

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**IMUNOGENICIDADE DE VACINAS INATIVADAS
CONTRA O HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 1 (BoHV-1)
E VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA (BVDV) EM
BOVINOS E COBAIOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Letícia Frizzo da Silva

**Santa Maria, RS, Brasil
2006**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**IMUNOGENICIDADE DE VACINAS INATIVADAS CONTRA
O HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 1 (BoHV-1) E VÍRUS DA
DIARRÉIA VIRAL BOVINA (BVDV) EM BOVINOS E
COBAIOS**

Por

Letícia Frizzo da Silva

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Medicina Veterinária Preventiva, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária.**

Orientador: Prof. Eduardo Furtado Flores, PhD

Santa Maria, RS, Brasil
2006

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**IMUNOGENICIDADE DE VACINAS INATIVADAS CONTRA O
HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 1 (BoHV-1) E VÍRUS DA DIARRÉIA
VIRAL BOVINA (BVDV) EM BOVINOS E COBAIOS**

elaborada por
Letícia Frizzo da Silva

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária

COMISSÃO EXAMINADORA:

Eduardo Furtado Flores, PhD, UFSM
(Presidente/Orientador)

Luizinho Caron, Dr.

Valéria Maria Lara Carregaro, Dr., UFSM

Santa Maria, 8 de maio de 2006.

AGRADECIMENTOS

Aos Professores Eduardo e Rudi, por terem me ensinado valores verdadeiros em âmbito profissional, administrativo e pessoal. A presença deles foi um exemplo constante de dedicação, caráter e comprometimento, não só com o Setor de Virologia, mas também com a Universidade Federal de Santa Maria.

A minha família, especialmente aos meus pais Elói e Cecília e a dinda Ignês. Os meus pais, mesmo longe, estiveram sempre presentes. Foi nas palavras doces e consoladoras da minha mãe e no exemplo de perseverança do meu pai que eu busquei força para superar os momentos difíceis, assim como foi com eles que eu compartilhei as conquistas. A dinda Ignês, por ter me acolhido em sua casa durante toda a minha graduação e mestrado.

A todos os colegas do Setor de Virologia. A presença incondicional de todos foi de fundamental importância para a realização do meu trabalho. Além dos conhecimentos, também foram compartilhados amizades verdadeiras, coleguismo e parceria.

Ao Sr. Alfredo Flores, pelo empréstimo dos animais e disponibilidade dos funcionários para a realização dos trabalhos à campo.

Ao Laboratório Vallée S.A. pelo suporte financeiro da minha bolsa de mestrado.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

IMUNOGENICIDADE DE VACINAS INATIVADAS CONTRA O HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 1 (BoHV-1) E VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA (BVDV) EM BOVINOS E COBAIOS

AUTORA: LETÍCIA FRIZZO DA SILVA
ORIENTADOR: EDUARDO FURTADO FLORES
Santa Maria, 8 de maio de 2006.

O presente estudo descreve a avaliação de cobaios como modelo experimental para testes de imunogenicidade de antígenos inativados do herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e do vírus da diarreia viral bovina (BVDV); e um teste de vacinas comerciais em bovinos. O teste em cobaios foi realizado com uma formulação experimental inativada contendo antígenos do BoHV-1 e BVDV. Bovinos (n=10) e cobaios (n=60) foram imunizados duas vezes, com intervalo de 28 dias e testados para a presença de anticorpos neutralizantes 28 dias após a segunda dose. Os bovinos foram imunizados com a dose recomendada para a espécie (5mL), enquanto os cobaios foram distribuídos em seis grupos e imunizados com doses fracionadas (0,005mL a 1,6mL). Quando testados frente ao BoHV-1, doses equivalentes a 1/16 (0,320mL) e 1/8 (0,640mL) da dose bovina induziram nos cobaios títulos médios geométricos (GMTs) de anticorpos neutralizantes de 6,56 e 7,46 respectivamente. Esses títulos foram estatisticamente semelhantes ($P>0,05$) ao GMT do grupo de bovinos (GMT:8). Para o BVDV, nenhuma relação recíproca entre os títulos neutralizantes dos cobaios e bovinos pode ser estabelecida. O GMT (38) do grupo de bovinos foi superior aos GMTs de todos os grupos de cobaios ($P<0,05$). Esses resultados confirmam a adequação dessa espécie para a avaliação da resposta sorológica induzida por imunógenos inativados do BoHV-1 e indicam que futuros ajustes são necessários para se determinar doses em cobaios que induzam títulos equivalentes aos dos bovinos frente ao BVDV. Na segunda etapa do trabalho, avaliou-se o potencial imunogênico de seis vacinas comerciais inativadas disponíveis em mercado no Brasil: uma vacina brasileira (BR), uma produzida nos Estados Unidos (US), duas no Uruguai (UR1 e UR2) e duas na Argentina (ARG1 e ARG2). Para isso, 57 bovinos foram imunizados duas vezes (dias 0 e 21) e testados para presença de anticorpos neutralizantes frente ao BoHV-1, BoHV-5 e BVDV, 21 dias após a segunda dose. A vacina US foi a mais imunogênica e induziu títulos neutralizantes (2 a ≥ 256 , GMT:38) superiores as demais ($P<0,05$). A vacina UR1 induziu títulos neutralizantes (2 a ≥ 256 , GMT:20,2) de magnitude superior aos induzidos pelas vacinas BR (2 a 32, GMT:8,7), UR2 (4 a 32, GMT:7,3), ARG1 (<2 a 16, GMT:10) e ARG2 (2 a 16, GMT:6,3) ($P<0,05$), que não diferiram entre si ($P>0,05$). Os títulos neutralizantes anti-BoHV-5 foram inferiores aos anti-BoHV-1 em todos os grupos vacinais, porém nos grupos BR, ARG1 e ARG2 essas diferenças não foram significativas ($P>0,05$). Somente os bovinos imunizados com a vacina US soroconverteram ao BVDV em títulos entre 5 e ≥ 320 (BVDV-1) e entre <5 e 80 (BVDV-2). A falha da maioria das vacinas em induzir níveis adequados de anticorpos indica a necessidade de se reavaliar os critérios para a produção, licenciamento e/ou importação de vacinas contra esses vírus.

Palavras-chave: vacinas, herpesvírus bovino tipo 1, BoHV-1, vírus da diarreia viral bovina, BVDV, modelo experimental, cobaios.

ABSTRACT

Master's Dissertation
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

IMMUNOGENICITY OF BOVINE HERPESVIRUS TYPE 1 (BoHV-1) AND BOVINE VIRAL DIARRHEA VIRUS (BVDV) INACTIVATED VACCINES IN CATTLE AND GUINEA PIGS

AUTHOR: LETÍCIA FRIZZO DA SILVA
ADVISER: EDUARDO FURTADO FLORES
Santa Maria, May, 8th, 2006.

