

EVOLUÇÃO DA IMUNIDADE PASSIVA CONTRA O VÍRUS DA LEUCOSE BOVINA¹

Silvia O. Hübner², Rudi Weiblen³, Fernando L. Tobias⁴, Nilton Cancian⁴, Sonia A. Botton⁵, Marcelo Oliveira⁴ e Marildo Zanini⁴

ABSTRACT.- Hübner S.O., Weiblen R., Tobias F.L., Cancian N., Botton S.A., Oliveira M. & Zanini M. 1996. [Evolution of passive immunity against bovine leukemia virus.] Evolução da imunidade passiva contra o vírus da leucose bovina. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 16(2/3):87-90. Depto Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Santa Maria, Camobi-Campus, Santa Maria, RS 97119-900, Brazil.

The evolution of colostral antibodies to bovine leukemia virus (BLV) was examined by testing serum samples of female calves collected from birth to 270 days of age. To observe the levels of BLV-specific antibodies in dams in the peri-natal period, serum samples were collected between days 35 pre-partum and days 28 post-partum. The presence of antibodies was examined by agar gel immunodiffusion tests (AGID). One week after ingestion of colostrum 100% (49/49) of the heifers gave positive results for BLV antibodies. The number of antibody-positive heifers decreased progressively until animals became sero-negative by day 180 of age. From the 41 sero-positive dams tested during the peri-natal period, three (7.3%) became sero-negative at that time. These data suggest that serologic diagnostic of BLV infectious with AGID should be performed after the 6th month of age in calves in order to avoid false-positive results due to passively acquired maternal antibodies. Moreover, serologic diagnosis in pregnant cows between 2 weeks pre and 4 weeks "post-partum" may give rise to false-negative results.

INDEX TERMS: Bovine leukemia virus, colostral immunity.

SINOPSE.- A presença de anticorpos colostrais contra o vírus da leucose bovina (BLV), foi examinada através de análise de amostras de soro de terneiras coletadas desde o nascimento até 270 dias de idade. Também foram coletadas amostras de soro de vacas entre 35 dias antes do parto até 28 dias após o parto. As amostras foram examinadas pelo teste de imunodifusão em gel de ágar (IDGA). Uma semana após a ingestão de colostro, 100% (49/49)

das terneiras apresentaram anticorpos para o BLV. Posteriormente, houve uma queda progressiva do número de animais soropositivos, com o desaparecimento de níveis detectáveis de anticorpos até que todas as terneiras se tornassem soronegativas aos 180 dias de idade. De 41 vacas analisadas durante o período peri-parto, 3 (7,3%) apresentaram-se sorologicamente negativas neste período. Nas terneiras, os testes deverão ser realizados após o 6 mês de idade a fim de evitar resultados falso-positivos devido a anticorpos maternos passivamente adquiridos. Sugere-se também que para diagnóstico de infecções pelo BLV, a prova de IDGA seja realizada, nas vacas prenhes, somente até duas semanas antes do parto ou após 1 mês do parto.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Vírus da leucose bovina, imunidade colostrais.

INTRODUÇÃO

A infecção pelo vírus da leucose bovina (BLV) causa a enfermidade conhecida como leucose enzootica bovina

¹Aceito para publicação em 29 de julho de 1996.

Parte da tese de Mestrado do primeiro autor, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Rio Grande do Sul. Projeto parcialmente financiado pelo CNPq e FAPERGS.

²Médico Veterinário, autônomo.

³Depto de Medicina Veterinária Preventiva, Microbiologia e Parasitologia, UFSM, 97119-900, Santa Maria, RS, Fax (055) 226 2347; bolsista do CNPq. (Autor para correspondência)

⁴Acadêmico de Medicina Veterinária, UFSM; bolsista de iniciação científica do CNPq.

