



MAURILIO ANDRADE ROCHA

**HERPESVÍRUS BOVINO-1
EM TOUROS DE UMA CENTRAL DE SÊMEN -
SORONEUTRALIZAÇÃO E ISOLAMENTO NO SÊMEN.**

**Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Minas Gerais, como requisito
parcial para obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária
Área: Medicina Veterinária Preventiva
Orientadora: Profª Drª Aurora Maria
Guimarães Gouveia**

**Belo Horizonte
UFMG - Escola de Veterinária
1994**

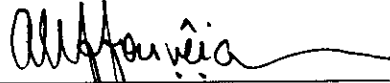
R672i Rocha, Maurilio Andrade, 1963 -
Herpesvírus bovino-1 em touros de uma
central de sêmen - soroneutralização e
isolamento no sêmen/ Maurilio Andrade
Rocha. - Belo Horizonte: UFMG-Escola de
Veterinária, 1994.
51 p. : 5 il.

Dissertação (Mestrado)

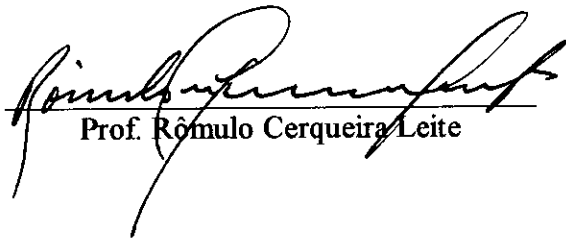
1 . Bovino - Doenças - Teses. 2. Vírus
do herpes em animais - Teses. I. Título.

CDD - 636.208 969 2

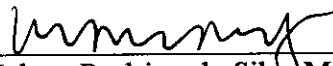
Dissertação defendida e aprovada em 06/12/94, pela Comissão Examinadora, constituída por:



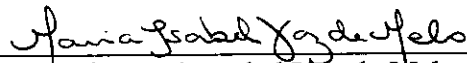
Prof. Aurora Maria Guimarães Gouveia
Orientadora



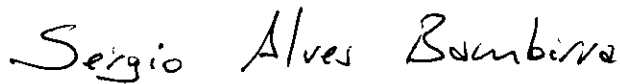
Prof. Rômulo Cerqueira Leite



Prof. Nelson Rodrigo da Silva Martins



Prof. Maria Isabel Vaz de Melo



Prof. Sérgio Alves Bamberra



À Walmira.



AGRADECIMENTOS

Agradeço principalmente à Profª Aurora Maria Guimarães Gouveia, que me abriu a primeira e mais difícil porta. Sua orientação competente supera expectativas e apresenta o inesperado.

Agradeço também aos co-orientadores Prof. Rômulo Cerqueira Leite, especialmente pela idéia inicial e Prof. Néelson R.S. Martins, presenças fundamentais ;

Ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG, pela oportunidade;

À FINEP e ao CNPq , pelo apoio financeiro;

Ao Colegiado dos cursos de pós-graduação da Escola de Veterinária da UFMG, na pessoa do Prof. Antônio de Pinho e das funcionárias Claudia, Sandra e Fátima ;

Aos funcionários da Biblioteca, especialmente à Eunice, Milton e Rosilene;

À central que cedeu as amostras de soro e sêmen, possibilitando a realização da parte experimental;

Aos colegas de laboratório, especialmente, Lourdes, Lilian, Eduardo, Jenner, Cristina e Marcelo (em memória);

Aos colegas de pós-graduação, especialmente, Anna Crhistina, Clara Nilce, Marcos Rostagno e Anapolino;

Aos professores da Escola de Veterinária da UFMG, especialmente, Profª Celina Modena , Profª Vera Viegas, Profª Lígia, e Prof Leônidas Chow;

Aos funcionários da Escola de Veterinária da UFMG, especialmente, Doracy, Creuza, Nádia, Luciana, Beth e André;

Aos Professores Sérgio Bambirra e Maria Isabel, por participarem da Banca Examinadora, enriquecendo este trabalho;

Aos meus pais e amigos;

E a todos que se envolveram de alguma forma positiva.

A tese é como porco. Nada se desperdiça.”

Umberto Eco

ÍNDICE

	Resumo	15
1	Introdução	17
2	Revisão bibliográfica	19
3	Material e métodos	25
3.1	Central de inseminação	25
3.2	Amostras de sêmen e soro	25
3.3	Linhagem celular e meios de cultura	26
3.4	Soroneutralização	26
3.5	Isolamento	27
3.6	Titulação	28
3.7	Identificação	29
4	Resultados e discussão	30
4.1	Resultados globais	30
4.2	Sorologia estratificada	32
4.3	Isolamento estratificado de HVB-1 no sêmen	35
4.4	Relação entre sorologia e isolamento	37
4.5	Técnicas de neutralização e isolamento	40
5	Conclusões	42
6	Summary	43
7	Referências bibliográficas	45



LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Sorologia e isolamento de HVB-1 nos touros da central de sêmen.....	32
TABELA 2 - Resultados sorológicos dos grupos A e B para HVB-1 por soroneutralização.....	33
TABELA 3 - Títulos sorológicos e isolamento de HVB-1 em sêmen dos touros da central de sêmen.....	34
TABELA 4 - Isolamento de HVB-1 em sêmen de touros dos grupos A e B.....	36
TABELA 5 - Relação entre sorologia e isolamento de HVB-1 nos touros da central de sêmen.....	37



RESUMO

Investigou-se a presença de infecção pelo herpesvírus bovino 1 (HVB-1) em touros de uma central brasileira de coleta e comercialização de sêmen bovino, através da pesquisa de anticorpos específicos no soro e do vírus no sêmen, utilizando-se as técnicas de neutralização e isolamento viral em cultivo celular, respectivamente. Foram examinados 61 touros, sendo 40 deles estudados em coletas pareadas e 21 em coleta única, totalizando 101 amostras de soro e 101 amostras de sêmen. Detectou-se anticorpos específicos em 37 (60,7%) touros e o HVB-1 em 20 amostras de sêmen (19,8%). A análise dos resultados obtidos indicou não haver uma correlação obrigatória entre detecção de anticorpos específicos no soro e isolamento do HVB-1 no sêmen dos touros. As técnicas utilizadas mostraram-se onerosas, trabalhosas e demoradas, apesar de serem sensíveis o suficiente para permitir o isolamento do HVB-1 de um grande número de touros. Métodos alternativos de diagnóstico devem ser desenvolvidos no intuito de solucionar os problemas relacionados ao tempo e ao custo. O exame prévio de todas amostras de sêmen coletadas para a presença do HVB-1 é altamente desejável.

Palavras-chave: Bovino, Herpesvírus Bovino-1, Sêmen.



INTRODUÇÃO

A inseminação artificial (IA) proporciona o melhoramento genético animal através da introdução de características desejáveis observadas em reprodutores comprovados, requerendo, entretanto, sêmen de boa qualidade sanitária para que se evite a disseminação de enfermidades.

A qualidade sanitária do sêmen bovino utilizado na IA pode ser comprometida por diversos fatores, dentre os quais aqueles associados a vírus presentes no sêmen bovino, destacando-se os vírus da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR), Diarréia Bovina a Vírus (BVD), Língua Azul, Leucose Enzoótica Bovina e Febre Aftosa, que podem ser transmitidos a animais susceptíveis através da IA. O desenvolvimento dos processos de criopreservação do sêmen possibilitou sua distribuição nacional e internacionalmente, assim como aumentou grandemente a possibilidade de transmissão de infecções entre rebanhos, uma vez que as condições de processamento e estocagem são ideais para a preservação dos patógenos virais. A propagação destas enfermidades virais que podem levar a baixas taxas de fecundação, afecções dos órgãos reprodutivos e morte dos conceptos em diversas fases da gestação (AFSHAR & EAGLESOME, 1990), e é possível que venham contribuindo para a manutenção de um baixo desempenho reprodutivo nos rebanhos bovinos brasileiros.

