

ANÁLISE DOS PARÂMETROS CLÍNICOS, DAS ALTERAÇÕES SOROLÓGICAS E HISTOPATOLÓGICAS DOS EPIDÍDIMOS E TESTÍCULOS DE TOUROS JOVENS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE COM O BOHV-1

Wesley José de Souza¹, Gladstone Santos de Souza², Andréa Souza Ramos de Medeiros³, Samir Issa Samara⁴

1. Pós-Graduando em Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Jaboticabal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (wesleyjs16@hotmail.com)
2. Doutor em Farmacotécnica Industrial, Diretor de Pesquisa e Desenvolvimento do Laboratório Clarion Biociências – Aparecida de Goiânia - Goiás
3. Assistente de Suporte acadêmico do Setor de Víruses da Reprodução do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias UNESP- Campus de Jaboticabal
4. Professor Titular do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Jaboticabal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Brasil.

Recebido em: 06/05/2013 – Aprovado em: 17/06/2013 – Publicado em: 01/07/2013

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo analisar parâmetros clínicos, sorológicos e alterações histopatológicas de epidídimos e testículos de touros jovens infectados experimentalmente com BoHV-1, com o intuito de otimizar os diagnósticos utilizados para a detecção desse vírus nas diversas fases de infecção. Neste experimento foram utilizados 12 touros com cerca de 30 meses, seis animais foram inoculados com a amostra-padrão Nebraska do BHV-1 inoculada pelas vias intranasal e intraprepucial com 10mL de suspensão viral (dose total de $10^{7,0}$ DICC₅₀/mL), repartidas em ambas as vias, e seis animais foram utilizados como animais controle. Todos os animais inoculados apresentaram edema e hiperemia no prepúcio entre o terceiro e o décimo sexto dia PI; dois animais, além dos sinais clínicos de infecção prepucial, apresentaram também exsudato nasal, detectado entre o terceiro e o oitavo dia PI; e nenhum dos animais do grupo controle manifestou sinais clínicos característicos da infecção pelo BoHV-1. Por meio da técnica de virusneutralização (VN) foram observados títulos de anticorpos em todos os animais inoculados, variando entre 4 e 512, entre o 14^o e o 49^o dia pós-inoculação. Todos os animais do grupo controle apresentaram resultados negativos para a referida técnica de VN. Os epidídimos e testículos dos touros infectados pelo BoHV-1 e dos touros utilizados como controle não apresentaram alterações histopatológicas dignas de nota no 170^o dia pi.

PALAVRAS-CHAVE: herpesvírus bovino tipo 1, BoHV-1, doença reprodutiva, anticorpos, virusneutralização.

ANALYSIS OF CLINICAL PARAMETERS, SEROLOGICAL AND ALTERATIONS HISTOPATHOLOGICAL OF THE EPIDIDYMIS AND TESTIS OF YOUNG BULLS EXPERIMENTALLY INFECTED WITH BoHV-1

ABSTRACT

The present study aimed to analyze clinical parameters, serological and alterations histopathological of the epididymis and testis of young bulls experimentally infected with bovine type-1 herpesvirus (BoHV-1), seeking to optimize the diagnostic methods used to detect this virus in several phases of the infections. Twelve animals were used, all being approximately 30 months old. Six animals were inoculated with Nebraska standard sample of BoHV-1 through intranasal and intrapreputal routes, with 10 mL of the viral suspension (total dosage of $10^{7.0}$ DICCC₅₀/mL) divided in both routes. Another six animals were used as a control group. All inoculated animals presented edema and hyperemia on the foreskin between the third and sixteenth days after the infection, from which two animals also presented nasal exudate, detected between the third and eighth days post-infection (p. i.). No animals from the control group manifested any clinical signs similar to infected animals. By means of the virus neutralization (VN) technique, antibody titers were observed in all inoculated animals, with values ranging from 4 to 512 between days 14 and 49 after the inoculation. All animals in the control group showed negative results for the previously mentioned VN technique. The epididymis and testis of animals infected with BoHV-1 and of animals in the control group showed no histopathological changes that were noteworthy after 170 days post-infection.

