



ALPHAHERPESVÍRUS BOVINO 1 EM FETOS BOVINOS ABORTADOS

Julia Mitie Yamamora¹; Leticia Cursino **Santos**¹; Marcia Mayumi **Fusuma**²; Liria Hiromi **Okuda**³;
Claudia **Del Fava**⁴

Nº 21820

RESUMO - O abortamento bovino causa impacto econômico na bovinocultura, e pode ser causado por diversos agentes etiológicos, dentre eles o Alphaherpesvírus Bovino 1 (BoHV-1). Realizou-se o diagnóstico histopatológico e pesquisa do BoHV-1 em fetos bovinos abortados no Brasil, em amostras de conveniência do Instituto Biológico (IB). Foram necropsiados 100 fetos bovinos para colheita de órgãos e líquido tóraco/abdominal no período de janeiro de 2015 a agosto de 2020. As necropsias fetais e a análise histopatológica (órgãos fixados em formol 10% tamponado e processados pela técnica histológica de emblocagem em parafina e lâminas coradas pela hematoxilina e eosina) foram realizadas no Laboratório de Anatomia Patológica do IB. Alíquotas de órgãos refrigerados foram processadas no Laboratório de Viroses de Bovídeos do IB para o diagnóstico molecular (extração do DNA usando beads magnéticas em equipamento automatizado e analisadas por PCR em tempo real quantitativo) para BoHV-1. Nenhum feto foi positivo nos testes moleculares. A idade fetal correspondeu a 4 fetos no primeiro, 10 no segundo e 65 no terceiro trimestre de gestação, respectivamente. As porcentagens de lesões histopatológicas não purulentas nos diversos órgãos foram 29% hepatite, 15% nefrite, 12% nefrose, 19% pneumonia, 0,4% esplenomegalia, 2% inflamação da adrenal, 19% encefalite e 3% placentite. A ausência de abortamentos pelo BoHV-1 pode ser explicada pela endemicidade do BoHV-1 nos rebanhos brasileiros, associado ainda pela vacinação praticada, o que contribuiu para imunidade de rebanho. As lesões histopatológicas podem estar associadas a outros agentes causadores de abortamento bovino, devendo ser incluídos no diagnóstico diferencial.

Palavras-chaves: doenças reprodutivas, BoHV-1, diagnóstico, Estado de SP.

1Julia Mitie Yamamora, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Medicina veterinária, UAM, São Paulo-SP; ju.mitie@hotmail.com

1 Leticia Cursino dos Santos, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduanda em Medicina veterinária, UAM, São Paulo-SP;

2 Marcia Mayumi Fusuma, Bolsista FUNDEPAG: Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio, do Instituto Biológico, São Paulo-SP

3 Liria Hiromi Okuda, Colaborador, Pesquisadora do Instituto Biológico, São Paulo-SP

4 Claudia Del Fava, Orientador, Pesquisadora do Biológico de São Paulo, São Paulo-SP; claudia.fava@sp.gov.br



ABSTRACT – Bovine abortions cause economic impact on cattle farming, and can be caused by several etiological agents, among them *Bovine alphaherpesvirus 1* (BoHV-1). We carried out the histopathological diagnosis and BoHV-1 research in aborted bovine fetuses in Brazil, in convenience samples from the Instituto Biológico (IB). One hundred bovine fetuses were necropsied for organ and thoracic/abdominal fluid collection in the period from January 2015 to August 2020. Fetal necropsies and histopathological analysis (organs fixed in 10% buffered formalin and processed by the histological technique of paraffin embedding and slides stained by hematoxylin and eosin) were performed in the IB Pathology Laboratory. Aliquots of refrigerated organs were processed in the IB Bovine Virus Laboratory for molecular diagnosis (DNA extraction using magnetic beads in automated equipment and analyzed by quantitative real-time PCR) for BoHV-1. No fetuses were positive in the molecular tests. Fetal age corresponded to 4 fetuses in the first, 10 in the second, and 65 in the third trimester of gestation, respectively. The percentages of non-purulent histopathological lesions in the various organs were 29% hepatitis, 15% nephritis, 12% nephrosis, 19% pneumonia, 0.4% splenomegaly, 2% adrenal inflammation, 19% encephalitis, and 3% placentitis. The absence of abortions by BoHV-1 may be explained by the endemicity of BoHV-1 in Brazilian herds, associated with the practiced vaccination, which contributed to herd immunity. Histopathological lesions may be associated with other causative agents of bovine abortion and should be included in the differential diagnosis.