O Herpesvírus Bovino-1 (HVB-1), agente etiológico da IBR, tem sido o patógeno viral mais comumente encontrado no sêmen bovino. Sabe-se que após a infecção primária pelo HVB-1, os animais tornam-se portadores vitalícios. Os episódios de

reativação do HVB-1 em latência, com conseqüente eliminação no sêmen têm sido associados ao estresse e ao uso de corticóides, podendo ocorrer inclusive em animais aparentemente saudáveis (FIELDS & KNIPE, 1992).

Nos países desenvolvidos, programas com o objetivo de obter sêmen livre de vírus têm se baseado no monitoramento da presença de vírus e anticorpos específicos em touros e rejeição ou eliminação de qualquer animal reativo ou infectado dos centros de inseminação. Porém, mesmo nesses países, nem sempre é viável excluir touros geneticamente superiores, surgindo a necessidade de detectar amostras contaminadas pelo HVB-1 através da pesquisa individual das partidas de sêmen a serem comercializadas. Apenas as amostras contaminadas seriam rejeitadas, possibilitando o uso de touros infectados mas geneticamente superiores, pelo monitoramento dos episódios de eliminação, controlando a transmissão do vírus pelo sêmen e mantendo animais de alto valor no plantel (SHEFFY & KRINSKY, 1973).

Sabendo-se dos efeitos prejudiciais advindos do uso de sêmen contaminado pelo herpesvírus bovino-1 na IA e sendo esse o vírus mais frequente no sêmen bovino, este trabalho objetivou conhecer a situação de touros utilizados na rotina de uma central brasileira de sêmen bovino em relação à infecção pelo HVB-1, através da pesquisa de anticorpos específicos no soro sanguíneo e da presença do vírus no sêmen, utilizando-se respectivamente as técnicas de soroneutralização e isolamento em cultivo celular.

REVISÃO DE LITERATURA

A Rinotraqueíte Infecçiosa Bovina (IBR) causada pelo HVB-1 caracteriza-se pelas diversas formas clínicas com que se apresenta, incluindo doença respiratória, vulvovaginite (KENDRICK et al., 1958), aborto (LUKAS et al., 1963), balanopostite (STUDDERT et al., 1964), encefalite (BARENFUS et al., 1963), diminuição nos índices de fecundação (ELAZHARY et al., 1980) e queda brusca na produção de leite (CHARLES & FURLONG, 1992). Tais manifestações podem ser encontradas de forma associada ou isolada.

A enfermidade foi descrita nos EUA pela primeira vez por MILLER (1955), mas já em 1933 relatou-se o isolamento do agente a partir de infecção genital em vacas na europa (SHEFFY & KRINSKY, 1973). O primeiro isolamento do HVB-1 ocorrido no Brasil foi em 1978 (ALICE, 1978) em pústulas vaginais de vacas no estado da Bahia. No mesmo ano, MUELLER et al. (1978) conseguiram isolar o vírus de rim de feto bovino proveniente de matadouro em São Paulo. A partir daí, vários autores vêm relatando a presença do agente em rebanhos bovinos brasileiros com problemas respiratórios, reprodutivos e neurológicos (MUELLER et al., 1979; GALVÃO, 1984; RIET-CORRÊA et al., 1989).

A partir dos primeiros estudos sorológicos realizados por GALVÃO et al. (1962/63) que testando 458 bovinos no estado da Bahia por soroneutralização (SN) detectaram anticorpos específicos anti-IBR no soro de 34,4% dos animais estudados, diversos autores detectaram sorologicamente a presença do HVB-1 em vários estados da Federação em percentuais variando entre 33% e 85,7%

(ANUNCIÇÃO et al.,1989; CASTRO,1988; GALVÃO,1984; MUELLER et al.,1981; RAVAZZOLO et al.,1989; WIZGMAN et al.,1972), demonstrando a ampla distribuição do HVB-1 em bovinos do Brasil, carecendo porém de dados específicos sobre centrais de sêmen.

Uma das principais características dos herpesvírus é sua capacidade de desenvolver estados de latência no organismo do hospedeiro, sendo que uma vez infectados pelo vírus da IBR os animais tornam-se portadores por toda vida. Animais clinicamente saudáveis podem, sob condições imunodepressoras muitas vezes imprevisíveis, eliminar o vírus pelas secreções sendo fonte constante de contaminação (FIELDS & KNIPE, 1992).

Vários autores observaram esse fato em bovinos, como SNOWDON (1965), que detectou excreção intermitente do HVB-1 em diversas secreções de bovinos artificialmente infectados por diferentes vias por um período de até 587 dias sendo o vírus isolado no prepúcio de touros por um período de até 361 dias. O autor ressalta a possibilidade de animais aparentemente saudáveis, inclusive os de centrais de sêmen, serem portadores e potencialmente capazes de voltar a eliminar o vírus pelas secreções. MILLER & VAN DER MAATEN (1987) após infecção experimental de 13 novilhas com o HVB-1 conseguiram reativar, quatro meses depois, a infecção latente em oito animais através da injeção de dexametasona. Cães, suínos, aves, camundongos e humanos também podem apresentar estados de latência quando infectados por herpesvírus específicos (HUGHES et al.,1987; BENFIELD & ADLDINGER,1984; OKUDA et al.,1993; McLENNAN & DARBY,1980; STEVENS,1989; BAGUST,1986; MENGELING, 1989).

Estudos voltados para avaliar os efeitos do uso de sêmen bovino contaminado pelo HVB-1 sobre a reprodução foram efetuados por Straub (1967) apud SPRADBROW (1968), o qual demonstrou que o vírus da IBR pode estar presente na secreção

prejudicial de touros em títulos de 10^8 TCID 50/ml, podendo facilmente contaminar o sêmen. KENDRICK & Mc ENTEE (1967), inseminando 12 vacas com sêmen artificialmente contaminado pelo HVB-1, encontraram 10 vacas com endometrite, lesões nos ovidutos e encurtamento do ciclo estral (abaixo de 18 dias). Cinco animais apresentaram encistamento do corpo lúteo, sendo que 11 vacas falharam na concepção. WHITE & SNOWDON (1973) examinaram taxas de fertilidade em 149 vacas de 20 rebanhos. Animais inseminados com sêmen contaminado pelo HVB-1 apresentaram taxa de não retorno ao serviço de 13,4% comparada com uma taxa de 60,8% quando sêmen não contaminado foi usado. Das vacas que retornaram ao serviço, 22,1% apresentaram encurtamento do ciclo estral (< 18 dias).

PARSONSON & SNOWDON (1975), utilizando sêmen livre e contaminado pelo HVB-1 e também touros livres e contaminados pelo vírus observaram baixa taxa de fecundação (40%) e necessidade de 4,5 serviços por concepção no grupo de vacas que recebeu sêmen contaminado via IA em comparação aos outros grupos. Entre as vacas do grupo que apresentou baixa taxa de concepção, 28% dos animais exibiram encurtamento do ciclo estral e sinais clínicos de vulvovaginite pustular infecciosa (VPI). Vacas cobertas naturalmente por touros infectados apresentaram sinais clínicos de VPI e uma taxa de concepção de 89%, com baixa interferência na fertilidade; as cobertas por touros normais apresentaram taxa de concepção de 100%, sem nenhum sinal clínico.

ELAZHARY et al (1980), isolaram o HVB-1 do conteúdo uterino de oito vacas de um grupo de 11 animais com baixa taxa de prenhez e alto número de serviços por concepção. O touro utilizado no programa de reprodução do plantel apresentava o vírus no sêmen. MILLER & VAN DER MAATEN (1984) observaram endometrite necrótica, corpo lúteo cístico, necrose focal do corpo lúteo em novilhas inoculadas com HVB-1 pela via intrauterina, um dia após serem cobertas por touro livre do vírus.