⁵Médico Veterinário, Pós-graduando em Medicina Veterinária, UFSM.

ou leucose bovina. A sua importância deve-se principalmente às restrições no mercado internacional e também por perdas na produção e produtividade dos animais infectados. Países que obtiveram êxito no controle da enfermidade não importam animais soropositivos (Johnson & Kaneene 1991). O fato do BLV difundir-se lentamente e os baixos índices de prevalência encontrados na maioria dos rebanhos leiteiros do Rio Grande do Sul fornecem condições para que sejam implementados programas para controlar ou erradicar esta infecção (Flores et al. 1990, Moraes et al. 1996).

Os animais uma vez infectados tornam-se portadores por toda vida (Fenner et al. 1987). Porém, as provas sorológicas rotineiramente utilizadas não diferenciam anticorpos de animais infectados de anticorpos de origem colostrar. Assim, terneiros que tenham ingerido colostro de vacas positivas para o BLV podem apresentar resultados falso-positivos nas provas sorológicas, caso os anticorpos recebidos passivamente ainda não tiverem desaparecido completamente (Johnson & Kaneene 1991). Há relatos variados sobre a duração dos anticorpos colostrais (Thurmond et al. 1982, Modena et al. 1984, Oshima et al. 1984, Villouta et al. 1990, Islas et al. 1992, Monke et al. 1992), sendo de grande interesse conhecer o tempo de duração desses anticorpos para que se possa realizar diagnósticos precoces da infecção.

Embora a prova de imunodifusão em gel de ágar (IDGA) seja considerada de alta especificidade e sensibilidade para a detecção de animais com infecções pelo BLV (Monke et al. 1992, Basilio et al. 1993), há relatos de que animais com baixas concentrações de anticorpos podem não responder a repetidos testes de IDGA (Miller et al. 1981, Van der Maaten et al. 1981a,b, Burrige et al. 1982, Roberts et al. 1988).

O presente trabalho teve como objetivo obter informações sobre a duração da imunidade passiva e sobre o comportamento sorológico de vacas prenhes positivas para BLV, sob as condições de criação de bovinos leiteiros da região central do estado do Rio Grande do Sul, através da análise de amostras de soro pela prova de IDGA.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais de experimentação

Vacas da raça Holandesa com diferentes idades e próximas do parto e suas filhas foram utilizadas no experimento. Os bovinos eram provenientes de uma propriedade produtora de leite tipo B da região central do Estado do Rio Grande do Sul. Somente fêmeas foram incluídas, pois o manejo da propriedade determinava que os machos fossem descartados logo após o nascimento. O manejo local também deliberou que após o nascimento as terneiras fossem afastadas de suas mães e colocadas em terneiras individuais. A fim de assegurar que houvesse ingestão de colostro, era fornecido um "pool" de colostro nos dois primeiros dias de vida. A partir disso, os animais recebiam uma mistura de leite "in natura" de várias vacas e, gradativamente, concentrado e feno foram incluídos na dieta. Aproximadamente aos dois meses de idade efetuava-se o desmame, quando as terneiras eram conduzidas para piquetes com até seis animais.

Material para exames

Para verificar a prevalência da infecção pelo vírus da leucose bovina (BLV) nas vacas, analisaram-se amostras de soro coletadas em torno de 28 dias antes do parto. Para acompanhar o comportamento sorológico do BLV nas vacas soropositivas, realizaram-se coletas desde os 35 dias pré-parto e, posteriormente, nos dias 28, 21, 14, 7, 3, e 1 antes do parto e, também, no dia do parto. Após o parto as coletas foram feitas semanalmente até 28 dias pós-parto. A coleta de sangue foi efetuada nas terneiras antes da ingestão de colostro e, às 6, 12 e 24 horas após a ingestão do colostro e aos 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 90, 120, 150, e 180, 210, 240 e 270 dias de idade.