Keywords: Reproductive diseases, Herpes virus, diagnosis, The State of SP

1. INTRODUÇÃO

O abortamento é definido como a eliminação prematura do feto e representa um sério problema em rebanhos bovinos de todo o mundo, devido ao significativo impacto econômico que esta perda ocasiona (CORBELLINI, 2002). A gama de enfermidades e agentes patogênicos envolvidos em abortamentos é muito grande e, desta forma, a dificuldade de identificação da etiologia responsável e consequentemente sua prevenção e controle se tornam cada vez mais difíceis, não só pelo custo (KIRKBRIDE, 1990).

A espécie *Alphaherpesvirus bovino 1* (BoHV-1) está classificada no gênero *Varicellovirus*, subfamília *Alphaherpesvirinae*, família *Herpesviridae*, ordem *Herpervirales* (ICTV, 2020). Destaca-se entre os patógenos de bovinos pelo impacto econômico causado por perdas produtivas e reprodutivas (KIRKBRIDE, 1992). Este agente é causador da Rinotraqueíte infecciosa bovina /Vulvovaginite pustular infecciosa dos bovinos, e está incluída na lista de



doenças de notificação obrigatória à Oficina Internacional de Epizootias, devido ao risco de disseminação e barreira sanitária no comércio internacional de animais e de produtos animais (OIE, 2020).

Os herpesvírus são eliminados em grande quantidade pelas secreções nasais, sendo via de transmissão eficiente para suscetíveis (DEL MÉDICO ZAJAC et al., 2010). A espécie bovina é a principal fonte de infecção do BoHV-1. As principais vias de eliminação do vírus são: secreções respiratórias, oculares e genitais (muco prepucial, muco vaginal) e o sêmen de animais infectados. A via de transmissão direta horizontal é a mais importante e ocorre através do contato direto entre os animais e também pela cópula, porém embrião e feto podem infectar-se pela via vertical (transplacentária).

Rebanhos endemicamente infectados podem caracterizar uma situação de imunidade naturalmente adquirida (LEMAIRE et al., 1994; ALFIERI; ALFIERI; KERLEI, 1998) e não apresentam elevada morbidade e mortalidade (VAN OIRSCHOT, 1998), apesar de Lemaire et al. (1994) relatarem que a primeira infecção pode trazer perdas devido a problemas reprodutivos. A infecção primária do BoHV-1 induz resposta imune e celular. Os anticorpos neutralizantes, principalmente da classe IgM e seguido pela IgG, são detectados geralmente dez dias após a infecção (ENGELS; ACKERMANN, 1996).

Os métodos diretos incluem o isolamento viral e testes moleculares como a PCR e PCR em tempo real (qPCR), que apresentam maior rapidez e sensibilidade diagnóstica que o isolamento (FUSUMA, 2014; OIE, 2019). Os métodos indiretos, ou sorodiagnóstico, como ELISA indireto e vírus neutralização podem ser utilizados para detectar anticorpos contra o BoHV-1 (OIE, 2019).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL:

O presente estudo foi realizado em uma amostra de conveniência de 100 fetos bovinos abortados, proveniente de rebanhos localizados em algumas regiões do Brasil. Estes fetos que foram encaminhados ao Instituto Biológico para diagnóstico diferencial de doenças da reprodução, no período de janeiro de 2015 a agosto de 2020.

Uma ficha de necropsia, para cada feto foi preenchida com objetivo de analisar macroscopicamente possíveis lesões que pudessem ajudar no diagnóstico. O animal foi necropsiado no Laboratório de Anatomia Patológica do Instituto Biológico e coletadas amostras



de sistema nervoso central (SNC), coração, pulmão, fígado, rim, baço, linfonodos, e líquido tóraco-abdominal (PITUCO et al., 2010).

2.2 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA:

Alíquotas dos tecidos para análise histopatológica foram fixadas em formol 10% tamponado para processamento histotécnico. Os órgãos foram avaliados histologicamente em tecidos emblocados em parafina e coloração hematoxilina e eosina (PROPHET et al., 1992), e a patologia classificada de acordo com a literatura de referência em anatomia patológica veterinária (JONES et al., 2000; 2002; JUBB et al., 2007; MCGAVIN; ZACHARY, 2009).