KEYWORDS: bovine type-1 herpesvirus, BoHV-1, reproductive illness, antibodies, virusneutralization.

INTRODUÇÃO

A expansão da pecuária no Brasil tem mostrado sua importância como uma das principais fontes de receita do PIB nacional. O reflexo dessa expansão deve-se, entre outros fatores, aos programas de acasalamento dirigido utilizando a monta natural, a inseminação artificial e diversas outras biotecnologias de reprodução. Só que o sucesso das técnicas depende da saúde reprodutiva dos machos e fêmeas utilizados nestes programas, para obtenção de resultados satisfatórios (ASBIA, 2009).

Dentre as doenças mais importantes que afetam a esfera reprodutiva e que já foram identificadas em bovinos no Brasil destacam-se: a infecção provocada pelo herpesvírus tipo 1 (BoHV-1), e a virose detectada no País na década de 60, que infectou o rebanho nacional, provavelmente, por meio da importação de animais e de sêmen contaminado. Clinicamente, as infecções pelo BoHV-1 manifestam-se sob distintas síndromes, entre as quais se observa a respiratória, caracterizada pela rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), e a reprodutiva, caracterizada por uma infecção genital vulvovaginite/balanopostite pustular infecciosa (IPV/IPB), ocasionando baixas taxas de concepção, abortamento, infertilidade temporária e repetição de estro (ENGELS & ACKERMANN, 1996).

Apesar de não impedir a infecção viral e a latência, a vacinação tem sido indicada como medida de controle da enfermidade para evitar o desenvolvimento de sinais da doença e reduzir a eliminação de partículas virais, desse modo,

acreditando possibilitar a diminuição do impacto econômico das infecções pelo BoHV-1 (BORGES, 2011).

Em propriedades com até 20% de animais positivos para BoHV-1, consideradas de baixa prevalência, a melhor estratégia a ser aplicada para o controle do BoHV-1 é a realização de testes sorológicos nos animais e descarte dos animais soropositivos. Em propriedades que apresentem entre 20% e 50% de animais soropositivos, considerados de prevalência média, recomenda-se o uso de vacinas convencionais nos animais soropositivos, o que permite o convívio destes com animais sadios, e ainda, o descarte gradual e em tempo mais longo dos animais positivos. Já em rebanhos com alta prevalência da infecção acima de 50% de animais soropositivos, o controle com uso de vacinas em todo o rebanho é o procedimento indicado para o controle do vírus (GATTI, 2010).

O material genético importado, adquirido por criadores brasileiros que utilizam a inseminação artificial, é oriundo de empresas que submetem os animais a testes sorológicos exigidos pelo MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) para um grupo de patógenos, conforme instrução normativa número 51, de 4 de novembro de 2011, que estabelece como requisito sanitário para importação de sêmen bovino, entre outros exames, a realização do teste de virusneutralização para o BoHV-1, em amostra de soro sanguíneo de cada doador de sêmen no mínimo 21 dias após a última coleta de sêmen. Porém, a instrução normativa de número 48, de 17 de junho de 2003, também editada pelo MAPA relativamente ao processamento de amostras de sêmen coletadas de touros nacionais, não menciona a necessidade de testes sorológicos negativos para o BoHV-1, antes de esses animais ingressarem nesses centros de reprodução de bovinos localizados no Brasil.

Da mesma forma, a instrução normativa de número 4, de 7 de fevereiro de 2013, também editada pelo MAPA, não menciona a necessidade de testes sorológicos negativos para esse vírus, para a comercialização de reprodutores bovinos dentro do território nacional. Devido à legislação do MAPA vigente, aliada à falta de laboratórios que realizem testes sorológicos para o BoHV-1, e ao pouco conhecimento sobre esse vírus até mesmo por alguns médicos veterinários, existe um alto risco de disseminação desse agente viral dentro dos rebanhos bovinos nacionais, seja por meio de sêmen ou de animais infectados, podendo ocasionar vários problemas reprodutivos e grandes perdas de produtividade na pecuária leiteira e de corte, em todas as regiões do País.