KUPFERSCHIMIED et al.,(1986) relataram a contaminação de vacas na Suíça através da inseminação com sêmen importado contaminado pelo vírus, proveniente de touro soronegativo. As vacas inseminadas apresentaram taxas de não retorno ao cio 10% abaixo da média do rebanho além de soroconversão, tendo de ser sacrificadas devido à legislação vigente naquele país.

Estudos comprovaram não haver correlação obrigatória entre a detecção de anticorpos específicos circulantes e a presença de infecção pelo HVB-1. Alguns animais infectados artificialmente por PARSONSON & SNOWDON (1975) não produziram anticorpos no período de 43 dias, apesar de o isolamento do HVB-1 haver sido realizado, tendo a sorologia sido inadequada para a detecção da infecção pelo vírus. Parsonson apud SCHULTZ et al., (1976) observou que problemas reprodutivos advindos da inseminação artificial com sêmen contaminado pelo HVB-1 podem ser encontrados tanto em vacas soronegativas quanto em soropositivas. SCHULTZ et al. (1976) citam três possibilidades em que o vírus pode ser detectado no sêmen de touros soronegativos: a) animais susceptíveis com infecção ativa e excretando o vírus antes do desenvolvimento de anticorpos ; b) baixa sensibilidade do teste em detectar baixos níveis de anticorpos; c) alguns animais infectados podem desenvolver a imunidade celular sem resposta humoral mensurável. KUPFERSCHIMIED et al., (1986) relataram a importação de sêmen contaminado pelo HVB-1 proveniente de touro soronegativo. O autor sugere que provavelmente a coleta de soro foi realizada na fase primária da infecção quando os anticorpos no soro não podem ser demonstrados.

Apesar de algumas recentes tentativas de desenvolver técnicas mais sensíveis e específicas (imunoeletromicroscopia, reação em cadeia da polimerase/PCR) para a detecção do HVB-1 no sêmen bovino, o isolamento e a identificação viral pelo cultivo celular e SN permanecem como os métodos de diagnóstico mais usados (AFSHAR & EAGLESOME, 1990; BRUNNER et al.,1988). ROCHA et al.(1993) detectaram duas amostras de sêmen

congelado contaminadas pelo HVB-1 dentre 27 examinadas. O método de isolamento em cultivo celular crescido em tubos Leighton foi considerado inadequado para o exame de um número maior de amostras. DREW et al. (1987), comparando o uso de tubos Leighton e microplacas de 24 poços cultivados com células de rim de bovino, observaram ser a técnica de cultivo em placas mais para o teste de grandes quantidades de amostras, com detecção de até 1 TCID₅₀ de vírus por esse método. Diversos autores observaram no sêmen fresco a presença de propriedades citotóxicas e deletérias ao HVB-1 e que tais efeitos são minimizados durante seu processamento devido à diluição e adição de gema de ovo que normalmente é utilizada nas centrais de sêmen (DARCEL & COLTER, 1976; DREW et al., 1987; LOWEN & DARCEL, 1985; KAHRS, 1980).

CHAPMAN et al. (1979) demonstraram, através do isolamento em linhagem celular MDBK e titulação em microplacas de 96 poços, não haver perda no título do vírus da IBR em sêmen bovino estocado por mais de um ano em nitrogênio líquido sob condições semelhantes àsquelas encontradas em centrais de sêmen. DREW et al. (1987) observaram também que a infectividade do vírus no sêmen permaneceu conservada por até sete dias em temperatura de 4° C e por cinco dias em temperatura ambiente. SPRADBROW (1968) examinando o sêmen de 40 touros provenientes de três centrais de sêmen australianas isolou o HVB-1 em três ampolas provenientes de uma mesma coleta e descongeladas em épocas diferentes, utilizando cultivo celular de rim bovino. Após 12 meses de armazenamento o vírus estava presente em uma das amostra na concentração de 10^{4.3} TCID₅₀/ml.

GÓLAN et al. (1990) realizaram estudos sobre a infecção pelo HVB-1 em centrais de sêmen examinando 40 amostras de sêmen provenientes de centrais localizadas na província de Santa Fé (Argentina). Os autores isolaram e identificaram o HVB-1 como causador de efeito citopático (ECP) em sete (17,5%) amostras. Outras 17 evidenciaram ECP mas não puderam ser identificadas

como HVB-1. WEIBLEN et al. (1991) descreveram um surto agudo de balanopostite por HVB-1 em touros de uma central brasileira de sêmen sendo o vírus isolado de "swabs" prepuciais de nove das 11 amostras estudadas. Isolou-se o vírus do sêmen de um dos touros 13 dias antes da manifestação dos sinais clínicos. Estudos sorológicos de OISCHORT et al. (1993) em uma central de sêmen holandesa na qual nenhum sinal clínico de IBR havia sido observado, revelaram que pelo menos 75 touros de um total de 116 examinados apresentavam infecção subclínica pelo HVB-1 sendo o vírus isolado de 43 amostras de sêmen destes animais. Os autores verificaram eliminação intermitente do vírus no sêmen e relação direta entre aumento no título de anticorpos neutralizantes para o HVB-1 e seu isolamento no sêmen.

AFSHAR& EAGLESOME (1990) recomendam como práticas na tentativa de se evitar a contaminação do HVB-1 em sêmen coletado de touros soropositivos, somente coletar sêmen de animais sem sintomas clínicos de IBR; testar número representativo de amostras de cada dia de coleta para HVB-1; liberar o sêmen congelado para inseminação somente após a confirmação do estado negativo e, principalmente, tentar estabelecer um plantel livre de anticorpos para IBR. SCHULTZ et al. (1976) recomendam não coletar sêmen de touros com sintomas respiratórios ou genitais de IBR, não tratar animais soropositivos com corticóides e mantê-los em situações de baixo estresse. SHEFFY et al.(1973) afirmam que todo animal soropositivo deve ser considerado suspeito de infecção latente e susceptível de apresentar excreção espontânea de vírus no sêmen. Recomendam como medidas de controle nas centrais de sêmen o recrutamento de touros soronegativos sempre que possível; manutenção de touros soropositivos sob condições livres de estresse; cuidadosa observação clínica para sinais de recrudescência e teste das coletas de sêmen suspeitas de contaminação para o HVB-1. KUPFERSCHIMIED et al. (1986) recomendam novo exame sorológico para touros exportadores de sêmen quatro a seis semanas após a coleta, e antes da comercialização do sêmen.

MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CENTRAL DE SÊMEN

Foram utilizados 61 touros de uma central brasileira de sêmen bovino cuja finalidade é a comercialização de sêmen no país e exportação, e que mantém permanentemente em coleta touros de raças zebuínas e taurinas. Foi escolhida esta central pela importância na reprodução bovina, visto que sua participação atinge 30 a 40% do comércio de sêmen nacional e até 50% daquele comercializado no Estado em que está instalada. Os animais têm o sêmen coletado três vezes por semana e contam com assistência veterinária regular, sendo que a vacinação anti-HVB-1 não é adotada.

3.2 AMOSTRAS DE SÊMEN E DE SORO

Dos 61 touros, 21 foram estudados de forma singular através do monitoramento de apenas uma coleta de sêmen e soro (grupo A). O material, composto de 21 amostras de sêmen e 21 amostras de soro, foi recebido em outubro de 1993. Os outros 40 touros (grupo B), foram estudados de forma pareada por ocasião de duas coletas de soro e sêmen intervaladas entre si por 60 dias (grupo B). A primeira remessa de 40 amostras de sêmen e de soro desses animais foi recebida em outubro de 1993 e a segunda remessa também de 40 amostras de sêmen e soro dos mesmos animais, em dezembro de 1993, totalizando 80 amostras de sêmen e 80 de soro. A soma dos grupos A e B totalizou 101 amostras de sêmen e 101 amostras de soro provenientes dos 61 touros estudados.

As amostras de sêmen foram processadas e envasadas na própria central conforme procedimentos padrões e imediatamente remetidas em caixas refrigeradas ao laboratório de Virologia do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG, onde foram estocadas a -70°C até o momento do uso.