The present study describes the evaluation of guinea pigs as a model to test bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1) and bovine viral diarrhoea virus (BVDV) inactivated vaccines; and a test of immunogenicity of commercial vaccines in cattle. Guinea pigs (60) and calves (10) were immunized twice with a 28 days interval and tested for virus neutralizing (VN) antibodies. Calves were immunized with the recommended dose (5mL), while the guinea pigs were distributed in six groups and immunized with fractionated doses (0.005 to 1.6mL). Guinea pigs immunized with 1/16 (0.320mL) and 1/8 (0.640mL) of the bovine dose developed BoHV-1 VN titers (GMTs) of 6.56 and 7.46, respectively. These titers were equivalent to the titers developed by calves (GMT:8) ($P>0.05$). In contrast, it was not possible to establish equivalent serological responses to BVDV between guinea pigs and cattle. The GMT (38) developed by the bovine group was higher than all guinea pigs groups ($P<0.05$). These data indicate that guinea pigs are adequate models for evaluation of serological response induced by BoHV-1 inactivated vaccines. Future studies are needed to adjust the vaccine dose that would induce in guinea pigs an serological response to BVDV equivalent to that in cattle. The second part of this study evaluated the immunogenicity of six commercial vaccines available in Brazil: a Brazilian (BR), one produced in the United States (US), two in Uruguay (UR1 and UR2) and Argentina (ARG1 and ARG2). To this purpose, fifty-seven calves were immunized twice (days 0 and 21) and tested for BoHV-1, BoHV-5 and BVDV VN antibodies. The US vaccine was the most immunogenic and induced VN titers higher than the others (2 a ≥ 256 , GMT:38) ($P<0.05$). The UR1 vaccine induced VN titers (2 to ≥ 256 , GMT:20,2) higher than those induced by the BR (2 a 32, GMT:8.7), UR2 (4 a 32, GMT:7.3), ARG1 (<2 a 16, GMT:10) e ARG2 (2 a 16, GMT:6.3) vaccines ($P<0.05$); which were not different among them ($P>0.05$). The BoHV-5 VN titers were lower than BoHV-1 in all groups; however in BR, ARG1 and ARG2 groups, these differences were no significant ($P>0.05$). Only the calves immunized with the US vaccine seroconverted to BVDV and this vaccine induced titers between 5 and ≥ 320 (BVDV-1) and <5 and 80 (BVDV-2). The low titers induced by most vaccines indicate the need for reviewing the criteria for licensing and/or import of vaccines against these viruses.

Key words: vaccines, bovine herpesvirus type 1, BoHV-1, bovine viral diarrhoea virus, (BVDV), experimental model, guinea pigs.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

FIGURA 1 – Correlação entre dose vacinal e títulos médios geométricos (GMTs) de anticorpos neutralizantes contra o herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) (A) e vírus da diarreia viral bovina (BVDV) (B) em cobaios imunizados com doses fracionadas de uma vacina experimental inativada.....33

CAPÍTULO 2

FIGURA 1 – Evolução dos títulos médios geométricos (GMTs) de anticorpos neutralizantes contra os herpesvírus bovinos tipos 1 (BoHV-1) (A) e 5 (BoHV-5) (B) em bovinos imunizados com seis vacinas comerciais inativadas.....54

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

TABELA 1 – Resposta sorológica de bovinos e cobaios imunizados com uma vacina inativada contra o herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e o vírus da diarreia viral bovina (BVDV) 28 dias após a revacinação	33
--	----

CAPÍTULO 2

TABELA 1 – Grupos vacinais com os respectivos antígenos e adjuvantes submetidos ao teste de imunogenicidade.....	52
TABELA 2 – Resposta sorológica de bovinos imunizados com seis vacinas comerciais inativadas frente aos herpesvírus bovinos tipos 1 (BoHV-1) e 5 (BoHV-5), 21 dias após a revacinação	53

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. CAPÍTULO 1. COBAIOS COMO MODELO PARA AVALIAÇÃO DA IMUNUNOGENICIDADE DE VACINAS INATIVADAS CONTRA O HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 1 E VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA	19
Resumo.....	20
Abstract.....	21
Introdução.....	21
Material e métodos.....	23
Resultados e discussão.....	25
Conclusões.....	29
Referências	29
3. CAPÍTULO 2. ANTICORPOS NEUTRALIZANTES CONTRA OS HERPESVÍRUS BOVINO TIPOS 1 E 5 E VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA EM BOVINOS IMUNIZADOS COM VACINAS COMERCIAIS INATIVADAS.....	35
Resumo.....	36
Abstract.....	37
Introdução.....	38
Material e métodos.....	40
Resultados e discussão.....	42
Conclusões.....	47

Referências	47
4. CONCLUSÕES.....	55
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

1. INTRODUÇÃO

As infecções pelos herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e vírus da diarréia viral bovina (BVDV) são endêmicas na maioria dos países do mundo. A alta prevalência dessas infecções, em combinação com as perdas reprodutivas e as más condições de sanidade dos rebanhos atingidos resultam em perdas econômicas significativas para a bovinocultura desses países. Conseqüentemente, esforços para controlar ou mesmo erradicar essas infecções têm sido sistematicamente empregados (LINDBERG & HOUE, 2005; VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, 2006).

Uma variedade de vacinas para o controle desses vírus encontra-se disponível. As vacinas comumente utilizadas incluem formulações inativadas do vírus ou vírus vivo modificado [MLV] (VAN OIRSCHOT et al., 1999; VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, 2006). Essas vacinas podem conter antígenos de um só agente ou a combinação de antígenos dos vírus envolvidos no complexo das doenças respiratórias dos bovinos (BRD) e/ou em perdas reprodutivas. As formulações mais comuns incluem antígenos do BoHV-1, BVDV, vírus sincicial respiratório bovino (BRSV), vírus da parainfluenza tipo 3 (PI₃V) (FULTON et al., 1995; PETERS et al., 2004).

Em geral, as vacinas atenuadas têm induzido níveis superiores de proteção contra o BoHV-1 e BVDV do que as vacinas inativadas (BOSCH et al., 1996, VAN OIRSCHOT et al., 1999; KOVÁCS et al., 2003; PATEL, 2005a), porém não são totalmente seguras e podem estar associadas a abortos e reversão da virulência (BOLIN, 1995). Em consequência disso, uma tendência para o desenvolvimento de vacinas não replicativas tem sido observada na indústria de biológicos. Dentre essas, destacam-se as vacinas de subunidade, vacinas de DNA e RNA e vacinas recombinantes utilizando vetores virais. As abordagens para eleição do antígeno a ser deletado ou o imunogênico têm como alvo principal as glicoproteínas E (gE) e D (gD) do BoHV-1 (KERKHOF et al., 2003; TOUSSAINT et al., 2005) e a glicoproteína de envelope E2 (E2/gp53) do BVDV (BRUSCHKE et al., 1999; ELAHI et al., 1999; NOBIRON et al., 2005).

1.1 Herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1)

O BoHV-1 pertence à família *Herpesviridae*, à subfamília *Alphaherpesvirinae* e ao gênero *varicellovirus* (ROIZMANN et al., 1992). O BoHV-1 é um vírus neurotrópico que está associado a uma variedade de afecções clínicas, incluindo rinotraqueíte (IBR), conjuntivite,

infecções genitais e abortos (ENGELS & ACKERMANN, 1996). A infecção é mais severa em animais jovens, nos quais está geralmente associada com a BRD ou “febre dos transportes” (YATES, 1982). Em animais adultos, a infecção pelo BoHV-1 resulta geralmente em infecções mais brandas, porém, freqüentemente associadas com redução da fertilidade e abortos (ENGELS & ACKERMANN, 1996). Após infecção aguda, o BoHV-1 é capaz de estabelecer infecção latente nos gânglios sensoriais e autonômicos, cuja reativação é um importante mecanismo de manutenção e disseminação do vírus na natureza (JONES, 1998).

Um fator determinante no controle da infecção pelo BoHV-1 é evitar a disseminação do vírus no rebanho e, conseqüentemente, o estabelecimento da latência. A vacinação portanto, além de prevenir a doença clínica, deve reduzir a excreção viral em animais infectados pela primeira vez e a re-excreção em animais latentemente infectados (VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, 2006). No entanto, nenhuma vacina atualmente disponível contra o BoHV-1 é totalmente efetiva em prevenir a infecção primária e o estabelecimento de latência (PATEL, 2005a;b). Nesse sentido, programas de erradicação do BoHV-1 devem adotar medidas rigorosas de controle, incluindo além de vacinações repetidas, a remoção dos bovinos soropositivos (POSPISIL et al., 1996). Na Alemanha, o programa de erradicação do BoHV-1 é fundamentado em dois preceitos: eliminação dos soropositivos e imunização com vacinas convencionais em regiões com baixa prevalência e vacinas diferenciais em regiões com alta prevalência (VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, 2006).