O objetivo deste trabalho foi avaliar os sinais clínicos, as respostas sorológicas e os achados histopatológicos característicos da infecção causada pelo BoHV-1, por meio de uma infecção experimental em touros jovens, e a partir dos resultados observados, fornecer a outros profissionais veterinários informações que lhes permitam identificar, dentro do rebanho, reprodutores que apresentem quadro clínico, sorológico e histopatológico semelhante ao observado entre os animais avaliados neste trabalho.

MATERIAL E METODOS

Para a realização do experimento foram utilizados 12 bovinos machos, com aproximadamente 30 meses, mestiços, Girolandos, criados com o mesmo manejo, porém em locais diferentes da mesma propriedade (Fazenda Palmital), no Instituto Federal Goiano, Campus Urutaí-Goiás, no período de agosto de 2011 a fevereiro de 2012. Antes de iniciar o experimento, um lote de animais com idade e caracterização

racial definidas anteriormente, foram testados pela técnica de virusneutralização – VN, e só depois escolhidos os que foram negativos nos testes contra os vírus da IBR. A partir daí os animais foram divididos em dois grupos, com seis animais em cada.

Um grupo foi inoculado experimentalmente com o vírus BoHV-1, de animais denominados 7,8,9,10,11,12, e o outro, com animais denominados 1,2,3,4,5,6, ficou como grupo controle. Para a infecção experimental foi utilizada a amostra-padrão Nebraska do BHV-1, inoculada pelas vias intranasal e intraprepucial com 10 mL de suspensão viral (dose total de $10^{7,0}$ DICC₅₀/mL), repartidas em ambas as vias. Após a inoculação, os animais foram monitorados por meio de parâmetros diariamente determinados pela tomada da temperatura retal durante 14 dias e presença de sinais clínicos, tais como: secreções nasais, dispneia, lesões ulcerativas, hiperemia, edema, presença de pontos hemorrágicos ou pequenas pústulas no prepúcio e problemas com a micção, por até 17 dias.

A pesquisa de anticorpos neutralizantes foi realizada pelo teste de virusneutralização (VN), descrito no “Manual de Diagnóstico Testes e Vacinas para Animais Terrestres, Organização Mundial de Saúde Animal” (OIE, 2010), usando a estirpe Nebraska do BoHV-1 proveniente da Universidade Estadual de Londrina – PR. As amostras de sangue foram colhidas por punção da veia jugular externa ou veia sacral média, utilizando-se sistema a vácuo (Vacunteiner Becton-Dickson). Foi realizada uma colheita prévia de sangue para certificação da negatividade dos animais diante do BoHV-1 antes da inoculação. A cada semana depois da infecção experimental foram colhidas mais sete amostras de cada animal. No momento da colheita, as amostras foram deixadas em repouso em temperatura ambiente para retração do coágulo, e em seguida, foram transportadas sob refrigeração para o laboratório onde foram centrifugadas a 744 G durante 10 minutos, para separação do coágulo. O soro foi separado em alíquotas de 1mL em tubos tipo Eppendorf®, e estocados à temperatura de -20 °C até o momento da realização dos testes. Para serem testados, os tubos foram descongelados, inativado o sistema complemento em banho-maria à temperatura de 56°C durante 30 minutos, e colocados em duplicata nas microplacas de 96 cavidades. Na primeira coluna de cada placa, foram adicionados 100µL de meio Eagle-MEM em cada cavidade, e nas demais, 50µL, excetuando a da coluna 3, onde a diluição foi de 1:2. Em seguida, foram adicionados 50µL da amostra na segunda, terceira e quarta colunas. Como próxima etapa, foi feita a diluição seriada a partir da quarta coluna, que tinha a diluição 1:4, até a décima segunda coluna, onde a diluição foi de 1:1024. Após este processo, em cada cavidade, exceto na primeira e segunda colunas, que foram controles, foram adicionados 50µL da suspensão viral ajustada a uma concentração de 200 TCID₅₀. Para o preparo das 200 TCID₅₀, foi subtraído o logaritmo de 200 TCID₅₀ (2,3) do título viral. Do resultado da subtração foi obtido o antilogaritmo correspondente.

