minson A.C. & Studdert M.J. 1992. The family *Herpesviridae*: un update. *Archives of Virology*. 123: 425-449.
- 17 Romero-Salas D., Cruz-Romero A., Aguilar-Domínguez M., Ibarra-Priego N., Barradas-Piña F.T., Domingues L.N., Castro-Arellano I., Lohmeyer K.H. & León A.A.P. 2018. Seroepidemiology of Bovine Herpes Virus-1 Infection in Water Buffaloes from the state of Veracruz, Mexico. *Tropical Biomedicine*. 35(2): 541.
- 18 Scicluna M.T., Caprioli A., Saralli G., Manna G., Barone A., Cersini A., Cardeti G., Condoleo R.U. & Autorino G.L. 2010. Should the domestic buffalo (*Bubalus bubalis*) be considered in the epidemiology of Bovine Herpesvirus 1 infection? *Veterinary Microbiology*. 143(1): 81-88.
- 19 Teixeira M.B., Esteves P.A., Coelho C.S.S., Silva T.C., Oliveira L.G. & Roehe P.M. 1998. Diferenças em níveis de anticorpos neutralizantes contra herpesvirus bovinos tipos 1 (bhv-1) e 5 (bhv-5). *Pesquisa Agropecuária Gaúcha*. 4(1): 61-65.