A ausência de uma vacina totalmente efetiva no controle do BoHV-1 está relacionada a diferentes fatores. Neonatos são altamente susceptíveis à infecção pelo BoHV-1 no período entre o nascimento e o desmame. Nessa fase, além de possuírem um sistema imunológico imaturo para montar uma resposta em nível de Th1, os anticorpos maternos interferem na eficácia das vacinas convencionais vivas e inativadas (HOLT, 2003). Além disso, para ser efetiva, a vacinação contra o BoHV-1 deve atuar nos dois aspectos da resposta imunológica: humoral e celular. BABIUK et al. (1996) sugerem que anticorpos neutralizantes são efetivos na prevenção da infecção secundária e rápida eliminação do vírus após a reativação da infecção latente, enquanto a imunidade mediada por células está associada à recuperação da infecção primária pelo BoHV-1. No entanto, a maioria das vacinas disponíveis são somente inativadas ou atenuadas. Alguns estudos demonstram que vacinas inativadas induzem imunidade predominantemente humoral, enquanto vacinas vivas estimulam predominantemente a imunidade celular (BOSCH et al., 1996). Somente recentemente a

combinação de antígenos de vírus inativado e vírus vivo na mesma vacina têm sido sugerida (FULTON et al., 2003a; KERKHOFS et al., 2003).

Apesar de muitas vacinas disponíveis induzirem títulos de anticorpos neutralizantes de magnitude elevada, nenhuma relação entre títulos neutralizantes e proteção frente ao BoHV-1 está estabelecida (PATEL, 2005a). Os resultados dos estudos são contraditórios. POSPISIL et al. (1996) demonstraram que títulos entre 32 e 128, induzidos por vacinas inativadas, conferiram proteção da infecção respiratória e intra-uterina. Porém, títulos semelhantes ou superiores variaram em nível de proteção, tanto no que diz respeito à redução da excreção viral como dos sinais clínicos (BOSCH et al., 1996; PATEL, 2005b). Por outro lado, FLORES et al., (1993) demonstraram que títulos entre <2 e 4, induzidos por uma vacina de vírus vivo recombinante, conferiram proteção satisfatória perante desafio. Resultados promissores foram obtidos a partir da combinação de antígenos de vírus inativado e MLV em diferentes protocolos de imunização. Em todos os protocolos testados, a vacina inativada foi responsável pelos melhores índices de proliferação linfocitária e redução da excreção viral (KERKHOFS et al., 2003).

Vários países europeus já erradicaram o BoHV-1 (Noruega, Dinamarca, Áustria, Suécia, Suíça, Finlândia) enquanto outros estão implementando programas para a erradicação (Alemanha). Paralelamente a esses programas, surgiram as vacinas diferenciais, que permitem a distinção entre animais vacinados e infectados naturalmente, sendo essas fundamentais para o sucesso da erradicação (VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, 2006). Resultados promissores já foram obtidos com vacinas diferenciais contra o BoHV-1. Proteção clínica e redução da excreção viral foram induzidos por vacinas recombinantes deletadas nos genes das glicoproteínas C (gC-) (FLORES et al., 1993) e E (gE-) (KAASHOEK et al., 1995), bem como por uma vacina de subunidade baseada na glicoproteína D (gD) (VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK et al., 1994). Atualmente encontram-se disponíveis vacinas deletadas no gene da glicoproteína E (gE) nas formulações viva e inativada, e são amplamente utilizadas na Europa (VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, 2006). Acompanhando essas vacinas, vários testes de diagnóstico baseados na detecção de anticorpos contra a gE estão disponíveis para monitorar os rebanhos (VAN OIRSCHOT et al., 1997).

No Brasil, pesquisas destinadas à elaboração de uma vacina diferencial contra o BoHV-1 também estão sendo realizadas. Uma vacina de vírus recombinante (gE-) demonstrou atenuação, imunogenicidade e efeito protetor frente ao desafio com o vírus homólogo e subsequente reativação (FRANCO et al., 2002a;b). Posteriormente, verificou-se que essa vacina é segura para ser utilizada em fêmeas gestantes e que o vírus vacinal não se

dissemina horizontalmente no rebanho (SPILKI et al., 2005), porém confere proteção limitada frente ao desafio com BoHV-5 (SILVA et al., 2006).

Vacinas de DNA apresentam algumas vantagens quando comparadas com os imunógenos atenuados convencionais. Essas vacinas não são propensas a contaminações com outros vírus, induzem uma resposta imunológica em nível de Th1/Th2 balanceada e induzem imunidade em neonatos, mesmo na presença de anticorpos adquiridos passivamente (BABIUK et al. 2003). No entanto, vacinas de DNA contra o BoHV-1 ainda são pouco imunogênicas. Em consequência disso, novas abordagens visando ampliar o potencial imunogênico dessas vacinas têm sido adotadas. A revacinação com uma vacina inativada gE-de bovinos previamente imunizados com uma vacina de DNA expressando a gD conferiu títulos significativamente superiores aos obtidos nos bovinos imunizados somente com a vacina de DNA (TOUSSAINT et al., 2005). Uma amplificação da resposta imunológica também foi demonstrada a partir da imunização de camundongos com plasmídios expressando a gD truncada fusionada com a proteína do tegumento VP22 (ZHENG et al., 2005).

1.2 Vírus da diarreia viral bovina (BVDV)

O BVDV é um vírus pertencente à família *Flaviviridae* e ao gênero *pestivirus* (HORZINEK, 1991). Existem dois genótipos predominantes, o BVDV-1 e o BVDV-2, e dentro do genótipo BVDV-1 existem os subgenótipos BVDV-1a e BVDV-1b (RIDPATH & BOLIN, 1998). O BVDV possui ainda os biotipos citopático e não citopático, de acordo com o efeito viral em cultivo celular (LINDENBACH & RICE, 2001). A infecção pelo BVDV pode resultar em diferentes afecções, que variam desde infecções subclínicas até doença severa, envolvendo um ou mais órgãos ou sistemas. Historicamente, o BVDV foi associado com enfermidade do trato digestivo relacionada à alta mortalidade. Atualmente, o BVDV está mais frequentemente associado à enfermidade respiratória e infecção fetal (BAKER, 1995). Dependendo da idade do feto exposto, a infecção pelo BVDV pode resultar em abortos, natimortos, malformações congênitas e animais persistentemente infectados (PI). Animais PI excretam continuamente o vírus, constituindo-se a principal fonte de manutenção e transmissão da infecção nos rebanhos (BROWNLIE, 1991; BAKER, 1995).

A escolha da estratégia mais adequada para a profilaxia e controle da infecção pelo BVDV depende basicamente das condições específicas de cada rebanho. Em geral, essas estratégias consistem na prevenção da entrada de animais PI e/ou remoção desses das propriedades, além da utilização de vacinas (VAN OIRSCHOT et al., 1999; FULTON &

BURGE, 2001). Entretanto, as únicas abordagens que têm sido bem sucedidas na redução do impacto decorrente da infecção pelo BVDV são aquelas onde se dá ênfase a medidas de biossegurança em geral, com ou sem o uso de vacinas (LINDBERG, 2003).