O sangue foi coletado por punção venojugular sendo os soros enviados sob refrigeração. No laboratório foram inativados a 56°C por 30 minutos e estocados a -20°C até o momento do uso. Das 101 amostras de soro recebidas, nove apresentavam hemólise intensa impossibilitando a realização de exames.

3.3 LINHAGEM CELULAR E MEIOS DE CULTURA

Usou-se a linhagem contínua de células renais de bovino (Madin & Darby Bovine Kidney / MDBK) cultivadas em meio de crescimento Minimum Essential Medium (MEM) adicionado de penicilina, estreptomicina e fungizona. O meio MEM foi suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) inativado a 56°C por uma hora e livre de vírus e anticorpos para BVD e IBR. O meio de manutenção foi o mesmo, exceto pela suplementação com apenas 2% de SFB.

3.4 SORONEUTRALIZAÇÃO (SN)

A pesquisa de anticorpos específicos anti-IBR no soro dos touros foi efetuada em microplacas de 96 poços em quadruplicata. Distribuiu-se 25 μl do diluente MEM por toda placa. Em seguida, 25 μl de cada soro foram adicionados à primeira e segunda fileiras da placa, sendo a primeira a fileira de controle de soro e a segunda fileira usada para diluições duplas seriadas. Logo após, 25 μl de vírus padrão em 200 doses efetivas/50 (200 DE50) por 25 μl foram adicionados em toda placa, exceto nas fileiras correspondentes aos controles de soro, células e meio. Após um período de adsorção de

uma hora a 37°C, 25 µl de células MDBK na concentração de 6×10^5 células/ml foram adicionados em cada poço da placa que retornava à estufa para ser lida ao microscópio após 72 horas. O título foi calculado como a maior diluição na qual se inibia o efeito citopático (ECP) em 50% dos cultivos celulares. Amostras de soro com títulos iguais ou maiores que 1:4 foram consideradas positivas, possuindo anticorpos específicos anti-IBR em níveis detectáveis pelo teste de SN. Um aumento no título de anticorpos maior ou igual a quatro unidades de logaritmo base 2 foi considerado significativo na sorologia pareada.

Utilizou-se soros específicos anti-vírus da IBR e da BVD produzidos em coelhos e caprinos da EV da UFMG segundo técnica descrita por HORWITS & SCHARFF (1969). A amostra LA* do HVB-1 foi usada como antígeno de referência.

3.5 ISOLAMENTO

Para as tentativas de isolamento de vírus nas amostras de sêmen foram utilizadas microplacas de 24 poços com monocamada de células MDBK previamente estabelecidas e cultivadas em meio MEM de crescimento. Os monoextratos celulares, cultivados previamente em frascos Roux, foram lavados com salina Hank's e banhados em solução de tripsina-versene (STV), preparada com tripsina** a 0,5 % e EDTA- ácido etileno diamino tetracético*** até o desprendimento total da camada celular.

A suspensão obtida foi diluída na concentração de 2×10^5 células/ml em meio de crescimento e distribuída nas microplacas de 24 poços no volume de 1,0 ml por poço.

* Cedida pela Universidade de Davis, Califórnia

** DIFCO Laboratories, Grand Island, New York (USA)

*** REAGEN Quimibrás Ind. Quim. S/A, Rio de Janeiro, RJ
(Brasil)

As placas foram mantidas em estufa a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂ e utilizadas quando apresentavam acima de 90% de confluência celular, geralmente após 72 horas. A monocamada celular foi submetida a um processo de dupla lavagem com salina de Hank após o que inoculou-se 0,1 ml de amostra utilizando-se dois poços por amostra. Após um período de adsorção de uma hora a 37°C em estufa com 5% de CO₂, adicionou-se 1,0 ml de meio de manutenção à cada poço das placas. Em cada placa foram utilizados três poços para os controles negativos que circundavam o poço no qual se inoculava o vírus padrão (controle positivo), totalizando 10 amostras de sêmen estudadas em duplicata e quatro controles por microplaca de 24 poços.

A presença de ECP característico com alterações morfológicas sugestivas de isolamento viral foi investigada ao microscópio por cinco dias consecutivos, sendo consideradas negativas amostras em que não se observasse ECP após três passagens. Amostras que apresentavam ECP sofriam remoção mecânica da camada celular restante e coleta de todo conteúdo do poço em capela de fluxo laminar, sendo o material aliquoteado e estocado a -70°C até serem submetidas aos processos de titulação e identificação.

3.6 TITULAÇÃO

Amostras de sêmen que apresentaram ECP foram tituladas submetendo-se cada amostra a diluições decimais seriadas em placas de 24 poços até a diluição de 10⁻⁹ e inoculando-se quatro poços de uma placa de 96 poços contendo monocamada de cultivo de células MDBK com cada diluição. As placas foram mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ até o momento da leitura ao microscópio, após 72 horas. Os títulos foram calculados pelo método de REED & MUENCH (1938), sendo cada amostra diluída ao título de 200 DE50/25 µl no momento da identificação.



3.7 IDENTIFICAÇÃO

Amostras que apresentaram ECP foram submetidas ao teste de vírusneutralização em microplacas de 96 poços para identificação do agente frente a soro padrão específico diluído a 1/16, após serem previamente tituladas e diluídas até o título de 200 DE50/25 μ l.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 RESULTADOS GLOBAIS

Foram encontrados 37 touros (60,7%) soropositivos para o HVB-1 dentre os 61 estudados de forma pareada ou singular (Tabela 1), aparecendo como um resultado isolado, já que não foi encontrada literatura específica sobre levantamentos sorológicos mais amplos em animais de centrais de sêmen brasileiras. Os resultados foram considerados altos, demonstrando que o HVB-1 se encontra difundido na central de sêmen estudada, à semelhança do que ocorre em vários outros rebanhos bovinos do País, tendo sido possível, inclusive, acompanhar um caso natural de soroconversão. Autores que pesquisaram índices sorológicos de anticorpos anti HVB-1 em rebanhos bovinos brasileiros entre 1962/63 e 1989 relataram percentuais de 33% a 85,7% de animais soropositivos sendo os estudos realizados, contudo, em bovinos de ambos sexos e de idades variadas, sem direcionamento para touros alojados em centrais de sêmen (ANUNCIÇÃO, 1989; CASTRO, 1988; GALVÃO et al., 1962/63; GALVÃO, 1984; MUELLER et al., 1981; RAVAZZOLO et al., 1989; WIZIGMANN et al., 1972).

Dos três touros estudados de forma pareada que apresentaram sorologia positiva em apenas uma coleta (touros nº 03, 08 e 10), somente um apresentou aumento no título de anticorpos maior que quatro unidades de logaritmo (base 2), que foi o valor mínimo de aumento considerado significativo. O soro deste animal (touro nº 08) apresentou título inicial de 1:2 chegando a 1:64 na segunda coleta (Tabela 3). Uma vez que nenhum touro havia sido vacinado contra a doença, os anticorpos detectados

foram atribuídos à infecção natural ou quebra de estado de latência por motivos ignorados.

A detecção de 19 (31,1%) touros com sêmen contaminado pelo HVB-1 dentre os 61 examinados (Tabela 1) aparece como um índice surpreendentemente alto, uma vez que as amostras foram obtidas sem que existisse suspeita prévia de presença do vírus, ou seja, nenhum sinal sugestivo de IBR fora observado nos touros amostrados. WEIBLEN et al.(1991) descreveram isolamentos de HVB-1 em sêmen e "swabs" prepuciais de touros de uma central brasileira, mas os animais vieram a apresentar sintomas clínicos em um período de 13 dias. Uma vez que a central em estudo é considerada uma das melhores do Brasil, acreditamos que este não seja um problema isolado, mas presente talvez até em níveis mais críticos nas outras centrais do País

Os resultados obtidos assemelham-se aos apresentados por GÓLAN et al.(1990) que isolaram e identificaram o HVB-1 como causador de ECP em sete (17,5%) amostras de sêmen dentre 40 examinadas provenientes de touros de centrais de sêmen localizadas na província de Santa Fé (Argentina). O potencial desses reprodutores como difusores da enfermidade agrava-se à medida em que milhares de vacas são inseminadas em todo o país com sêmen proveniente de centrais de sêmen, pois, apesar da tecnificação, do incremento produtivo e do uso de antibióticos no sêmen congelado haverem controlado a transmissão de agentes bacterianos via sêmen (*Campylobacter*, *Leptospiras*, etc.), vê-se, hoje, ressaltado o papel do HVB-1 e outros vírus como agentes interferentes na reprodução animal, principalmente se transmitidos através da inseminação artificial (GÓLAN et al., 1990).