Este valor representava o volume final da diluição que continha as 200 TCID₅₀. Após a adição dessa suspensão viral, as microplacas foram incubadas em estufa à temperatura de 37°C em atmosfera controlada com 5% de CO₂, por um período de 18 a 24 horas. Após a incubação da mistura de soro com vírus e meio, foram adicionados em cada cavidade da placa 100 uL de uma suspensão de células MDBK, numa concentração de $3,0 \times 10^5$ céls/mL, cultivadas em MEM suplementado com 10% de SFB. Terminada essa etapa, a microplaca foi novamente incubada à temperatura de 37°C em atmosfera controlada com 5% de CO₂, por um período de 72 horas, seguido de leitura do efeito citopático característico.

Foram utilizados em cada prova o controle do vírus e o controle de células

MDBK. A interpretação do teste considerou positiva a amostra de soro que neutralizou o vírus a partir da diluição 1:2. Amostras pareadas de cada animal foram testadas na mesma microplaca, e o título expresso como o inverso da diluição capaz de neutralizar as 200 TCID₅₀.

Cento e setenta dias após a infecção experimental com BoHV-1, os bovinos pertencentes a cada grupo foram orquiectomizados pelo método cirúrgico com incisão lateral da bolsa escrotal. Posteriormente à avaliação macroscópica, foram feitos cortes de cinco milímetros na porção média dos testículos e de cinco milímetros na região da cauda dos epidídimos, e a seguir estes foram fixados em formol por 24 horas. Em seguida, foram conservados em álcool etílico a 70%. Após fixação, os tecidos foram incluídos em parafina, seccionados a uma espessura de cinco micrômetros e corados pela Hematoxilina e Eosina (LUNA, 1968). Foram elaboradas seis lâminas de fragmentos de testículos e seis lâminas de fragmentos de epidídimos, de cada grupo de animais controle e inoculados respectivamente, totalizando um total de 24 lâminas. Os resultados desse referido trabalho foram observados e apresentados com uma abordagem descritiva, sem nenhuma inferência estatística. Este experimento foi autorizado pelo protocolo de número 0143030/11 em reunião ordinária de 7 de julho de 2011 da CEUA- Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” Campus de Jaboticabal.

DISCUSSÃO E RESULTADOS

Dos seis touros inoculados, todos apresentaram aumento na temperatura corpórea ($\geq 39,5$), porém em períodos e graus variados. Os animais de números 7, 8, 9, 10 e 12 manifestaram hipertermia a partir do terceiro dia pós-inoculação, e apenas o animal de número 11 aumentou a temperatura corpórea, no quarto dia pós-inoculação viral.

Três animais, os de números 8, 9 e 10 permaneceram com hipertemia até o sexto dia, e três, os de números 7, 11 e 12, até o sétimo dia após a inoculação, com o vírus BoHV-1. Nenhum dos animais do grupo controle manifestou hipertermia durante os dias do estudo (Tabela 1). Do mesmo modo, BITSCH (1973), identificou aumento da temperatura corpórea em dois touros inoculados pelas vias respiratória e intraprepucial com o vírus BoHV-1, entre os dias 4 e 9 após a infecção experimental. Já VOGEL *et al.*, (2004), não observaram aumento da temperatura corpórea em nenhum dos quatro touros inoculados com o BoHV-1, destacando que nesse referido estudo os animais foram inoculados apenas pela via intraprepucial. Só os animais inoculados apresentaram algum sinal clínico característico da infecção pelo BoHV-1, porém essas manifestações ocorreram em tempos distintos e em graus variáveis em cada animal, como mostra a Tabela 2.