O objetivo principal da vacinação deve ser a prevenção da infecção transplacentária, conseqüentemente das perdas reprodutivas, e a geração de animais PI (VAN OIRSCHOT et al., 1999; LINDBERG, 2003). No entanto, existe um certo ceticismo com relação a eficácia das vacinas contra o BVDV. Em muitos países europeus, a vacinação tem sido utilizada há pelo menos quatro décadas, sem nenhuma redução perceptível da prevalência da infecção (O'ROURKE, 2002). Além disso, o uso indiscriminado de vacinas contra o BVDV-1 pode ter resultado na evolução, emergência e disseminação do BVDV-2, inicialmente nos Estados Unidos e posteriormente na Europa (MOENNIG et al., 2005a).

Vários fatores têm sido associados à falta de uma vacina totalmente efetiva para o controle do BVDV. A espécie BVDV abrange um grupo heterogêneo de vírus que variam em suas características antigênicas, biológicas e virulência. Enquanto benéfica para a sobrevivência viral, a diversidade antigênica gera implicações práticas para o diagnóstico, produção de vacinas e programas de controle da enfermidade (BOTTON et al., 1998; FLORES et al., 2002; FULTON et al., 2003b). Os dois genótipos predominantes, BVDV-1 e BVDV-2, são antigenicamente distintos, sobretudo na região da glicoproteína E2/gp53 (PELLERIN et al., 1994). A E2/gp 53 é a principal glicoproteína do vírion e está envolvida na indução de anticorpos neutralizantes e proteção (DONIS et al., 1995). Por isso, a reatividade sorológica e a proteção cruzada entre BVDV-1 e BVDV-2 são geralmente muito baixas, o que prejudica a eficácia das vacinas (FLORES et al., 2000).

Os programas de vacinação adotados até recentemente têm utilizado imunógenos contendo predominantemente o genótipo BVDV-1. A emergência ou reemergência do genótipo BVDV-2 questiona o potencial dessas vacinas em induzirem anticorpos que neutralizem o BVDV-2. Estudos demonstraram que vacinas convencionais induzem títulos superiores para o genótipo homólogo (BVDV-1) do que para o genótipo heterólogo (BVDV-2) (FULTON & BURGE, 2001; VOGEL et al., 2002). Portanto, as vacinas obrigatoriamente deveriam conter amostras virais de ambos os genótipos e representativas dos isolados locais, para assim reagir com uma gama maior de isolados de BVDV (FLORES et al., 2005).

Outro aspecto a ser superado é a elucidação dos mecanismos imunológicos relacionados à proteção contra o BVDV. Provavelmente, diferentes mecanismos estão relacionados com a proteção da infecção pós-natal e congênita (VAN OIRSCHOT et al., 1999). Anticorpos neutralizantes parecem estar envolvidos na prevenção da infecção pós-natal

(BOLIN & RIDPATH, 1996), enquanto sugere-se que a imunidade mediada por células desempenhe um papel importante no mecanismo de proteção fetal (CORTESE et al., 1998; PATON et al., 1999).

As vacinas utilizadas no controle do BVDV geralmente incluem formulações inativadas ou MLV (VAN OIRSCHOT et al., 1999). Diversos trabalhos têm demonstrado que apesar de vacinas inativadas freqüentemente induzirem títulos de anticorpos neutralizantes de maior magnitude, essas conferem proteção fetal apenas parcial (BROWNLIE et al., 1995; BRUSCHKE et al., 1999, VOGEL et al., 2001). Proteção fetal completa com o uso de uma vacina comercial inativada composta de antígenos do BVDV-1 já foi relatada. Entretanto, nesse estudo, a proteção frente ao desafio com amostras do genótipo BVDV-2 não foi avaliada (PATEL et al., 2002).

Vacinas atenuadas têm se mostrado mais eficazes em conferir proteção intra-uterina contra o BVDV. A proteção da infecção congênita tem sido associada à imunidade em nível celular induzida por essas vacinas (CORTESE et al., 1998; VAN OIRSCHOT et al., 1999; KOVÁCS et al., 2003). Proteção fetal completa já foi demonstrada em ovinos após imunizações com amostras de BVDV-1 e BVDV-2 atenuadas experimentalmente (BRUM et al., 2002). No entanto, nenhuma vacina convencional atualmente disponível é totalmente efetiva em prevenir a infecção congênita pelo BVDV (MOENNIG et al., 2005a).

Uma nova abordagem no uso de vacinas vivas e inativadas tem sido proposta para o BVDV: a vacinação em duas etapas (MOENNIG et al., 2005b). A primovacinação com uma vacina inativada e revacinação com uma vacina atenuada conferiu 100% de proteção fetal frente ao genótipo homólogo (BVDV-1) e heterólogo (BVDV-2) (FREY et al., 2002). Além desse protocolo induzir resposta imunológica em nível celular e humoral, a primovacinação com a vacina inativada reduz ou previne a viremia após a revacinação com a vacina viva, reduzindo ou prevenindo a excreção do vírus vacinal (MOENNIG et al., 2005b).

A glicoproteína de envelope E2 tem sido avaliada como uma candidata em potencial como antígeno vacinal em vacinas de nova geração. Essas vacinas têm como objetivo superar algumas desvantagens das vacinas convencionais, incluindo a incapacidade de diferenciar animais vacinados daqueles naturalmente infectados (NOBIRON et al., 2005). Essas vacinas incluem a E2 como subunidade (BRUSCHKE et al., 1999), expressa por vetores virais (ELAHI et al., 1999) ou por plasmídeos de expressão (NOBIRON et al., 2005). Resultados promissores de proteção fetal foram descritos com uma vacina de subunidade baseada na E2 frente ao desafio com o vírus homólogo (BRUSCHKE et al., 1997). Entretanto, a mesma

vacina conferiu proteção fetal apenas parcial frente a cepas heterólogas (BRUSCHKE et al., 1999).

Assim como para o BoHV-1, as vacinas de DNA contra o BVDV ainda são pouco imunogênicas (BABIUK et al., 2003). Levando em consideração os benefícios que as vacinas de DNA proporcionariam, o desafio atual é otimizar a imunogenicidade dos antígenos expressados. Uma abordagem que vem sendo estudada é a expressão concomitante de citocinas. Uma potencialização da resposta imunológica em nível humoral e celular foi demonstrada após a imunização de camundongos com plasmídeos contendo os genes das citocinas IL2 e GM-CSF, além do gene da glicoproteína E2. No entanto, a adjuvância promovida pela IL2 e GM-CSF não foi suficiente para induzir em camundongos títulos de anticorpos neutralizantes contra o vírus heterólogo de mesma magnitude dos induzidos contra o vírus homólogo (NOBIRON et al., 2001).

Apesar de alguns resultados promissores, as vacinas de nova geração não superaram a problemática da hipervariabilidade dos domínios antigênicos da E2. A combinação de E2 recombinantes dos três grupos de BVDV (1a, 1b e 2) em uma única formulação obteve sucesso parcial (BRUSCKE et al., 1999).

1.3 Modelos Experimentais

O estabelecimento de modelos animais tem dinamizado as pesquisas em diversas áreas da microbiologia, incluindo estudos de patogenia, desenvolvimento de vacinas e terapêuticos (NIEWIESK & PRINCE, 2002). Dentre as vantagens do uso de modelos experimentais para testes de vacina destacam-se: i. a possibilidade de se avaliar um grande número de animais, permitindo uma maior repetibilidade de dados; ii. a sua manutenção em condições controláveis, minimizando os riscos de fatores que possam interferir nos resultados; iii. a facilidade de obtenção de animais que não tiveram contato prévio com o agente contra o qual a vacina está sendo testada; iv. minimização dos custos.