2.3 DIAGNÓSTICO DIRETO (PESQUISA DE ANTÍGENO)

2.3.1 TESTE MOLECULAR BoHV-1:

As amostras de órgãos para análise molecular foram estocadas a -20°C e encaminhadas para o Laboratório de Viroses de Bovídeos do Instituto Biológico, responsável por esta análise. Para o diagnóstico molecular do BoHV-1, o teste recomendado pela OIE (2019) é a PCR em tempo real (qPCR). Foi utilizado o kit comercial VETMAX BoHV-1 (Thermofisher®), segundo as instruções do fabricante. A padronização da técnica foi a descrita por FUSUMA (2014).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os 100 fetos abortados (amostragem de conveniência) foram negativos para o BoHV-1. Independente do patógeno causador do abortamento, os dados de cada feto foram tabulados, de acordo com a idade gestacional do abortamento e sexo (Tabela 1), Regiões Brasileiras de origem das amostras (Nordeste, Sudeste, Sul e Centro-Oeste) (Tabela 2), alterações macroscópicas (Tabela 3) e microscópicas (tabela 4).

A idade gestacional do aborto e o sexo foram: 42 machos, 23 fêmeas abortados no segundo terço de gestação; cinco machos e sete fêmeas abortados no último terço; uma fêmea e três machos abortados no primeiro terço da gestação e no total 14 não se obteve informações (Tabela.1).



15º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2021
01 a 02 de setembro de 2021
ISBN 978-65-994972-0-9

Tabela 1. Idade gestacional do abortamento e sexo dos fetos bovinos que foram analisados nas necropsias realizadas de janeiro de 2015 a agosto de 2020.

Idade Fetal (dias)	Fêmeas		Machos		NI		Total	
	N	%	N	%	N	%	N	%
NI	10	23	3	6	1	17	14	14
1 a 93	3	7	1	2	2	33	6	6
94 a 186	23	53	42	82	3	50	68	68
187 a 280	7	16	5	10	0	0	12	12
Total	43	100	51	100	6	100	100	100

FLORES (2007) relatou que as taxas de abortos para BoHV-1 ocorrem entre o quinto e oitavo mês de gestação.

Embora a localização do Instituto Biológico seja em São Paulo, foi facilitado o envio de fetos inteiros abortados dos Estados mais próximos, pertencentes a quatro das cinco regiões do Brasil. Obtivemos um maior encaminhamento da Região Sudeste com 81 fetos, sendo São Paulo e Minas Gerais os Estados que mais enviaram; o Centro Oeste com nove fetos tendo os três Estados pertencentes enviado; o Sul com seis fetos, onde todas as amostras vieram do Paraná, o Nordeste com três fetos tendo amostras do Maranhão, Bahia e Alagoas e com um feto do Distrito Federal e também um feto de uma propriedade que não informou a sua localização, compatibilizando assim com o resultado endêmico de que a região Sudeste é a de maior ocorrência (Tabela 2).

Tabela 2. Origem das amostras por Regiões Brasileiras enviadas ao Instituto Biológico de São Paulo de janeiro de 2015 até agosto de 2020.

	* Região*	2015		2016		2017		2018		2019		2020		Total	
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
NE	NE	0	0	1	33	0	0	0	0	0	0	2	67	3	3
-	CO	1	11	1	11	2	22	3	33	1	11	1	11	9	9
Nor	SE	6	7	15	19	16	20	18	22	13	16	13	16	81	81
dest	S	0	0	0	0	0	0	2	33	0	0	4	67	6	6
e;	NI	0	0	0	0	0	0	0	0	1	100	0	0	1	1
CO	Total	7	7	17	17	18	18	23	23	15	15	20	20	100	100
-															

Centro-Oeste; SE - Sudeste; S - Sul; NI - não informado



15º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2021
01 a 02 de setembro de 2021
ISBN 978-65-994972-0-9

Nos 100 fetos encaminhados, ainda que não houvessem amostras positivas para o BoHV-1, foram observadas as seguintes alterações: 27 com hepatomegalia, 16 com edema serossanguinolento, um com necrose na córtex renal e 22 com hemorragia (Tabela 3).

Tabela 3. Achados macroscópicos dos fetos bovinos abortados de 2015 a 2020.

Ano	MACROSCOPIA									
	HEPATOMEGALIA		EDEMA SERO SANGUINOLENTO		NECROSE DA CÓRTEX RENAL		HEMORRAGIA		Total	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
2015	0	0	1	100	0	0	0	0	1	100
2016	3	43	2	29	0	0	2	29	7	100
2017	4	25	6	38	0	0	6	38	16	100
2018	12	44	4	15	1	4	10	37	27	100
2019	5	56	2	22	0	0	2	22	9	100
2020	3	50	1	17	0	0	2	33	6	100
Total	27	41	16	24	1	2	22	33	66	100

Apesar de não existirem lesões macroscópicas patognomônicas em fetos, caracterizando um aborto por BoHV-1, podem existir lesões altamente sugestivas de abortamento infeccioso (ALFIERI et al., 1998). Normalmente os fetos encontram-se severamente autolizados, e pode-se verificar hemorragia petequial no epicárdio e endocárdio (FERNANDES, 2001). Pode ocorrer necrose focal, visualizada macroscopicamente como pontos esbranquiçados de um a três milímetros de diâmetro no fígado e pulmões, edema serossanguinolento, necrose massiva na córtex renal e hemorragia (KENNEDY et al. 1964; OWEN et al., 1964).