Método sorológico

O teste de IDGA foi realizado para detectar anticorpos contra a principal glicoproteína do envelope (gp 51) do BLV, segundo técnica descrita por Miller & Van der Maaten (1977), com algumas modificações descritas por Flores et al. (1988). O antígeno foi produzido em células FLK (Romero & Rowe 1981), e era armazenado em alíquotas a uma temperatura de -18°C . O soro controle positivo foi obtido de um animal soropositivo para o BLV através de identidade de reação no teste de IDGA, e era igualmente armazenado em alíquotas e conservado a -18°C . Foram analisadas pela imunodifusão 298 amostras de soro correspondentes a coletas sucessivas de 41 vacas positivas, e 547 correspondentes a coletas sucessivas de 49 terneiras que se apresentaram positivas após a ingestão de colostro. As amostras eram consideradas positivas quando havia uma linha de identidade entre o antígeno e o soro testado e negativas quando não havia formação de uma linha de precipitação entre o poço da amostra e o do antígeno apresentando identidade com a linha do soro controle.

Análise estatística

Para verificar a evolução dos anticorpos para o BLV foi utilizado o método de regressão, conforme descrito por Steel & Torrie (1980).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O comportamento sorológico de 41 vacas foi acompanhado pela prova de IDGA, sendo que 3 (7,3%) apresentaram sorologia falsamente negativa neste período. Duas vacas apresentaram resultados sorológicos negativos aos 7 dias anteriores, e uma no dia do parto. A sorologia negativa manteve-se por alguns dias após o parto. Os resultados sorológicos destes três animais estão expressos na Figura 1.

A evolução dos anticorpos para o BLV está demonstrada na Figura 2. A análise estatística revelou um alto coeficiente de correlação ($R^2 = 0,92$) entre a frequência de animais positivos e a idade. Pela equação estimada pode-se esperar que 100,0% dos animais apresentem anticorpos aos 7 dias de vida, 36,82% aos 90 dias, 21,06% aos 120 dias e somente 15,36% dos animais possuam anticorpos contra a principal glicoproteína do envelope (gp 51) do BLV aos 180 dias. Através da equação obtida pela análise de regressão foi estimado uma queda progressiva na frequência de animais positivos em função da idade, sendo que 15,36% dos animais aos 180 dias de idade ainda eram sorologicamente positivos para o BLV (Fig. 2). Cabe ressaltar que

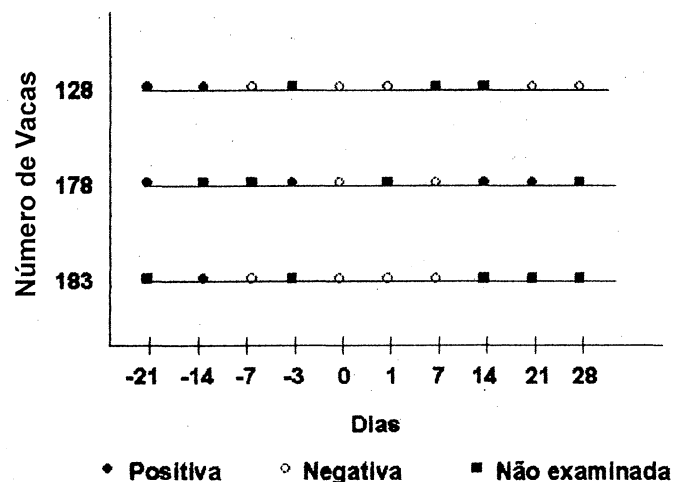


Fig. 1. Anticorpos contra o vírus da leucose bovina (BLV) em três vacas que apresentaram resultados sorológicos negativos quando testadas por imunodifusão em gel de ágar (IDGA) nas proximidades do parto.

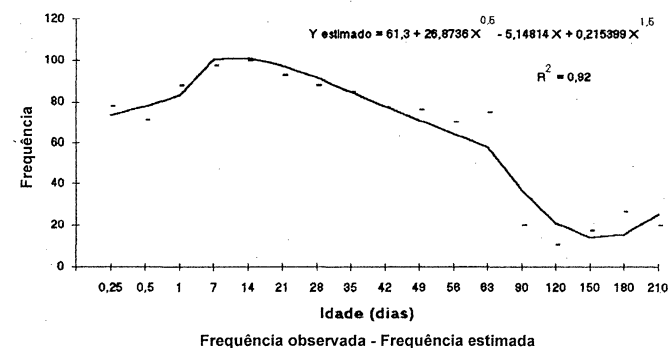


Fig. 2. Evolução dos anticorpos colostrais contra o vírus da leucose bovina (BLV) no soro de 49 terneiras, desde 6 horas após a ingestão do colostro até 210 dias após o nascimento, mensurados por imunodifusão em gel de ágar (IDGA).