Animais de laboratório têm sido utilizados como modelo em diferentes estudos em virologia. Coelhos têm sido modelo experimental para estudos de patogenia dos herpesvírus bovino (BoHV-1 e BoHV-5) (SPILKI et al., 2002; MAYER et al., 2006, CARON et al., 2002) e de diferentes aspectos da imunidade e proteção contra esses vírus (BELTRÃO et al., 2000; SILVA et al., 2006). Para o BVDV, no entanto, não existem relatos da sua replicação em animais de laboratório. No entanto, dependendo da abordagem em questão, modelos animais não necessariamente precisam ser permissíveis a replicação viral. Cobaios, por exemplo, não são susceptíveis a replicação do BVDV, porém já foram utilizados para demonstrar o

potencial imunogênico da proteína de envelope E2 do BVDV expressa nos vetores baculovírus (KWEON et al., 1997) e BoHV-1 (KWEON et al., 1999).

Cobaios têm sido modelos eficientes para estudos de patogenia e aspectos imunológicos relacionados com a infecção pelos vírus do herpes simplex (HSV-1 e HSV-2), vírus da varicela zoster (VSV) e herpesvírus bovino tipo 2 (BoHV-2). Resultados obtidos nessa espécie serviram de parâmetro para a avaliação da imunogenicidade de uma vacina atenuada contra o BoHV-2 (SMEE & LENHART, 1994). Cobaios também foram adequados para estudo dos mecanismos imunológicos associados à infecção pelo vírus da varicela zoster (VZV). A resposta humoral e celular dos cobaios imunizados com uma vacina atenuada contra o VZV (MATSUNGA et al., 1982) foi muito semelhante à verificada previamente em crianças (BABA et al., 1987).

Além de se constituírem em modelos para estudos de patogenia dos HSV-1 e HSV-2 (LUBINSKI et al., 1998; BERNSTEIN et al., 2000), os cobaios têm sido frequentemente utilizados em testes de vacinas recombinantes e de subunidade contra esses vírus (DA COSTA et al., 1997; BOURNE et al., 2003; HOSHINO et al., 2005). Essa espécie também têm sido fundamental na elucidação da patogenia de vírus humanos, como o vírus respiratório sincicial (RSV) e metapneumovírus (hMPV), bem como para avaliar os efeitos de vacinas ou de anticorpos profiláticos na replicação viral e redução das lesões teciduais induzidas por esses vírus (GRAHAM et al., 2000; WILLIAMS et al., 2005). Nesse sentido, essa espécie pode representar uma alternativa adequada para testes preliminares de vacinas víricas inativadas, que são as que atualmente estão em desenvolvimento no Brasil.

1.4 Considerações finais

As primeiras vacinas para BoHV-1 e BVDV surgiram nas décadas de 50 e 60, respectivamente. A importância desses agentes para os rebanhos bovinos, aliada a ausência de imunógenos efetivos, impulsionou as pesquisas voltadas para o desenvolvimento de novas vacinas ao longo desses anos. Inúmeras vacinas foram sendo produzidas, testadas e comercializadas. Em consequência disso, encontram-se disponíveis uma ampla variedade de imunógenos contra esses vírus. No entanto, apesar dos esforços para a produção de imunógenos que atendam aos requisitos dos programas de controle dessas enfermidades, ainda não existem vacinas totalmente efetivas para o controle do BoHV-1 e do BVDV. Como consequência, esses agentes continuam sendo responsáveis por perdas econômicas significativas para os rebanhos bovinos em todo o mundo (VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, 2006; MOENNIG et al., 2005a). Portanto, a necessidade de pesquisas

destinadas à elaboração de vacinas mais eficazes para essas enfermidades continua sendo um assunto atual e premente.

O presente trabalho foi dividido em duas partes e teve os seguintes objetivos: 1. Avaliar cobaios como modelo para testes de imunogenicidade de antígenos inativados do BoHV-1 e BVDV e estabelecer a dose que induzisse nessa espécie uma resposta neutralizante equivalente à induzida em bovinos. 2. Avaliar a imunogenicidade de seis vacinas comerciais inativadas contra o BoHV-1 e BVDV em bovinos. Os dois experimentos serão apresentados separadamente, como capítulos 1 e 2, respectivamente.

CAPÍTULO 1

Cobaios como modelo para teste de vacinas inativadas contra o herpesvírus bovino tipo 1 e vírus da diarreia viral bovina

**Guinea pigs as a model to test of bovine herpesvirus type 1 and bovine viral diarrhea
virus inactivated vaccines**

**Leticia Frizzo da Silva¹, Diego Gustavo Diel¹, Maria do Carmo Cilento², Rudi Weiblen³,
Eduardo Furtado Flores^{3*}**

(Artigo submetido à revista Ciência Rural, 2006)

¹Programa de Pós - Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil.

²Laboratório Vallée S.A., São Paulo, SP.

³Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), Centro de Ciências Rurais (CCR), UFSM, Santa Maria, RS, Brasil. Fone/fax: 55-3220-8034. E-mail:

flores@ccr.ufsm.br. * Autor para correspondência.

RESUMO

O presente trabalho relata a avaliação de cobaios como modelo para testes de imunogenicidade de vacinas inativadas contra o herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e o vírus da diarréia viral bovina (BVDV). Para isso, cobaios (n=60) e bovinos (n=10) foram imunizados duas vezes com intervalo de 28 dias com uma vacina experimental contendo antígenos dos dois vírus e testados para anticorpos neutralizantes 28 dias após a segunda dose. Os bovinos foram vacinados com a dose recomendada para a espécie (5mL); os cobaios foram distribuídos em seis grupos e imunizados com doses fracionadas (0,005mL a 1,6mL). Os grupos de cobaios imunizados com doses equivalentes a 1/16 (0,320mL) e 1/8 (0,640mL) da dose bovina desenvolveram títulos neutralizantes (GMTs de 6,46 e 7,56, respectivamente) estatisticamente semelhantes aos dos bovinos (GMT=8) ($P>0,05$). Uma alta correlação dose-resposta ($R^2=0,95$) foi observada entre as doses vacinais e os títulos de anticorpos neutralizantes anti - BoHV-1 nos grupos de cobaios. Por outro lado, não foi possível o estabelecimento de uma dose vacinal que induzisse em cobaios uma resposta neutralizante anti - BVDV em níveis semelhantes à induzida em bovinos. Apenas os cobaios imunizados com as doses maiores (0,640 e 1,6mL) desenvolveram títulos neutralizantes de magnitude moderada (GMTs de 8 e 9, respectivamente), porém estatisticamente inferiores ao GMT dos bovinos (GMT=34,9) ($P<0,05$). Esses resultados demonstram que cobaios podem ser utilizados como modelo para estudos da imunogenicidade de vacinas inativadas contra o BoHV-1. Volumes equivalentes a 1/8 a 1/16 da dose bovina são suficientes para induzir uma resposta neutralizante de magnitude equivalente nos cobaios.

Palavras-chave: BoHV-1, BVDV, cobaios, modelo experimental, teste de vacinas.

ABSTRACT

The present study reports the use of guinea pigs as a model to study the immunogenicity of bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1) and bovine viral diarrhea virus (BVDV) inactivated vaccines. To this purpose, guinea pigs (60) and calves (10) were immunized twice with a 28 day interval with an experimental vaccine containing antigens of both viruses and tested for virus neutralizing (VN) antibodies 28 days after the second dose. Calves were immunized with the recommended dose (5mL), while the guinea pigs were distributed in six groups and immunized with fractionated doses (0,005 to 1,6mL). Guinea pigs immunized with 1/16 (0,320mL) and 1/8 (0,640mL) of the bovine dose developed VN titers (GMTs) of 6,46 and 7,56, respectively, which were equivalent to the titers developed by calves (GMT=8) ($P>0,05$). A high correlation ($R^2=0,95$) was observed between the antigen dose and the VN titer developed by all guinea pig groups. In contrast, it was not possible to establish an antigen dose that induces in guinea pigs a serological response to BVDV equivalent to that induced in calves. Only the two groups given the highest antigen doses developed a consistent anti - BVDV neutralizing response, yet with VN titers (GMT= 8 and 9, respectively) significantly lower ($P<0,05$) than that induced in calves (GMT=34,9). These results demonstrate that guinea pigs may be used as a model to test the immunogenicity of BoHV-1 inactivated vaccines. Volumes equivalent to 1/8 to 1/16 of the bovine dose induce in these animals a VN antibody response of equivalent magnitude to that induced in calves.