Nos 100 fetos enviados, os achados microscópicos (Tabela 4) de maior ocorrência foram 75 com hepatite, seguida de 50 com pneumonia, 50 com encefalite, 39 com nefrite, 30 com nefrose, sete com placentite, cinco com adrenalite e um com reação de polpa branca. Apesar dos achados histopatológicos, não houve diagnóstico positivo para BoHV-1.



15º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2021
01 a 02 de setembro de 2021
ISBN 978-65-994972-0-9

Tabela 4. Achados microscópicos dos fetos bovinos abortados de 2015 até 2020.

ACHADOS	MICROSCOPIA													
	2015		2016		2017		2018		2019		2020		Total	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
HEPATITE	5	7	10	13	13	17	20	27	15	20	12	16	75	29
NEFRITE	1	3	6	15	7	18	11	28	7	18	7	18	39	15
NEFROSE	2	7	1	3	6	20	3	10	7	23	11	37	30	12
PNEUMONIA	3	6	4	8	9	18	15	30	11	22	8	16	50	19
REAÇÃO DE POLPA BRANCA	0	0	0	0	0	0	1	100	0	0	0	0	1	0,4
ADRENALITE	0	0	0	0	0	0	5	100	0	0	0	0	5	2
ENCEFALITE	3	6	4	8	9	18	16	32	11	22	7	14	50	19
PLACENTITE	1	14	0	0	2	29	1	14	2	29	1	14	7	3
Total	15	100	25	100	46	100	72	100	53	100	46	100	257	100

Quando o feto é positivo para BoHV-1, o exame histopatológico apresenta necrose focal, que é uma lesão típica, e é observado em vários tecidos, como no pulmão, baço, timo e linfonodos, rim e ocorre com maior prevalência no fígado. Infiltrado inflamatório mononuclear no pulmão, na placenta, na adrenal e no fígado também são relatados (KENNEDY et al., 1964).

As causas das perdas reprodutivas na bovinocultura abrangem muitas doenças, sejam elas infecciosas ou não infecciosas. O diagnóstico definitivo é de extrema importância nesses casos, para não ocorrer uma interpretação errônea. Por isso, a necropsia, junto com o diagnóstico histológico, sorológico e molecular é de grande valia.

A situação do BoHV-1 no rebanho nacional é endêmica, caracterizada por elevada soropositividade e poucos casos clínicos (DEL FAVA et al., 2002; FLORES, 2007). A vacinação contra o BoHV-1 não é obrigatória, mas muitos pecuaristas a utilizam. A associação da imunidade por infecção natural (endemicidade) com a imunidade pela vacinação permitem a imunidade de rebanho, obtendo assim baixos índices de abortamento.

Portanto, apesar de existirem lesões macroscópicas e microscópicas que convergem para um abortamento infeccioso, e nenhum feto positivo ter sido positivo na qPCR para BoHV-1, é necessário que os laboratórios de diagnóstico veterinário executem o diagnóstico diferencial do BoHV-1 e de outros patógenos (bactérias, vírus, protozoários, fungos), para o conhecimento das causas de perdas econômicas na reprodução bovina.



4. CONCLUSÃO

A ausência de abortamentos pelo BoHV-1 pode ser explicada pela endemicidade do BoHV-1 nos rebanhos brasileiros, associado ainda pela vacinação praticada, o que contribuiu para imunidade de rebanho. As lesões histopatológicas podem estar associadas a outros agentes causadores de abortamento bovino, devendo ser incluídos no diagnóstico diferencial.

5. AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a oportunidade ao CNPq pela bolsa PIBIC concedida, e à FUNDEPAG contratos 2013.1251 e 2018.2018, pelo suporte financeiro do trabalho.

A minha orientadora Dra. Claudia Del Fava por todo o suporte e mentoria, e minha companheira de laboratório, Leticia Cursino dos Santos.

Por último, mas não menos importante, a minha família que me fornece o suporte para não desistir e a fé para acreditar nos meus sonhos.