foram incluídas na análise estatística um total de 13 animais. Oito terneiras filhas de vacas soronegativas para o BLV tornaram-se positivas após o consumo do "pool" de colostro. Três terneiras soroconverteram após sete dias de idade e duas terneiras que foram consideradas como infectadas in utero (animais soropositivos antes da ingestão de colostro). Ao serem retirados os animais com infecção intra-uterina pelo BLV e aqueles com infecção ativa, nos remanescentes houve desaparecimento dos anticorpos colostrais após 180 dias de idade, o que corrobora com os achados de Thurmond et al. (1982), Oshima et al. (1984), Islas et al. (1992) e Monke et al. (1992). Islas et al. (1992) detectaram uma duração dos anticorpos colostrais contra o BLV pela prova de imunodifusão em gel de ágar (IDGA) de até 4 meses, mas utilizando ensaios imunoenzimáticos (ELISA) a presença destes anticorpos prorrogou-se até os 6

meses de idade, o que pode ser explicado por uma maior sensibilidade do método ELISA em relação a IDGA. Modena et al. (1984) detectaram alguns terneiros positivos até 300 dias de idade, mas presumiram não ser devido a imunidade passiva, e sim à infecção intra-uterina ou através do colostro ou leite. Villouta et al. (1990) relatam a única descrição de persistência da imunidade passiva para o BLV em animais com até 8 meses de idade. O trabalho de Thurmond et al. (1982) mostrou que 50% dos terneiros tornaram-se sorologicamente negativos aos 95 dias de idade. No presente estudo somente 36,82% possuíam anticorpos ao 90º dia após o nascimento. Possíveis causas das variações encontradas na duração dos anticorpos colostrais para BLV podem ser devido à falta de padronização da técnica de IDGA, bem como à ingestão de colostro em diferentes quantidades e com variadas concentrações de anticorpos específicos, como já postulado por Thurmond et al. (1982). Os achados permitem a afirmação que para o diagnóstico sorológico de infecções pelo BLV, os testes devem ser realizados a partir do 6º mês de vida. A partir dessa idade provavelmente os animais estão suscetíveis à infecção por esse agente.

Os anticorpos foram considerados como consequência de infecção ativa nas terneiras que, após pelo menos dois testes negativos consecutivos, realizados num período de 30 dias, voltaram a apresentar sorologia positiva pela prova de IDGA, conforme Oshima et al. (1981), Roberts et al. (1982), Shettigara et al. (1986) e Monke et al. (1992). A infecção ativa foi detectada após a transferência dos animais de seus currais individuais para piquetes onde eram agrupados em aproximadamente seis animais. A infecção nos piquetes provavelmente ocorreu subsequente ao agrupamento dos animais em lotes.

Das 41 vacas positivas para a presença de anticorpos contra o BLV, três (7,3%) apresentaram-se falsamente negativas no período peri-parto (Fig. 2) e as demais mantiveram-se positivas durante o período de 35 dias antes do parto até 28 dias após o parto. Esses resultados concordam com o trabalho de BurrIDGE et al. (1982) que detectaram uma queda significativa no título de anticorpos na época do parto, através das provas de IDGA e radioimunoprecipitação. Quedas em duas a três diluições no título de anticorpos para BLV entre 1 mês pré-parto e o parto, foram apresentadas por 44% das vacas. Todas, com exceção de uma, mostraram aumento no título dentro de 1 mês pós-parto. Van der Maaten et al. (1981a,b), Miller et al. (1981) e Roberts et al. (1988) também obtiveram sorologia falsamente negativa pela prova de IDGA em animais com baixos títulos de anticorpos. A diminuição no nível de anticorpos é explicada pela transferência maciça de imunoglobulinas para o colostro no período que antecede o parto (Brandom et al. 1971, Logan et al. 1973, Sasaki et al. 1976). Duas vacas do presente estudo tiveram sorologia negativa a partir do 7º dia antes do parto e somente uma a partir do dia do parto. Esses achados concordam com Sasaki et al. (1976), os quais encontraram transferência máxima de imunoglobulinas entre 1 a 3 dias antes do parto e, uma