Keywords: *BoHV-1, BVDV, experimental model, guinea pigs, vaccine test.*

INTRODUÇÃO

O herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e o vírus da diarréia viral bovina (BVDV) são importantes patógenos de bovinos e possuem distribuição mundial (BAKER, 1995; TIKOO et al., 1995). A afecção clínica mais comum da infecção pelo BoHV-1 é a rinotraqueíte

infecciosa bovina (IBR). Esse agente também está associado com enfermidade no trato genital (balanopostite e vulvovaginite), conjuntivite e infecção sistêmica, além de abortos (TIKOO et al., 1995). Após infecção aguda, o BoHV-1 estabelece infecção latente que pode ser periodicamente reativada, sendo este um importante mecanismo de manutenção e disseminação do vírus na natureza (JONES, 1998).

O BVDV também está associado com uma ampla variedade de afecções que variam desde infecções subclínicas até enfermidade aguda fatal. A infecção pode resultar em enfermidade respiratória ou digestiva (diarréia viral bovina, BVD), doença das mucosas (DM) ou trombocitopenia acompanhada de diarréia aguda e hemorrágica fatal (BAKER, 1995). A infecção de fêmeas prenhes freqüentemente resulta em transmissão transplacentária do vírus para o feto, podendo ocasionar mortalidade embrionária ou fetal, abortos, mumificações, malformações, nascimento de bezerros fracos e inviáveis, além do nascimento de animais persistentemente infectados (PI) (BAKER, 1995).

A vacinação tem sido freqüentemente utilizada para reduzir as perdas associadas com as infecções pelo BoHV-1 e BVDV, e uma variedade de vacinas inativadas e com vírus vivo modificado (MLV) têm sido utilizadas contra esses agentes (VAN OIRSCHOT et al., 1999; VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, 2005). No entanto, apesar da diversidade de imunógenos disponíveis, ainda não existe uma vacina totalmente efetiva para o controle dessas enfermidades.

No Brasil, várias vacinas nacionais e importadas contendo antígenos inativados do BoHV-1 e BVDV estão atualmente em uso (FLORES et al., 2005). Não obstante, vários laboratórios nacionais estão desenvolvendo novas vacinas, sobretudo devido à restrição da importação de imunobiológicos de alguns países, e também pela necessidade de se incluir isolados locais nas vacinas (FLORES et al., 2005). A avaliação da imunogenicidade de formulações vacinais requer necessariamente o uso de animais, de preferência a espécie

hospedeira natural. No entanto, o uso de bovinos nesses testes é dificultado pelo alto custo e pela dificuldade de se obter propriedades soronegativas, devido à ampla circulação desses agentes no rebanho brasileiro (LOVATO et al., 1995; FLORES et al., 2005). Nesse sentido, o estabelecimento de um modelo experimental em animais de laboratório pode tornar-se uma ferramenta útil para a pesquisa e desenvolvimento de novas vacinas contra o BoHV-1 e o BVDV.

O presente trabalho teve como objetivo gerar parâmetros sorológicos em cobaios comparáveis aos induzidos em bovinos imunizados com antígenos do BoHV-1 e BVDV, procurando avaliar essa espécie como modelo e estabelecer doses antigênicas equivalentes para cobaios e bovinos.

MATERIAL E MÉTODOS

Bezerros e cobaios foram imunizados duas vezes com intervalo de 28 dias com uma formulação vacinal contendo antígenos inativados do BoHV-1 e BVDV. Os bovinos foram imunizados com a dose recomendada para a espécie, enquanto os cobaios foram distribuídos em seis grupos e imunizados com doses fracionadas. A resposta sorológica à vacinação foi avaliada por testes de soroneutralização (SN) com o soro colhido 28 dias após a revacinação.

Grupos experimentais, vacina e protocolo de vacinação

Bovinos: dez bezerros com idade entre 10 e 14 meses e peso médio de 220 Kg, soronegativos para o BoHV-1 e BVDV, foram imunizados pela via subcutânea com uma formulação experimental inativada, contendo antígenos do BoHV-1 e BVDV em veículo aquoso e sais de alumínio como adjuvante. Os animais foram vacinados de acordo com recomendações do fabricante, duas doses de 5mL com intervalo de 28 dias. Dois bovinos permaneceram como controles não vacinados.

Cobaios: 65 cobaios da raça Hartley, com peso aproximado de 500g foram distribuídos aleatoriamente em 6 grupos compostos de 10 animais cada. Cada grupo foi imunizado com uma dose fracionada do mesmo imunógeno utilizado nos bovinos (Tabela 1). A formulação vacinal, a via de administração e a frequência das imunizações foram as mesmas utilizadas para os bovinos. Cinco cobaios permaneceram como controles não vacinados. Os procedimentos com animais seguiram estritamente as normas do COBEA (Comitê Brasileiro de Experimentação Animal, lei # xyv de 1978) e foram aprovados pelo Comitê de Ética e Bem Estar Animal da UFSM (processo #, 23081.004287/2006-93, de 03 de abril de 2006).

Células e vírus

Os procedimentos de multiplicação dos vírus e testes de soroneutralização (SN) foram realizados em células MDBK (*Madin-Darby bovine kidney; American Type Culture Collection (ATCC), CCL-22*) livres de pestivírus. As células foram cultivadas em meio essencial mínimo (MEM) acrescido de 10.000 UI/L de penicilina, 200 mg/L de estreptomicina, 25 mg/L de fungizona e soro eqüino (10%). As cepas padrão *Cooper* (BoHV-1) e *Singer* (BVDV-1) utilizadas para os testes de SN foram gentilmente cedidas pelo Dr. Fernando Osório e o Dr. Ruben Donis (Department of Veterinary and Biomedical Sciences, University of Nebraska at Lincoln, Lincoln, USA).

Sorologia

Amostras de soro coletadas no dia da primeira dose e 28 dias após a segunda dose (dia 56) foram testadas para a presença de anticorpos neutralizantes contra o BoHV-1 e o BVDV pela técnica de soro-neutralização (SN) de acordo com VOGEL et al. (2002). Os testes de SN foram realizados utilizando-se diluições crescentes de soro, partindo de 1:2 até 1:256 frente a doses constantes dos vírus (100 DICC₅₀ – doses infectantes para 50% das células/cavidade) e células MDBK como indicador. Os títulos de anticorpos neutralizantes foram expressos como a recíproca da maior diluição de soro capaz de prevenir a replicação viral. As médias dos

títulos foram transformadas em títulos médios geométricos (GMT; THRUSFIELD, 1986) pela relação $GMT = 2^a$, sendo “a” a média do \log_a do título de anticorpos. Para esse cálculo, somente foram considerados os títulos dos animais soropositivos (títulos ≥ 2).