Em relação aos sinais clínicos relacionados à doença reprodutiva, o animal de número 10 apresentou a forma mais branda da infecção, com edema e hiperemia no prepúcio, iniciando no terceiro e permanecendo até o décimo quinto dia pi. Os animais de número 7, 11 e 12, além de edema e hiperemia, apresentaram vesículas no prepúcio entre o terceiro e o décimo sexto dia pi. De modo semelhante, BITSCH, (1973), detectou em dois touros inoculados com o BoHV-1, pústulas na mucosa peniana, úlceras e áreas hiperêmicas na mucosa do prepúcio, entre o 8º e o 23º dia pi. Resultado similar foi observado por GIVENS & MARLEY, (2008), que após a inoculação intraprepucial com o vírus BoHV-1, observaram pontos escuro-avermelhados, vesículas e pústulas nas mucosas prepuciais de todos os touros

infectados experimentalmente. Os autores reportaram ainda, que algumas destas lesões posteriormente formaram placas, úlceras e originaram infecções bacterianas secundárias, que resultaram em uma descarga prepucial purulenta.

Da mesma forma, VOGEL *et al.*, (2004), também observaram balanopostite grave, caracterizada por vermelhidão do pênis e da mucosa do prepúcio, acompanhada de vesículas e exsudato fibrinoso em todos os animais inoculados com o BoHV-1 pela via intraprepucial, sendo que esses sinais observados foram diminuindo até o 14º dia pi. HENZEL (2008), também identificou após inoculação intravaginal com o BoHV-1, o aparecimento de sinais moderados a severos de vulvovaginite, que foram inicialmente observados no dia 2 pi, sendo caracterizados por congestão e edema da mucosa vulvovestibular e da vagina posterior.

Apenas os animais de números 8 e 9 apresentaram, além dos sinais clínicos de infecção prepucial (edema, hiperemia e vesículas), exsudato nasal, detectado entre o terceiro e o oitavo dia pi. BITSCH, (1973), e BELKNAP *et al.*, (1994), também observaram sinais respiratórios em todos os animais inoculados com o BoHV-1, sendo que BITSCH, (1973), além do exsudato nasal, identificou em um dos animais inoculados uma conjuntivite unilateral. Já VOGEL *et al.*, (2004), que inocularam touros com o BoHV-1, e HENZEL, (2008), que infectaram experimentalmente bezerras com o mesmo vírus, não observaram nenhum sinal respiratório nos animais inoculados durante todo o experimento. Apesar da fase aguda da doença se desenvolver em período rápido, em torno de sete dias, os sinais clínicos originados com a enfermidade, quando não curados, podem permanecer por um período maior que 14 dias, ocasionando transtornos à sanidade do animal (GIVENS & MARLEY 2008).

TABELA 1. Temperatura corpórea dos grupos controle e inoculados com o BoHV-1, medida durante 14 dias.

Nº	Temperatura corpórea (d)*														
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	39,1	38,9	39,0	38,9	38,8	39,0	38,7	38,9	38,9	38,6	38,8	38,9	38,7	38,5	38,6
2	38,7	38,9	38,7	38,8	38,8	38,6	38,8	39,0	38,9	38,7	38,7	38,8	39,0	38,6	38,7
3	38,8	38,8	39,1	39,0	38,9	38,8	38,8	39,3	38,8	39,2	38,9	39,0	38,7	38,5	38,9
4	39,0	38,9	39,2	39,0	39,1	39,0	38,9	39,1	39,0	38,8	38,8	39,0	38,9	39,0	38,8
5	38,9	39,0	38,9	38,8	39,2	39,0	38,8	39,1	38,7	39,0	38,6	39,1	38,8	38,8	39,1
6	38,8	38,7	39,0	38,9	38,8	39,1	39,0	38,8	38,7	39,0	39,1	38,7	38,9	39,0	38,8
7	38,8	38,7	39,3	40,0	40,2	40,5	40,1	39,9	39,4	39,5	39,0	38,7	38,9	39,0	38,8
8	38,9	39,0	39,5	40,1	40,0	40,3	39,7	39,3	39,3	38,8	38,9	38,9	38,7	38,8	38,7
9	38,8	38,8	39,2	40,1	39,9	40,2	40,0	39,5	39,3	38,9	38,9	39,0	38,8	38,9	38,8
10	39,1	39,0	39,3	40,3	40,0	40,1	39,9	39,5	39,3	39,0	39,0	38,9	39,0	38,8	38,9
11	38,6	38,8	39,3	39,5	39,9	41,0	40,5	39,9	39,2	39,0	38,7	38,9	38,8	38,6	38,7
12	38,8	38,9	39,4	39,9	40,0	41,0	40,3	40,0	39,5	39,3	39,0	38,9	38,8	39,0	38,9

* Dia zero e após a inoculação.