O fato de não haver perda no título do vírus da IBR em sêmen bovino estocado por mais de um ano em nitrogênio líquido agrava ainda mais a situação do sêmen contaminado, uma vez que o armazenamento e o processamento contribuem para a conservação

do agente e sua transmissão em um estado infecciosamente viável (CHAPMAN et al., 1979 ; SPRADBROW ,1968).

Tabela 1. Soroneutralização e isolamento de HVB-1 nos touros da central de sêmen

	Sorologia ^a		Isolamento ^b	
	Nº de touros	%	Nº de touros	%
Positivo	37	60,7	19	31,2
Negativo	19	31,2	42	68,8
ND ^c	5	8,2	-	-
Total	61	100,0	61	100,0

a. Frente a 200 DE50/25µl, em células MDBK

b .ECP em células MDBK em 72 horas pós-infecção

c. ND = não determinado

4.2 SOROLOGIA ESTRATIFICADA

Considerando-se as amostras de sêmen e soro coletadas dos 61 touros estratificadas de acordo com a forma de coleta, um total de 101 amostras foi analisado, sendo 21 do grupo A (singular) e 80 do grupo B (pareada).

Dos 21 touros estudados de forma singular (grupo A), 12 (57,2%) apresentaram sorologia positiva, quatro (19%) eram soronegativos e cinco (23,8%) não tiveram a sorologia determinada (Tabela 2).

Das 80 amostras de soro correspondentes aos 40 touros estudados de forma pareada (grupo B), 44 (55%) apresentaram anticorpos específicos anti-HVB-1, não havendo diferença significativa ($p < 0,05$) entre uma ou duas coletas quando os dados foram submetidos ao teste do X^2 (Tabela 2).

Tabela 2. Resultados sorológicos dos grupos A e B para HVB-1, por soroneutralização.

Sorologia	GRUPO A Nº de soros (%)	GRUPO B Nº de soros (%)	TOTAL
Positiva *	12 (57,2)	44 (55,0)	56
Negativa **	4 (19,0)	32 (40,0)	36
ND	5 (23,8)	4 (5,0)	9
TOTAL	21(100,0)	80 (100,0)	101

(*) Títulos iguais ou superiores a 1:4

(**) Títulos menores que 1:4

ND = Não Determinada

O estudo pareado das amostras de soro revelou 14 touros (35,0%) apresentando sorologia negativa para IBR nas duas coletas, três animais (7,5%) com anticorpos específicos em uma das coletas e 19 (47,5%) apresentando sorologia positiva nas duas amostras de soro estudadas. Soros de quatro (10,0%) touros não puderam ser estudados de forma pareada, pois o material correspondente à primeira coleta chegou ao laboratório apresentando hemólise intensa o que impossibilitou a realização dos exames. Desses quatro animais, três apresentaram sorologia positiva no material correspondente à segunda coleta (Tabela 3).

Tabela 3. Títulos sorológicos e isolamento de HVB-1 em sêmen dos touros da central de sêmen

Touro	Primeira remessa		Segunda remessa	
	Sorologia *	Isolamento	Sorologia	Isolamento
1	1:64	-	1:32	-
2	1:8	-	1:4	+
3	1:4	+	1:2	-
4	1:8	-	1:4	-
5	<1:2	-	<1:2	-
6	<1:2	+	1:2	-
7	1:32	-	1:16	-
8	1:2	-	1:64	+
9	<1:2	-	1:2	+
10	<1:2	+	1:4	-
11	<1:2	-	<1:2	-
12	1:32	-	1:16	-
13	1:32	-	1:16	-
14	1:32	-	1:16	-
15	<1:2	-	1:2	-
16	1:8	-	1:16	-
17	1:2	-	1:2	-
18	1:32	+	1:16	+
19	1:32	-	1:16	-
20	1:32	+	1:16	-
21	1:16	-	1:8	-
22	ND **	-	1:16	+
23	1:64	-	1:64	-
24	ND	+	1:32	-
25	1:2	+	<1:2	-
26	<1:2	-	<1:2	-
27	<1:2	-	1:2	-
28	1:32	-	1:16	-
29	1:32	-	1:16	-
30	1:32	-	1:16	-
31	ND	-	1:8	-
32	1:2	-	<1:2	-
33	<1:2	+	<1:2	-
34	ND	-	<1:2	-
35	1:2	-	1:2	-
36	1:2	-	1:2	-
37	1:32	-	1:16	+
38	1:8	+	1:16	-
39	1:8	-	1:8	-
40	1:2	-	1:2	+

(*) Foram considerados positivos títulos sorológicos iguais ou superiores a 1:4. (**) ND = não determinada.

Tabela 3. Títulos sorológicos e isolamento de HVB-1 em sêmen dos touros da central de sêmen (continuação)

Touro	Primeira remessa		Segunda remessa	
	Sorologia *	Isolamento	Sorologia	Isolamento
41	1:8	-	NR***	NR
42	1:4	-	NR	NR
43	1:64	-	NR	NR
44	1:16	+	NR	NR
45	<1:2	-	NR	NR
46	<1:2	-	NR	NR
47	1:16	-	NR	NR
48	ND	-	NR	NR
49	ND	-	NR	NR
50	1:2	+	NR	NR
51	1:32	-	NR	NR
52	ND	-	NR	NR
53	1:32	-	NR	NR
54	1:8	-	NR	NR
55	ND	+	NR	NR
56	ND	-	NR	NR
57	1:2	+	NR	NR
58	1:32	-	NR	NR
59	1:32	-	NR	NR
60	1:8	-	NR	NR
61	1:32	-	NR	NR

(*) Foram considerados positivos títulos sorológicos iguais ou superiores a 1:4. (**) ND = não determinada. (***) NR = não realizado

4.3. ISOLAMENTO ESTRATIFICADO DE HVB-1 NO SÊMEN

Dos 21 touros estudados de forma singular (grupo A) quatro (19,0%) apresentaram HVB-1 no sêmen (Tabela 4).

Dentre as 80 amostras de sêmen provenientes dos 40 touros do grupo B, 16 (20,0%) apresentaram ECP sendo o HVB-1 detectado em todas elas. As demais 64 (80%) amostras de sêmen desse grupo não apresentaram o vírus (Tabela 4).

Tabela 4. Isolamento de HVB-1 em sêmen de touros dos grupos A e B

Isolamento	GRUPO A Nº amostras de sêmen (%)	GRUPO B Nº amostras de sêmen (%)
Positivos	4 (19,0)	16 (20,0)
Negativos	17 (81,0)	64 (80,0)
TOTAL	21 (100,0)	80 (100,0)

No estudo pareado, o ECP foi detectado em apenas uma das duas coletas de sêmen de 14 touros e nas duas coletas de um touro (touro nº 18). O sêmen dos demais 25 touros estudados de forma pareada não revelou ECP ao cultivo celular (Tabela 3). O fato de o HVB-1 ter sido isolado em apenas uma coleta, estando o material da outra amostragem livre do vírus deveu-se provavelmente à característica dos herpesvírus de estabelecer quadros de latência no hospedeiro, podendo ser eliminados nas secreções de forma intermitente (FIELDS & KNIPE, 1990). Vários autores detectaram excreção intermitente do HVB-1 em secreções de bovinos (MILLER & VAN DER MAATEN, 1987; SNOWDON, 1965) e infecções latentes em cães, suínos, aves, camundongos e humanos quando infectados por herpesvírus específicos (HUGHES et al., 1987; BENFIELD & ADLDINGER, 1984; OKUDA et al., 1993; McLENNAN & DARBY, 1980; STEVENS, 1989; BAGUST, 1986; MENGELING, 1989). SNOWDON (1965) ressalta a possibilidade de animais aparentemente saudáveis, inclusive os de centrais de sêmen, serem portadores e potencialmente capazes de voltar a eliminar o vírus pelas secreções.