concentração de imunoglobulinas na secreção mamária imediatamente antes do parto, de 10 a 15 vezes maior do que a encontrada no plasma materno. Porém, contraria a afirmação de Johnson & Kaneene (1991) de que as vacas devem ser testadas pelo menos 6 semanas antes do parto, e também a Brandom et al. (1971) que acreditam que o nível de imunoglobulinas alcança uma máxima concentração na glândula mamária e uma máxima diminuição na circulação sanguínea materna 2 a 3 semanas antes do parto, períodos em que as vacas desse estudo ainda apresentaram-se soropositivas. No entanto, deve ser ressaltado aqui que, embora a sorologia falsamente negativa sugira uma queda no título de anticorpos, no presente estudo não foram titulados os anticorpos para o BLV.

Baseados nos dados obtidos nesse estudo fica evidente que os testes sorológicos devem ser realizados no máximo até 2 semanas antes do parto, ou então somente após 1 mês do parto, para minimizar a chance de que vacas infectadas pelo BLV sejam mantidas no rebanho como sendo livres da infecção.

REFERÊNCIAS

- Basilio J.I.M., Tavera F.J.T., Aluja A.S. & Escamilla R.M.G. 1993. Estudio comparativo entre las pruebas de ELISA e inmunodifusión en el diagnóstico de la Leucosis Enzoótica Bovina. *Vet. Méx.* 24(1):21-25.
- Brandom M.R., Watson D.L. & Lascelles A.K. 1971. The mechanism of transfer of immunoglobulin into mammary secretion of cows. *Aust. J. Biol. Med. Sci.* 49:613-623.
- Burridge M.J., Thurmond M.C., Miller J.M., Schmerr M.J.F. & Van der Maaten M.J. 1982. Fall in antibody titer to bovine leukemia virus in the periparturient period. *Can. J. Comp. Med.* 46:270-271.
- Fenner F., Bachmann A., Gibbs E.P.J., Murphy F.A., Studdert R.R.M.J. & White D.O. 1987. *Veterinary Virology*. Academic Press, New York. 659p.
- Flores E.F., Weiblen R., Pereira N.M., Portolan J.A.B. & Chielle L.L. 1988. Prevalência de anticorpos contra o vírus da leucose bovina (VLB) no rebanho leiteiro de Santa Maria, RS. *Revta Centro Ciênc. Rurais, Sta Maria*, 18(1):67-73.
- Flores E.F., Weiblen R. & Rebelatto M.C. 1990. Aspectos epidemiológicos da infecção pelo vírus da leucose bovina (VLB) na região central do Rio Grande do Sul. *Hora Vet., Porto Alegre*, 58:25-29.
- Islas A.L., López J.M., Montes G.O., Bórques F.S. & Torres C.S. 1992. Detección de anticuerpos antivírus de la leucosis enzoótica bovina en terneros de lechería alimentados con calostro de vacas soropositivas en los primeros meses de vida. *Av. Cienc. Vet.* 7(1):51-55.
- Johnson R. & Kaneene J.B. 1991. Bovine Leukemia Virus. Part IV. Economic impact and control measures. *Comp. Cont. Educ. Pract. Vet.* 13(11):1727-1737.
- Logan E.F., Penhal W.J. & Jones R.A. 1973. Changes in serum immunoglobulin levels of colostrum fed calves during the first twelve weeks postpartum. *Res. Vet. Sci.* 14: 394-397.
- Miller J.M. & Van der Maaten M.J. 1977. Use of glycoprotein antigen in the immunodiffusion test for bovine leukemia virus antibodies. *Europ. J. Cancer.* 13:1369-1375.