TABELA 2. Sinais clínicos no grupo de animais controle (1 a 6) e touros inoculados com o BoHV-1 (7 a 12) com o herpesvírus bovino tipo 1, durante 14 dias do experimento.

Animal	Sinais clínicos (d)*																	
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	-	-	++	++	
8	-	-	-	+++	++	+++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	++	++	++
9	-	-	-	+++	++	+++	++	++	++	++	++	+	+	+	+	++	++	++
10	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+		
11	-	-	-	-	+	++	++	++	++	+	+	+	-	-	-	++	++	
12	-	-	-	+	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	++	++		

* Dia zero e após a inoculação.

Ausência de sinais clínicos -, Edema e hiperemia no prepúcio +, Edema, hiperemia, vesículas, pústulas e úlceras no prepúcio ++, Edema, hiperemia, vesículas, pústulas, úlceras no prepúcio e sinais respiratórios +++.

Foram encontrados anticorpos neutralizantes em todos os touros inoculados, detectados entre o 14^o e o 49^o dia pi, com títulos iniciais de 4 ou 8 que posteriormente atingiram um máximo de 512. Na soroconversão, os animais de números 10 e 11 apresentaram títulos menores, limitados até 128, entretanto os de números 7, 8, 9 e 10 apresentaram ápice de título 512. Os títulos encontrados aumentaram e diminuíram nos períodos subsequentes, porém na maioria dos animais com curva normal, os títulos começaram a reduzir a partir do 42^o dia pi. Estes dados estão apresentados na Tabela 3. De forma semelhante, HENZEL, (2008), após a inoculação de bezerras pela via intravaginal, observou soroconversão em todos os animais inoculados com o vírus BoHV-1 no 28^o dia pi, apesar de esses animais apresentarem títulos menores entre 4 e 28, do que os animais desse experimento. VOGEL *et al.*, (2004), também observaram soroconversão em todos os quatro touros, com títulos variando entre 32 e 64, após 30 dias de inoculação com o vírus BoHV-1.

BITSCH, (1973), observou que os dois touros inoculados com o vírus BoHV-1 apresentaram títulos de anticorpos que variaram entre 64 para o touro A e 128 para o touro B, após 30 dias de infecção experimental. BENKAP *et al.*, (1994), detectaram em bezerros inoculados com o vírus BoHV-1.3 neurovirulento, títulos de anticorpos que variaram entre 256 e 512 após 30 dias, declinando para níveis entre 16 e 32 após 60 dias de inoculação experimental. AFONSO *et al.*, (2010), por meio da técnica de VN, analisaram amostras de soro sanguíneo, provenientes de um grupo de bovinos infectados naturalmente pelo BoHV-1, colhidas em 10 regiões distintas do Estado de Goiás, e detectaram entre 63,4% e 100% de amostras com anticorpos VN, sendo que dessas amostras, 36,3% apresentaram títulos superiores a 256. GATTI *et al.*, (2010), analisando amostras de sangue provenientes de três regiões distintas do Estado de São Paulo, detectaram anticorpos VN, contra o BoHV-1, variando entre 1,6% e 78,6% das amostras analisadas. Na Turquia, YESILBAG & GUNGOR, (2008), também por meio da técnica de VN, detectaram apenas 1,7% de amostras com anticorpos positivos contra o BoHV-1. Já RUSENOVA & BOCHEY, (2009), na Bulgária, detectaram 64% de amostras com anticorpos VN contra esse

mesmo vírus. Todas as referências citadas acima, em relação ao teste de VN, corroboram para identificar o alto nível de sensibilidade dessa técnica no diagnóstico sorológico de bovinos infectados experimental e naturalmente pelo BoHV-1.