4.4 RELAÇÃO ENTRE SOROLOGIA E ISOLAMENTO VIRAL

Das 56 amostras de soro positivas, 10 apresentaram o HVB-1 no sêmen da coleta correspondente. Dentre os 36 soronegativos, oito touros tinham o HVB-1 no sêmen e dentre os nove com sorologia não determinada, dois tinham o sêmen positivo para o HVB-1 na coleta correspondente (Tabela 5).

Tabela 5. Relação entre a sorologia e isolamento de HVB-1 nos touros da Central de sêmen

Sorologia ¹	Isolamento ²		Total
	Positivo	Negativo	
Positiva ³	10	46	56
Negativa ⁴	8	28	36
ND ⁵	2	7	9
TOTAL	20	81	101

1. Frente a 200 DE50/25µl
2. ECP em células MDBK 72 horas após inoculação
3. Títulos iguais ou superiores a 1:4
4. Títulos menores que 1:4
5. ND = Não Determinada

O touro nº 08 que havia apresentado sorologia negativa e sêmen livre de HVB-1 no material correspondente à primeira coleta, apresentou anticorpos específicos no soro e o vírus da IBR no sêmen referentes à segunda coleta demonstrando que houve soroconversão e excreção do vírus no sêmen durante o período do estudo (Tabela 3). Este animal poderia ser portador de infecção latente no qual o vírus foi reativado, ou simplesmente se tratar de uma infecção primária com produção de anticorpos e eliminação do agente no sêmen. A hipótese da soroconversão ser uma resposta a

vacinações está, como já citado, descartada. Fato semelhante foi observado em vários touros com infecção subclínica pelo HVB-1 alojados em uma central de sêmen holandesa (OISCHORT et al., 1993). Os autores observaram relação direta entre aumento no título de anticorpos neutralizantes para o vírus da IBR e seu isolamento no sêmen nesses animais.

Os isolamentos de HVB-1 em sêmen tanto de touros soropositivos quanto de touros soronegativos obtidos nesse trabalho foram também relatados por diversos autores que verificaram não haver correlação obrigatória entre a detecção de anticorpos específicos circulantes e a presença de infecção pelo HVB-1. PARSONSON & SNOWDON (1975) verificaram que alguns animais infectados artificialmente não produziram anticorpos no período de 43 dias, apesar de o isolamento do HVB-1 haver sido realizado. Este fato pode ser explicado pelo uso de testes laboratoriais pouco sensíveis, pelo desenvolvimento de imunidade celular sem resposta humoral mensurável ou pela realização de exames sorológicos em animais com infecção ativa e excretando o vírus antes do desenvolvimento de anticorpos (SCHULTZ et al., 1976 ; KUPFERSCHIMIED et al., 1986).

Torna-se difícil apontar entre as justificativas anteriores a que melhor explicaria os resultados encontrados em nosso trabalho. Porém, como as técnicas utilizadas são consideradas satisfatórias quanto à especificidade e sensibilidade, consideramos pequena a possibilidade de falhas técnicas terem interferido nos resultados. A predominância da imunidade celular sobre a humoral e a possível coleta de material em período anterior à formação de anticorpos aparecem, portanto, como as hipóteses mais imediatas.

Apesar da ampla disseminação do vírus da IBR no Brasil, os produtores rurais de maneira geral tendem a conviver com o problema, uma vez que os prejuízos advindos da infecção tornam-se de importância menor quando comparados com aspectos básicos como a desnutrição e parasitismos em que se encontra grande parte

do rebanho bovino nacional. A infecção, porém, torna-se mais crítica em touros reprodutores de centrais de sêmen, uma vez que o sêmen desses animais é comercializado para diversas propriedades, em diferentes regiões do País, que utilizam programas de inseminação artificial e que por terem controladas as condições de alimentação e parasitismos, ressaltam a importância de infecções virais. Os prejuízos pelo uso de sêmen contaminado pelo HVB-1 aparecem na forma de introdução do agente nos remanescentes rebanhos livres através de vacas inseminadas, com implicações gerais como doença respiratória, podendo estar acompanhada de queda brusca da produção de leite, vulvovaginite, balanopostite e encefalite (ELAZHARY et al., 1980; BARENFUS et al., 1963; LUKAS et al., 1963; KENDRICK et al., 1958; STUDDERT et al., 1964). Especificamente, o uso de sêmen contaminado pelo HVB-1, na inseminação artificial, pode levar a problemas reprodutivos com diminuição dos índices de fecundação, abortos em todos os estágios da gestação e mortalidade de neonatos (KENDRICK & Mc ENTEE, 1967; WHITE & SNOWDON, 1973; PARSONSON & SNOWDON, 1975; MILLER & VAN DER MAATEN, 1984; KUPFERSCHIMIED et al., 1986; CHARLES & FURLONG, 1992), sendo que tais problemas podem ser encontrados tanto em vacas soronegativas quanto em soropositivas (Parsonson apud SCHULTZ et al., 1976).

Uma vez que foi demonstrado que nem todas coletas de sêmen de um animal estão necessariamente contaminadas, somente o exame individual das partidas coletadas pode assegurar a comercialização de sêmen livre de HVB-1 mesmo quando obtido de touros contaminados (AFSHAR & EAGLESOME, 1990; KUPFERSCHIMIED et al., 1986; SHEFFY et al., 1973). O exame de apenas uma paleta por ejaculado obtido seria suficiente para a prevenção da disseminação do HVB-1 por essa via, o que implicaria em custos suportáveis pelos proprietários se considerarmos que cada ejaculado dá origem a dezenas de paletas após a diluição. O sêmen negativo para HVB-1 seria comercializado como material genético de qualidade sanitária superior, fato que deveria ser,

inclusive, abordado em estratégias de "marketing", chamando para si a preferência do consumidor.

Outras recomendações relacionadas ao manejo de touros soropositivos em centrais incluem a coleta de sêmen somente quando esses animais não apresentarem sinais clínicos de IBR (SCHULTZ et al., 1976 ; SHEFFY et al., 1973), o que não assegura que o sêmen não esteja contaminado pelo HVB-1 uma vez que os touros utilizados no presente experimento também não apresentavam nenhum sinal clínico da infecção. Evitar o uso de corticóides e manter os animais em situações de baixo estresse são medidas de alcance limitado e difíceis de serem absorvidas na rotina de várias centrais de sêmen, principalmente quando consideramos que até mesmo a coleta de sêmen pode ser um fator estressante aos touros.

4.5 TÉCNICAS DE SORONEUTRALIZAÇÃO E ISOLAMENTO VIRAL

Na fase inicial desse trabalho, que compreendeu o pré-experimento, utilizou-se os tubos Leighton para o cultivo celular. Contudo, logo tornou-se evidente a impossibilidade do uso de tal material quando fosse examinado um número maior de amostras (ROCHA et al., 1993). A utilização de cultivo celular crescido em microplacas de 24 poços para o isolamento viral demonstrou praticidade superior evidente quando comparada com o uso de tubos Leighton, conforme também havia sido relatado por DREW et al. (1987) sendo, por isso, adotada na parte principal do experimento. Diversos autores observaram a presença no sêmen fresco de propriedades citotóxicas e deletérias ao HVB-1 e que tais efeitos são minimizados durante seu processamento devido à diluição e adição de gema de ovo, que normalmente são realizadas nas centrais de sêmen (DARCEL & COLTER, 1976; DREW et al., 1987; LOWEN & DARCEL, 1985; KAHR, 1980). Início de efeito citotóxico devido às substâncias presentes no fluido seminal



foi observado em algumas amostras mas não a ponto de interferir na leitura dos resultados, uma vez que a camada celular ou se manteve íntegra ou demonstrou ECP característico e diferenciado daquele observado devido a efeito citotóxico.