- Miller J.M., Schmerr M.J.F. & Van der Maaten M.J. 1981. Comparison of four serologic tests for the detection of antibodies to bovine leukemia virus. *Am. J. Vet. Res.* 42:5-8.
- Modena C.M., Leite R.C. & Moreira E.C. 1984. Evolução sorológica da leucose enzoótica bovina em bezerros. *Arqs Fac. Vet. UFRGS, Porto Alegre*, 12:93-97.
- Monke D.R., Rohde R.F., Hueston W.D. & Milburn R.J. 1992. Estimation of the sensitivity and specificity of the agar gel immunodiffusion test for bovine leukemia virus: 1,296 cases (1982-1989). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 200(12):2001-2004.
- Moraes M.P., Weiblen R., Flores E.F., Oliveira I.C.D., Rebelatto M.C., Zanini M., Rabuske M., Hübner S.O. & Pereira N.M. 1996. Levantamento sorológico da infecção pelo vírus da leucose bovina nos rebanhos leiteiros do Estado do Rio Grande do Sul. *Ciência Rural.* 26(2):257-262.
- Oshima K., Okada K., Numakunai S., Yoneyama Y., Sato S. & Takahashi K. 1981. Evidence on horizontal transmission of bovine leukemia virus due to blood-sucking tabanid flies. *Jpn. J. Vet. Sci.* 43: 79-81.
- Oshima K., Morimoto N., Kagawa Y., Numakuna S., Hirano T. & Kayano H. 1984. A survey for maternal antibodies to bovine leukemia virus (BLV) in calves born to cows infected with BLV. *Jpn. J. Vet. Sci.* 46(4):583-586.
- Roberts D.H., Lucas M.H., Wibberley G. & Chasey D. 1982. An investigation into the susceptibility of cattle to bovine leukosis virus following inoculation by various routes. *Vet. Rec.* 110:222-224.
- Roberts D.H., Lucas M.H., Wibberley G. & Westcott D. 1988. Response of cattle persistently infected with bovine virus diarrhoea virus to bovine leukosis virus. *Vet. Rec.* 122:293-296.
- Romero C.H. & Rowe C.A. 1981. Enzootic bovine leukosis in Brazil. *Trop. Anim. Hlth Prod.* 13:107-111.
- Sasaki M., Davis C.L. & Larson B.L. 1976. Production and turnover of IgG1 and IgG2 immunoglobulins in the bovine around parturition. *J. Dairy Sci.* 59:2046-2055.
- Shettigara P.T., Saagh B.S. & Lobinowich E.M. 1986. Eradication of bovine leukemia virus infection in commercial dairy herds using the agar gel immunodiffusion test. *Can. J. Vet. Res.* 50(2):221-226.
- Steel R.G.D. & Torrie J.H. 1980. *Principles and Procedures of Statistics - A Biometrical Approach*. McGraw-Hill, New York. 633p.
- Thurmond M.C., Carter R.L., Puhr D.M. & Burridge M.J. 1982. Decay of colostrum antibodies to bovine leukemia virus with application to detection of calfhood infection. *Am. J. Vet. Res.* 43(7):1152-1155.
- Van der Maaten M.J., Miller J.M. & Schmerr M.J.F. 1981a. In utero transmission of bovine leukemia virus. *Am. J. Vet. Res.* 42(6):1052-1054.
- Van der Maaten M.J., Miller J.M. & Schmerr M.J.F. 1981b. Effect of colostrum antibody on bovine leukemia virus infection of neonatal calves. *Am. J. Vet. Res.* 42(9):1498-1500.
- Villouta G.C., Segovia P.C., Montes G.O. & Durán K.Y. 1990. Duración y títulos de anticuerpos colostrales antivírus leucemia bovina y transmisión natural de la infección en terneras de un predio de la región metropolitana, Chile. *Av. Cienc. Vet.* 5(2):114-118.