Análise estatística

A comparação entre as médias foi realizada através de análise de variância pelo teste de Tukey, com nível de significância de 5%. Para a análise da correlação dose/resposta nos grupos de cobaios, os dados foram ajustados em linhas de tendência, utilizando-se modelos matemáticos lineares e não lineares, escolhendo-se o modelo com maior coeficiente de determinação (R^2). O coeficiente de determinação R^2 varia entre 0 e 1, sendo que quanto maior o valor, maior é a correlação estatística entre as variáveis.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente estudo foi delineado para estabelecer doses vacinais que induzissem em cobaios uma resposta sorológica neutralizante contra o BoHV-1 e BVDV equivalente à desenvolvida por bovinos imunizados com a dose recomendada para a espécie. O estabelecimento dessa correlação – e o estabelecimento de cobaios como modelo - permitiria o uso dessa espécie em testes preliminares de formulações vacinais contra esses vírus. A disponibilidade de um modelo laboratorial adequado pode viabilizar e facilitar várias etapas do desenvolvimento e avaliação de vacinas contra vírus bovinos atualmente em curso no Brasil.

Os resultados dos testes sorológicos realizados com o soro dos bovinos e cobaios colhidos 28 dias após a revacinação (dia 56) estão resumidos na Tabela 1. Nessa tabela são apresentados os GMTs, o número de animais que reagiu sorologicamente em cada grupo/dose vacinal e os títulos de anticorpos neutralizantes individuais contra o BoHV-1 e BVDV.

Os grupos de cobaios imunizados com doses equiivalentes a 1/16 (0,320mL) e 1/8 (0,640mL) da dose bovina desenvolveram títulos médios neutralizantes (GMTs) anti - BoHV-1 de 6,46 e 7,56, respectivamente. Esses valores não diferiram estatisticamente entre si ($P>0,05$) e do GMT dos bovinos (GMT=8). Todos os bovinos e os cobaios do grupo 5 reagiram à vacinação, enquanto um animal do grupo 4 não apresentou resposta neutralizante detectável. A frequência e distribuição dos diferentes títulos foram semelhantes nesses três grupos. Os cobaios do grupo 6 reagiram com títulos significativamente superiores (16 a 128), apresentando um GMT (40,31) aproximadamente 5 vezes maior do que o dos bovinos ($P<0,05$). Em contraste, o número de reagentes e os GMTs dos grupos de cobaios imunizados com doses menores (grupos 1, 2 e 3) foram inferiores ($P<0,05$) e vários animais de cada grupo não soroconverteram em níveis detectáveis.

Apesar de nenhum animal dos grupos 1 e 2 (doses de 5 e 20 microlitros, respectivamente) ter soroconvertido, verificou-se uma alta correlação ($R^2 = 0,95$) entre a dose vacinal e a magnitude da resposta neutralizante (Figura 1A). A única exceção foi o grupo 5, cujos animais receberam o dobro da dose do grupo 4, porém apresentaram um GMT estatisticamente semelhante ao desse grupo, e por isso manteve-se relativamente afastado da linha de tendência. Os títulos de anticorpos anti - BoHV-1 desenvolvidos pelos cobaios do grupo 6 demonstram que a relação dose- resposta vai além dos títulos desenvolvidos pelos animais dos grupos 4 e 5. Ou seja, a curva de correlação permanecia ascendente no ponto da maior concentração antigênica testada (Figura 1A). A dose utilizada no grupo 6, no entanto não deveria ser adotada em testes vacinais, pois os valores dos GMTs superaram em muito os valores dos bovinos. Em resumo, os resultados obtidos indicam que cobaios imunizados com doses correspondentes a 1/16 e 1/8 da dose bovina desenvolvem títulos neutralizantes de magnitude semelhante aos bovinos. Essas doses, portanto, seriam as recomendáveis para testes preliminares de imunogenicidade de vacinas inativadas anti - BoHV-1 nessa espécie.

Esses resultados também sugerem que os títulos de magnitude baixa a moderada induzidos por vacinas comerciais recentemente testadas (VOGEL et al., 2002; SILVA, 2006) podem ser decorrentes da baixa concentração antigênica nessas vacinas.

A avaliação da resposta sorológica dos cobaios frente ao BVDV não permitiu que se estabelecesse uma dose equivalente àquela de bovinos. A maioria dos cobaios dos grupos 1 a 4 permaneceu soronegativa ao BVDV, indicando que as doses de antígeno utilizadas nesses grupos foram insuficientes para induzir uma resposta sorológica neutralizante em nível detectável (Tabela 1). Apenas os grupos 5 (0,640mL) e 6 (1,6mL) reagiram satisfatoriamente (títulos entre <2 e 64, GMTs de 8 e 9, respectivamente), porém com títulos significativamente inferiores aos de bovinos (<2 a 128, GMT:38) ($P < 0,05$). Além de baixos, os títulos individuais apresentaram uma ampla variação, a exemplo do grupo de bovinos (Tabela 1). Essa ampla variação de títulos neutralizantes induzidos por vacinas inativadas contra o BVDV também tem sido frequentemente relatada em testes a campo (VOGEL et al., 2002, SILVA, 2006).

Os baixos títulos desenvolvidos pelos cobaios frente ao BVDV corroboram estudos prévios (KWEON et al., 1997; KEWON et al., 1999). Títulos entre 16 e 128 já foram demonstrados nessa espécie após imunização com a glicoproteína de envelope E2 do BVDV (KWEON et al., 1997). No entanto, esses títulos foram detectados após um regime de três imunizações consecutivas com o antígeno acrescido de adjuvante completo de Freund's, que é sabidamente mais imunogênico que o hidróxido de alumínio, utilizado no presente estudo. Nos grupos em que se administrou apenas o antígeno solúvel, acrescido ou não de complexo imunoestimulante (ISCOM), os títulos foram semelhantes aos verificados no presente estudo (<2 e 32) (KWEON et al., 1997).

Uma relação entre dose e resposta também foi estabelecida para o BVDV ($R^2=0,71$), porém com menor significância estatística que a correlação estabelecida para o BoHV-1

(Figura 1.B). A linha de tendência demonstra que os títulos atingiram um platô após uma determinada dose (entre grupos 5 e 6). Aparentemente, aumentos posteriores da dose não resultariam em títulos superiores. No entanto, os títulos desenvolvidos pelos cobaios foram inferiores aos desenvolvidos pelos bovinos. Portanto, estudos subseqüentes com doses maiores seriam necessários para se concluir se realmente os títulos não ultrapassariam o limite máximo aqui demonstrado, ou se doses maiores teriam potencial em induzir títulos equivalentes aos induzidos em bovinos frente ao BVDV, a exemplo do que foi demonstrado para o BoHV-1.

Outros animais de laboratório têm sido utilizados em testes preliminares de vacinas víricas, porém apresentam restrições como: i. a ampla variação da resposta imunológica em diferentes linhagens de camundongos (GUPTA et al., 1999); ii. a citotoxicidade do soro dos coelhos para os cultivos celulares utilizados em testes de soroneutralização (FLORES, E.F. comunicação pessoal). Essas características e os resultados anteriores obtidos em estudos de imunidade e proteção vacinal para diferentes vírus subsidiaram a escolha de cobaios para a realização do presente estudo. Cobaios têm sido modelos adequados para se avaliar a proteção induzida por uma vacina atenuada contra o BoHV-2 (SMEE & LENHART, 1994) e na investigação dos mecanismos imunológicos associados com a proteção da infecção pelo vírus da varicela zoster (VZV) (MATSUNGA et al., 1982). Essa espécie também tem sido freqüentemente utilizada em testes de vacinas recombinantes e de subunidade contra esses vírus (DA COSTA et al., 1997; BOURNE et al., 2003; HOSHINO et al., 2005). Os cobaios também têm sido adotados em testes de vacinas ou de anticorpos profiláticos contra vírus humanos, entre eles o vírus respiratório sincicial (RSV) e metapneumovírus (hMPV; GRAHAM et al., 2000; WILLIAMS et al., 2005).

Esses dados, aliados aos obtidos no presente estudo, indicam que essa espécie se constitui em uma alternativa adequada para testes preliminares de vacinas víricas inativadas, como as que atualmente estão em desenvolvimento no Brasil.