O sêmen destinado para isolamento viral pode ser remetido em caixas refrigeradas dispensando-se o uso de botijão de nitrogênio já que a infectividade do vírus no sêmen permanece conservada por até sete dias em temperatura de 4°C e por cinco dias em temperatura ambiente (DREW et al., 1987). Isto facilitou em muito a remessa do material por parte da Central, sendo que o mesmo procedimento poderia ser adotado por outros produtores interessados em realizar os exames no sêmen de seus reprodutores.

Apesar de aceita mundialmente como a técnica de escolha para pesquisa de HVB-1 em material suspeito, o isolamento em cultivo celular é caro, trabalhoso e demorado. Na Escola de Veterinária da UFMG o isolamento viral de um único material custa à comunidade algo em torno de US\$ 70,00 e a soroneutralização US\$ 20,00, necessitando-se de um tempo mínimo de 30 dias para a obtenção dos resultados. O elevado custo associado ao longo tempo de espera vêm desestimulando a prática rotineira desses exames como medida preventiva, sendo adotados, de maneira geral, quando os problemas reprodutivos do rebanho se encontram em fase adiantada e as causas bacterianas já foram descartadas. Recentes tentativas de desenvolver técnicas mais sensíveis, específicas e rápidas para a detecção do HVB-1 no sêmen como a imunoeletromicroscopia ou o PCR (AFSHAR & EAGLESOME, 1990; BRUNNER et al., 1988) devem ser estimuladas para que aspectos virais possam ser abordados em fases iniciais, possibilitando a adoção de medidas em tempo hábil.

CONCLUSÕES

Pelo menos uma coleta de sêmen de alguns touros da Central de sêmen em estudo estava contaminada pelo HVB-1, estando a maioria dos animais da central infectada pelo HVB-1, possuindo títulos de anticorpos anti-HVB-1 detectáveis pela SN. O estudo sorológico dos touros mostrou-se inadequado como indicador de ausência ou presença do HVB-1 no sêmen desses animais, não devendo a sorologia ser utilizada para tal fim. Considerando-se os animais com isolamento positivo de HVB-1 entre os touros amostrados de forma pareada, observa-se que, na maioria das vezes, o isolamento foi possível em somente uma das coletas, indicando a intermitência da replicação viral. O exame individual das partidas de sêmen a serem comercializadas para a presença do HVB-1, mostra-se como um método de controle objetivo para se evitar a disseminação do vírus via sêmen.

O isolamento em cultivo celular e a identificação por neutralização específica são técnicas mundialmente aceitas e podem ser executadas em laboratórios razoavelmente equipados sendo, contudo, trabalhosas, demoradas e excessivamente caras. O uso de microplacas de 24 poços facilitou sensivelmente o trabalho de isolamento, em comparação aos tubos Leighton. Métodos para detecção do HVB-1 no sêmen bovino de forma mais eficiente precisam ser desenvolvidos a custos acessíveis, não só às grandes centrais de inseminação como aos centros de coleta e congelamento de sêmen bovino para uso doméstico.

SUMMARY

Infection by BHV-1 in bulls of a Brazilian insemination centre was investigated by viral isolation from semen in cell culture (MDBK) and serum neutralization tests. Paired semen and serum samples from 40 bulls (60-day interval) and a single serum and semen samples from 21 bulls were examined. Specific antibody was detected in 37 (60,7%) bulls. BHV-1 was detected in 20 (19,8%) semen samples. Correlation among serologic results and virus isolation was not found. Techniques used showed be costly, labourious and time consuming, although sensitive enough to enable the isolation of HVB-1 from a great number of bulls. Alternative methods must be developed in order to overcome the drawbacks related to time and cost. The examination of all semen samples for HVB-1 prior to commercialization is strongly indicated.

Key words: bovine; bovine herpesvirus-1; semen.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFSHAR, A , EAGLESOME, M.D. Viruses associated with bovine semen. Veterinary Bulletin, v. 60, n. 2, p. 93-109, 1990.
- ALICE, F.J. Isolamento do vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) no Brasil. Revista Brasileira de Biologia, v. 38, n. 4, p. 919-920, 1978.
- ANUNCIAÇÃO, A. V. M., MOREIRA, E. C., LEITE, R.C., et al. Presença de anticorpos para o herpesvírus bovino 1 (HVB-1) em bovinos nos estados de Minas Gerais, Goiás e Rio de Janeiro, através da prova de hemoaglutinação passiva. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 41, n. 5, p. 433-441, 1989.
- BAGUST, T. J. Laryngotracheitis (gallid-1) herpesvirus infection in the chicken. Avian Pathology, v. 15, p. 581-595, 1986.
- BRUNNER, D., ENGELS, M., SCHWYZER, M., et al. A comparison of three techniques for detection of bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) in naturally and experimentally contaminated bovine semen. Zuchtygiene, v. 23, p. 1-9, 1988.
- BARENFUS, M., DELLI-QUADRIM, C.A., Mc INTYRE, R.N., et al. Isolation of infectious bovine rhinotracheitis virus from calves with meningoencephalitis. Journal of American Veterinary Medical Association, v. 143, p. 725-728, 1963.

- BENFIELD, D. A. , ADLDINGER. Latent herpesvirus infection of testes and spinal ganglia of turkeys with semen abnormalities. Archives of Virology , v. 82, p. 195-209, 1984.
- CASTRO, R. S. Desempenho reprodutivo até 60 dias de gestação em doadoras de embriões bovinos, frente à infecção por diarréia bovina a vírus, herpesvírus bovino tipo 1, leucose bovina e língua azul, em Minas Gerais. Belo Horizonte: UFMG-Escola de Veterinária, 1988. 93p. Dissertação (Mestrado).
- CHAPMAN, M. S., LUCAS, M. H., HEBERT, C. N., et al. Survival of infectious bovine rhinotracheitis virus in stored bovine semen. Veterinary Sciences Communications. v. 3, p. 137-139, 1979.
- CHARLES, T. P., FURLONG, J. Doenças dos bovinos de leite adultos. Coronel Pacheco: EMBRAPA-CNPGL, 1992. 174p.
- DARCEL, CE le Q., COULTER, G.H. IBR virus neutralizing substance in bull seminal fluid and its removal prior to attempts at virus isolation from semen. Canadian Veterinary Journal. v. 17, p. 318-320, 1976.
- DREW, T. W., HEWITT-TAYLOR, C., WATSON, L., et al. Effect of storage conditions and culture technique on the isolation of infectious bovine rhinotracheitis virus from bovine semen. Veterinary Record, v. 121, p. 547-548, 1987.
- ELAZHARY, M. A. S. Y., LAMOTHE, P., SILIM, A., et al. Bovine Herpesvirus type 1 in the sperm of a bull from a herd with fertility problems. Canadian Veterinary Journal , v. 21, n. 12, p. 336-339, 1980.
- FIELDS, B. N., KNIPE, D. M. Virology . New York: Raven Press, 1992, 2 v.