TABELA 3. Títulos VN de amostras sanguíneas colhidas ao longo do tempo de animais do grupo controle (1 a 6) e do grupo de animais inoculados (7 a 12) com o BoHV-1.

Animal	(d)*							
	0	7	14	21	28	35	42	49
1	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2
2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2
3	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2
4	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2
5	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2
6	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2
7	< 2	< 2	8	32	128	512	128	32
8	< 2	< 2	8	64	256	512	128	32
9	< 2	< 2	8	32	128	512	256	64
10	< 2	< 2	4	32	128	128	64	8
11	< 2	< 2	8	32	64	128	64	16
12	< 2	< 2	8	32	128	512	512	128

* Dia zero e após a inoculação.

Título expresso como a recíproca da maior diluição do soro capaz de impedir a replicação do vírus no teste de virusneutralização.

No exame histopatológico realizado 175 dias após a infecção experimental com o BoHV-1, os fragmentos de testículo das amostras de touros controles e inoculados, não apresentaram alterações dignas de nota. Observou-se parênquima com epitélio estratificado com as zonas basal, intermediária e superficial com aspecto normal, assim como as células: espermatogônias, espermatócitos primários e secundários, espermátides e espermatozoides, bem como as células de Sertoli e Leydig.

Os fragmentos do corpo do epidídimo das amostras de touros controles e inoculados também não apresentaram diferença histológicas dignas de nota. Foi possível verificar epitélio pseudoestratificado cilíndrico com estereocílios de aspecto normal, assim como lâmina própria e a musculatura. De maneira semelhante aos resultados histológicos detectados nas amostras de testículos e epidídimos dos dois grupos de touros desse referido experimento, WHITMORE *et al.*, (1977), também não observaram alterações histológicas relevantes nas análises dos fragmentos de testículos e epidídimos de touros inoculados com o BVDV. Já KUMI-DIAKALA *et al.*, (1980), observaram nos testículos analisados de quatro animais infectados pela bactéria *Brucella Abortus*, extensa fibrose e degeneração de células epiteliais tubulares, com mais de 94% de comprometimento dos túbulos seminíferos, que apresentavam perdas de células germinativas primordiais e células de Sertoli.

As células de Leydig apresentaram quantidades e estruturas normais. Nesse mesmo estudo, os pesquisadores identificaram uma grave degeneração de células do epitélio tubular do corpo e da cauda dos epidídimos em um dos quatros animais analisados. Da mesma forma, ADAMU *et al.*, (2007), observaram degeneração testicular, caracterizada pela depleção de células espermatogênicas e das células de Sertoli. A maioria das células de Leydig sofreu o processo de cariólise e destruição do tecido intersticial. Os epidídimos desse animal citado apresentaram comprometimento de mais de 60% do tecido intersticial, com o aparecimento de áreas focais de necrose.

CONCLUSÃO

Todos os seis touros inoculados experimentalmente pelas vias respiratória e prepucial, pela estirpe Nebraska do BoHV-1, apresentaram hipertermia, reproduziram a infecção prepucial de forma satisfatória, e apenas dois desses seis animais apresentaram sinais clínicos característicos de infecção respiratória. A resposta sorológica foi satisfatória em todos os animais inoculados, onde foram observados títulos variando entre 4 e 512, entre os dias 14 e 49 pi. A integridade histopatológica do epidídimo e testículos não foi influenciada pela doença.

REFERÊNCIAS

ADAMU, S.; FATIHU, M. Y.; USEH, N.; MAMMAN, M.; SEKONI, V. O.; ESIEVO, K. A. N. Sequential testicular and epididymal damage in Zebu bulls experimentally infected with trypanosoma vivax. **Veterinary Parasitology**, London, v. 143, p. 29-34, 2007.

AFFONSO, I. B.; AMORIL, J. G.; ALEXANDRINO, B.; BUZINARO, M. G.; MEDEIROS, A. S. R.; SAMARA, S. I. Anticorpos contra o herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) nas dez regiões de planejamento do Estado de Goiás, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 11, n. 4, p. 892-898, out./dez., 2010.