6. REFERÊNCIAS

- ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F.; KERLEI, C. M. Conseqüências da infecção pelo Herpesvírus Bovino tipo 1 sobre o sistema reprodutivo de bovinos. **Semina**, v. 19, n. 1, p. 86-93, 1998.
- CORBELLINI, L.G.; DRIEMEIER, D.; CRUZ, C.F.E.; GONDIM, L.F.P.; WALD, V. Neosporosis as a cause of abortion in dairy cattle in Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 103, p. 195-202, 2002.
- DEL MÉDICO ZAJAC, M. P.; LADELFA, M. F.; KOTSIAS, F.; MUYLEKENS, B.; THIRY, J.; THIRY, E.; ROMERA, S. A. Biology of bovine herpesvirus 5. **The Veterinary Journal**, v.184, n.2, p.138-145, 2010.
- DEL FAVA, C.; PITUCO, E. M.; D'ANGELINO, J. L. Herpesvírus Bovino tipo -1 (HVB-1): revisão e situação atual no Brasil. **Revista de Educação Continuada**, v. 5, n. 3, p. 300 - 312, 2002.
- ENGELS, M.; ACKERMANN, M. Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. **Veterinary Microbiology**, v. 53, n. 1-2. p. 3-15, 1996.
- FERNANDES, 2001. Abortos por herpesvirus. In: RIET CORREA, F.; SCHILD, A. L.; MÉNDEZ, M. C.; LEMOS, R. A. A. (Eds.). **Doenças de Ruminantes e Equinos**. São Paulo, Varela Editora e Livraria Ltda., 2001. p. 356-357.
- FLORES, E. F. (Ed.). **Virologia veterinária**. Santa Maria: Editora Universidade Federal de Santa Maria, 2007. p. 435-462.



FUSUMA, M. M. **Vigilância epidemiológica de doenças do sistema nervoso central em bovinos: diagnóstico do herpesvírus bovino.** 88 p. São Paulo. 2014. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico.

ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. Taxonomy, Family *Herpesviridae*, Subfamily *Alphaherpesvirinae*, genus *Varicellovirus*, species *Bovine alphaherpesvirus 1*. 2020. Disponível em: <<https://talk.ictvonline.org/taxonomy>>. Acesso em: 13 Mai. 2021.

JONES, T.C.; HUNT, R.D.; KING, N.W. **Patologia Veterinária.** São Paulo: Manole, 2000. 1415 p.

JUBB, K.V.F.; KENNEDY, P.C.; PALMER, N.G. (Eds.) **Pathology of Domestic Animals.** v.1. Elsevier Saunders, 2007. 899 p.

KENNEDY, P. C.; RICHARDS, W. P. C. The pathology of abortion caused by the virus of infectious bovine rhinotracheitis. **Pathologia veterinaria**, v. 1, n. 1, p. 7-17, 1964.

KIRKBRIDE, C.A. **Laboratory diagnosis of livestock abortion.** Iowa State University Press, 1990. 260 p.

KIRKBRIDE, C.A. Etiologic agents detected in a 10-year study of bovine abortion and stillbirths. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 4, p. 175-180, 1992.

LEMAIRE, M.; PASTORET, P. P.; THIRY, E. Le contrôle de l'infection par le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine. **Annales de Médecine Vétérinaire**, v. 138, n. 3, p. 167-180, 1994.

MCGAVIN, M. D.; ZACHARY, J. F. (Eds.) **Bases da Patologia Veterinária.** Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. 1476 p.

PROPHET, E. B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J. B.; SOBIN, L. H. (Eds.) **Métodos Histotecnológicos.** Washington: Registro de Patologia de los Estados Unidos de América y Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América, 1992. 280 p.

OIE. Oficina Internacional de Epizootias. Infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis. **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2019.**

Disponível em:

<https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.04.11_IBR_IPV.pdf>. Acesso em: 15 Mai. 2020.

OIE. Oficina Internacional de Epizootias. OIE- Listed diseases, infections and infestations in force in 2020. Disponível em: <<https://www.oie.int/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2020/>>. Acesso em: 15 Mai. 2020.

PITUCO, E. M.; DEL FAVA, C.; RIBEIRO, C. P.; BERSANO, J. G.; MIYASHIRO, S. PANAFTOSA-OPAS/OMS (Org.). **Manual veterinário de colheita e envio de amostras. Manual técnico.** Cooperação Técnica MAPA/OPAS/OPAS/OMS para o Fortalecimento dos Programas de Saúde Animal do Brasil. Rio de Janeiro: PANAFTOSA -OPAS/OMS, 2010. 218 p. (Série de Manuais Técnicos, 13).



15º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2021

01 a 02 de setembro de 2021

ISBN 978-65-994972-0-9

VAN OIRSCHOT, J. T. The BHV-1 situation in Europe. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL HERPESVÍRUS BOVINO E DIARRÉIA VIRAL BOVINA, 1., 1998, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 1998. p. 69-72.