- GALVÃO, C. L., DÓRIA, J. D., ALICE, F.J. Anticorpos neutralizantes para o vírus da Rinotraqueíte infecciosa dos bovinos em bovinos do Brasil. Boletim do Instituto Biológico da Bahia , v. 6, n.1, p. 15-25, 1962/63.
- GALVÃO, C. L. Diagnóstico da infecção genital do herpesvírus bovino 1 (HVB-1) pelos métodos de isolamento e imunofluorescência direta. Belo Horizonte: UFMG-Escola de Veterinária, 1984. Dissertação (Mestrado).
- GÓLAN, A. E., SCORTTI, M., OCCHI, H., et al. Detection of bovine herpesvirus type 1 in frozen semen and aborted fetuses in Santa Fe Province, Argentina. Avances En Ciencias Veterinarias . v. 5, n. 2, p. 142-145, 1990.
- HORWITS, M.S., SCHARFF, M.D. The production of antiserum against viral antigens. In: HABEL, K., SALZMAN, N.P. (ed). Fundamental Techniques in Virology. New York: Academic Press, 1969. p. 253-262.
- HUGHES, C. S., JONES, R. C. , GASKELL, R. M.; et al. Demonstration in live chickens of the carrier state in infectious laryngotracheitis. Research in Veterinary Science , v. 42, p. 407-410, 1987.
- KAHRS, R. F., GIBBS, E. P. J., LARSEN, R. E. The search for viruses in bovine semen: a review. Theriogenology , v. 14, p. 151-165, 1980.
- KENDRICK, J. W., GILLESPIE, J. H., McENTEE, K. Infectious pustular vulvovaginitis of cattle. Cornell Veterinarian. v. 48, p. 458-495, 1958.
- KENDRICK, J. W. , McENTEE, K. The effects of artificial insemination with semen contaminated with IBR-IPV virus. Cornell Veterinarian . v. 57, n. 1, p.3-11, 1967.

- KUPFERSCHIMIED, H. U., KIHM, U., BACHMAN, P., et al. Transmission of IBR/IPV virus in bovine semen: a case report. Theriogenology, v. 25, n. 3, 1986.
- LOEWEN, K. G., DARCEL, C. le Q. A comparison of two methods for the isolation of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) from extended bovine semen. Theriogenology, v.23, p. 935-943, 1985.
- LUKAS, G. N., WEIDENBACH, S. J., PALMER, K. G., et al. A bovine fetal viral isolate neutralized by IBR immune serum as a cause of abortion in cattle. Proceedings of United States Livestock Sanitary Association, v.67, p. 108-128, 1963
- McLENNAN, J. L., DARBY, G. Herpes simplex virus latency: the cellular location of virus in dorsal root ganglia and the fate of the infected cell following virus action. Journal of General Virology, v. 51, p. 233-243, 1980.
- MENGELING, W. L. Latent infection and subsequent reactivation of pseudorabies virus in swine exposed to pseudorabies virus while nursing immune dams. American Journal of Veterinary Research, v. 50, n. 10, p. 1659-1663, 1989.
- MILLER, N. J. Infectious necrotic rhinotracheitis of cattle. Journal of American Veterinary Medical Association, v. 126, p. 463-467, 1955.
- MILLER, J. M., VAN DER MAATEN, M. J. Reproduction tract lesions in heifers after intrauterine inoculation with infectious bovine rhinotracheitis virus. American Journal of Veterinary Research, v. 45, p. 790-794, 1984.
- MILLER, J. M., VAN DER MAATEN, M. J. Early embryonic death in heifers after inoculation with bovine herpesvirus-1 and

reactivation of latent virus in reproductive tissues. American Journal Veterinary research , v. 48, n. 11, p. 1555-1558, 1987.

MUELLER, S. B. K., IKUNO, A. A., CAMPOS, M. T. G. R., et al.
Isolamento e identificação do vírus da rinotraqueíte infecciosa dos bovinos de um rim de feto de bovino (IPV/IBR). Arquivos do Instituto Biológico, v. 45, n. 3, p. 187-190, 1978.

MUELLER, S. B. K., IKUNO, A. A., CAMPOS, M. T. G. R., et al.
Ocorrência simultânea de alterações respiratórias e genitais associada à rinotraqueíte infecciosa dos bovinos/vulvovaginite pustular infecciosa (IBR/IPV) em um rebanho no estado de São Paulo. Biológico , v. 45, n. 3-4, p. 55-60, 1979.

MUELLER, S. B. K., IKUNO, A. A., MACHADO, J. S.; et al.
Prevalência de anticorpos contra o vírus da rinotraqueíte infecciosa dos bovinos/ vulvovaginite pustular infecciosa (IBR/IPV) em bovinos do estado de São Paulo. Biológico , v. 47, n. 2, p. 55-59, 1981.

OISCHORT, J. T., STRAVER, P. J., LIESHOUT, J. A. M., et al.
A sub-clinical infection of bulls with bovine herpesvirus type 1 at an artificial insemination centre. Veterinary Record , v. 132, p. 32-35, 1993.

OKUDA, Y., HASHIMOTO, A., YAMAGUCHI, T., et al.
Repeated canine herpesvirus (CHV) reactivation in dogs by an immunosuppressive drug. Cornell Veterinarian , v. 83, p. 291-302, 1993.

PARSONSON, I. M., SNOWDON, W. A. The effect of natural and artificial breeding using bulls infected with or semen contaminated with IBR virus. Australian Veterinary Journal, v. 51, p. 365-369, 1975.

- RAVAZZOLO, A. P., PIZZOL, M. P., MOOJEN, V. Evidência da presença de anticorpos para o vírus da rinotraqueíte infecciosa dos bovinos em bovinos de alguns municípios do estado do Rio Grande do Sul, Brasil 1986. Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS, v. 17, p. 89-95, 1989.
- REED, L. J., MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. American Journal Hygiene, v. 27, n.3, p. 493-497, 1938.
- RIET-CORRÊA, F., VIDOR, T., SCHILD, A. L., et al. Meningoencefalite e necrose da córtex cerebral em bovinos causadas por herpesvírus bovino-1. Pesquisa Veterinária Brasileira, v.9, n. 1-2, p. 13-16, 1989.
- ROCHA, M. A., GOUVEIA, A. M. G., LEITE, R. C. Isolation of infectious bovine rhinotracheitis virus (IBR) in semen of a bull semen centre. In: ENCONTRO DE VIROLOGIA, Porto Alegre: 1993. Programas e Resumos. Porto Alegre, Sociedade Brasileira de Virologia, 1993, p. 258.
- SCHULTZ, R. D., HALL, C. E., SHEFFY, B. E., et al. Current status of IBR/IPV virus infection in bulls. Proceedings of the United States Animal Health Association 80, p. 159-168, 1976.
- SHEFFY, B.E., KRINSKY, M. Infectious bovine herpesvirus in extended bovine semen. Proceedings of the United States Animal Health Association 77, p.131-137, 1973.
- SNOWDON, W. A. The IBR/IPV virus-reaction to infection and intermittent recovery of the virus from experimentally inoculated cattle. Australian Veterinary Journal, v. 41, p. 135-142, 1965.

- SPRADBROW, W. A. The isolation of infectious bovine rhinotracheitis virus from bovine semen. Veterinary Record , v. 83, p. 303-307, 1968.
- STEVENS, J. G. Human herpesviruses: a consideration of the latent state. Microbiological Reviews , v. 53, n. 3, p. 318-332, 1989.
- STUDDERT, M., BARKER, C. A., SAVAN, M. Infectious pustular vulvovaginitis virus infection in bulls. American Journal Veterinary Research , v. 25, p. 303-314, 1964.
- WEIBLEN, R., KREUTZ, L. C., CBARRO, T. F., et al. Balanoposthitis in bulls due to bovine herpesvirus in South Brasil. Brazilian Journal of Medicine Biological Research, v. 24, p. 773-775, 1991.
- WHITE, M. B., SNOWDON, W.A. The breeding record of cows inseminated with a batch of semen contaminated with infectious bovine rhinotracheitis virus. Australian Veterinary Journal , v. 49, p. 501-506, 1973.
- WIZIGMANN, G., VIDOR, T., RICCI, Z. M. F. Investigação sorológica sobre a incidência e ocorrência dos vírus PI-3, IBR e da diarreia a vírus/enfermidade das mucosas dos bovinos no estado do Rio Grande do Sul. Boletim do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor , v. 1, p. 52-58, 1972.