ASBIA – Associação Brasileira de Inseminação Artificial. **Relatório técnico anual**. Disponível em <<http://www.asbia.org.br>>. Acesso: 25 de maio de 2009.

BELKNAP, E.B.; COLLINS, J. K.; AYERS, V. K.; SCHULTHEISS, P. C. Experimental infection of neonatal calves with neurovirulent bovine herpesvirus type 1.3. **Veterinary Pathology**, Amsterdam v. 31, p. 358-365, 1994.

BITSCH. Infectious bovine rinotracheitis virus infection in bulls, with especial reference to preputial infection. **Applied Microbiology**, Washington, v. 26, n. 3, p. 337-343, 1973.

BORGES, L. A. **Influência da resposta vacinal contra o herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) nos parâmetros reprodutivos de vacas receptoras de embrião**. 2011. 63f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2011.

BRASIL, **Instrução Normativa n. 48, de 17 de junho de 2003**, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2003.

BRASIL, **Instrução Normativa n. 4, de 7 de fevereiro de 2013**, Ministério da Agricultura e Abastecimento, 2013.

BRASIL, **Instrução Normativa n. 51, de 4 de novembro de 2011**, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2011.

ENGELS, M.; ACKERMANN, M. Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 53, n. 1-2, p. 3-15, 1996.

GATTI, S. P.; AFFONSO, I. B.; DIAS, F. C.; MEDEIROS, A. S. R.; FERREIRA, F.; SAMARA, S. I. Títulos de anticorpos anti-herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) de bezerras em três rebanhos leiteiros do Estado de São Paulo, Brasil. **Ars Veterinária**, Jaboticabal, v. 26, n. 3, 147-152, 2010.

GIVENS, M. D.; MARLEY, M.S.D. Pathogens that cause infertility of bulls or transmission via semen. **Theriogenology**, Stoneham, v. 70, p. 504-507, 2008.

HENZEL, A. **Patogenia experimental da infecção genital aguda e latente pelo herpesvírus bovino tipo 1.2 em bezerras**. 2008. 43f. Tese (Doutorado), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2008.

KUMI-DIAKA, J.; DIAKAO, I.; BALE, O. J.; OGWU, D.; OSORI, D. Effect of brucella abortus infection on spermatogenesis three zebu bulls. **Theriogenology**, Stoneham, v. 14, n. 3, p. 167-171, 1980.

OIE. Office International des Épizooties. **Manual of standards for diagnostic test and vaccines**. Disponível em: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Healths_standards/tahm/2.04.13_IBR_IPV.pdf. Acesso em 8 de março de 2010.

LUNA, L. G. **Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology**. 3.ed. New York: McGraw-Hill, 1968. p. 12-20.

RUSENOVA, I.; BOCHEY, I. C. Comparison of the seroprevalence against some respiratory viruses in mixed sheep-goat herds in two regions of Bulgaria. **Trakia Journal of Sciences**, Sófia, v. 7, n. 4, p. 58-62, 2009.

VOGEL, F. S. F.; FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; WINKELMANN, E. R.; MORAES, M. P.; BRAGANÇA, J. F. M. Intrapreputial infection of young bulls with bovine herpesvirus type 1.2 (BHV-1.2): acute balanoposthitis, latent infection and detection of viral DNA in regional neural and non-neural tissues 50 days after experimental reactivation. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.98, p.185-196, 2004.

WHITMORE, H. L.; GUSTAFSSON, B. K.; HAVARESHTI, P.; DUCHATEAU, A. B.; MATHER, E. C. Inoculation of bulls with bovine virus diarrhea virus: excretion of virus in semen and effects on semen quality. **Theriogenology**, Stoneham, v. 9, n. 2, p.153-163, 1977.

YESILBAG, K.; GUNGOR, B. Seroprevalence of bovine respiratory viruses in North-Western Turkey. **Tropical Animal Health Production**, Oxford, v. 40, n. 1, p. 55-60, 2008.