CONCLUSÕES

Os resultados apresentados nesse estudo permitem concluir que: i. cobaios podem ser utilizados em testes de imunogenicidade de formulações antigênicas inativadas do BoHV-1; ii. doses entre 1/16 e 1/8 da dose bovina induzem nesses animais títulos de anticorpos neutralizantes comparáveis aos produzidos pelos bovinos; iii. a resposta dos cobaios a antígenos do BVDV foi inconsistente e de baixa magnitude na maioria das doses testadas; iv. doses superiores às testadas são provavelmente necessárias para a indução de títulos neutralizantes anti - BVDV equivalentes aos de bovinos.

AGRADECIMENTOS

Aos funcionários do Biotério Central da UFSM, na pessoa do Médico Veterinário Silvano Noal, pelo auxílio inestimável na manutenção e cuidados com os animais. DGD é bolsista de mestrado do CNPq, FK possui bolsa PIBIC do CNPq, EFF (301666/2004-0) e RW (301339/2004-0) possuem bolsas PQ do CNPq. Ao Laboratório Vallée S.A. pelo suporte financeiro para a realização do mestrado (LFS).

REFERÊNCIAS

BAKER, J.C. Clinical manifestations of bovine viral diarrhea infection. **Veterinary Clinics of North America**, v.11, n.3, p. 425-445, 1995

BOURNE, N. et al. Herpes simplex virus (HSV) type 2 glycoprotein D subunit vaccines and protection against genital HSV-1 or HSV-2 disease in guinea pigs. **The Journal of Infectious Diseases**, v.187, n.4, p.542-549, 2003.

DA COSTA, X. et al. Construction and characterization of replication-defective herpes simplex virus 2 ICP8 mutant strain and its use in immunization studies in guinea pig model of genital disease. **Virology**, v.232, n.1, p.1-12, 1997.

FLORES, E.F. et al. A infecção pelo vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV) no Brasil – histórico, situação atual e perspectivas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.25, n.3, p.125-134, 2005.

GRAHAM, B.S. et al. Immune-mediated disease pathogenesis in respiratory syncytial virus infection. **Immunopharmacology**, v.48, n.3, p.237-246, 2000.

GUPTA, R.K. et al. Evaluation of guinea pig model to assess interference in the immunogenicity of different components of a combination vaccine comprising diphtheria, tetanus and acellular pertussis (DTaP) vaccine and *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide conjugate vaccine. **Biologicals**, v.27, n.2, p.167-176, 1999.

HOSHINO, Y. et al. Comparative efficacy and immunogenicity of replication-defective, recombinant glycoprotein, and DNA vaccines for herpes simplex virus 2 in mice and guinea pigs. **Journal of Virology**, v.79, n.1, p.410-418, 2005.

JONES, C. Alpha herpesvirus latency: its role in disease and survival of the virus in nature. **Advances in Virus Research**, v.51, p.81-133, 1998.

KWEON, C.H. et al. Expression of envelope protein (E2) of bovine viral diarrhea virus in insect cells. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.59, n.5, p.415-419, 1997.

KWEON, C.H. et al. Bovine herpesvirus expressing envelope protein (E2) of bovine viral diarrhea virus as a vaccine candidate. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.61, n.4, p.395-401, 1999.

- LIMA, M., et al. Caracterização de amostras atenuadas do vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV) tipos 1 e 2 para uso em vacinas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.24, n.1, p.35-42, 2004.
- LOVATO, L.T. et al. Herpesvírus bovino tipo 1 (HBV-1): inquérito soro-epidemiológico no rebanho leiteiro do Estado do Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, v.25, n.3, p.425-430, 1995.
- MATSUNGA, Y. et al. Experimental infection and immune response of guinea pigs with Varicella-Zoster virus. **Infection and Immunity**, v.37, n.2, p.407-412, 1982.
- NOBIRON, I. et al. Cytokine adjuvance of BVDV DNA vaccine enhances both humoral and cellular immune responses in mice. **Vaccine**, v.19, n.19, p.4226-4235, 2001.
- SILVA, L.F. **Imunogenicidade de vacinas inativadas contra o herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e vírus da diarréia viral bovina (BVDV) em bovinos e cobaias**. 2006. 64f. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria.
- SMEE, D.; LEONHARDT, J.A. Vaccination against bovine herpes mammilitis virus infections in guinea pigs. **Intervirology**, v.37, n.1, p.20-24, 1994.
- THRUSFIELD, M. **Veterinary Epidemiology**. London : Butterworths, 1986, 280p.
- TIKOO, K.S. et al. Bovine herpesvirus 1 (BOHV-1): biology, pathogenesis and control. **Advances in Virus Research**, v.45, p. 191-223, 1995.
- TOUSSAINT, J.F. et al. Prime-boost combining DNA and inactivated vaccines confer high immunity and protection in cattle against bovine herpesvirus-1. **Vaccine**, v.23, n.43, p.5073-5081, 2005.
- VAN DRUNEN LITTLE-VAN DEN HURK, S. Rationale and perspectives on the success of vaccination against bovine herpesvirus-1. **Veterinary Microbiology**, v.XX, p.XX, 2005.
- VAN OIRSCHOT, J.T. et al. Vaccination of cattle against bovine viral diarrhea. **Veterinary Microbiology**, v.64, n.2-3, p.169-183, 1999.

VOGEL, F.S.F. et al. Magnitude, duração e especificidade da resposta sorológica em bovinos vacinados contra o vírus da diarréia viral bovina (BVDV). **Ciência Rural**, v.32, n.1, p.83-89, 2002.

WILLIAMS, J.V. et al. The cotton rat (*Sigmond hispidus*) is a permissive small animal model of human metapneumovirus infection, pathogenesis, and protective immunity. **Journal of Virology**, v.79, n.17, p.10944-10951, 2005.

Tabela 1: Resposta sorológica de bovinos e cobaios imunizados com uma vacina inativada contra os herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e vírus da diarréia viral bovina (BVDV) 28 dias após a revacinação.

Grupo	Dose (mL)	BoHV-1			BVDV		
		Reagentes ^a	Títulos individuais ^b	GMT ^c	Reagentes	Títulos individuais	GMT
Bovinos	5	10/10	2, 4, 8 (5), 16 (3)	8 ^e	8/10	<2 (2), 8, 16 (3), 64, 128 (3)	38 ^e
Cobaios 1	0,005	0/10	<2 ^d (10)	<2 ^f		<2 (10)	<2
2	0,02	0/10	<2 (10)	<2 ^f	2/10	<2 (8), 2, 4	2,82 ^f
3	0,08	5/10	<2 (5), 2 (5)	2 ^f	2/10	<2 (8), 2, 4	2,82 ^f
4	0,320	7/8	<2, 2, 4 (3), 8 (2), 64	6,56 ^e	2/8	<2 (6), 2 (2)	2 ^f
5	0,640	10/10	2 (2), 4, 8 (4), 16 (2), 32	7,46 ^e	7/10	<2 (3), 4 (2), 8 (4), 32	8 ^g
6	1,6	9/9	16 (2), 32 (4), 64, 128 (2)	40,31 ^g	7/9	<2 (3), 2 (2), 8 (2), 32, 64	9 ^g

^a Número de animais que reagiu sorologicamente a vacinação/total de vacinados.

^b Títulos desenvolvidos pelos bovinos e cobaios do grupo (número de reagentes com o mesmo título).

^c Título médio geométrico.

^d Anticorpos neutralizantes não detectados na menor diluição de soro testada: 1:2 para ambos BoHV-1 e BVDV.

^{eg} Valores de GMT com letras iguais não diferiram entre si frente ao BoHV-1 ou ao BVDV.

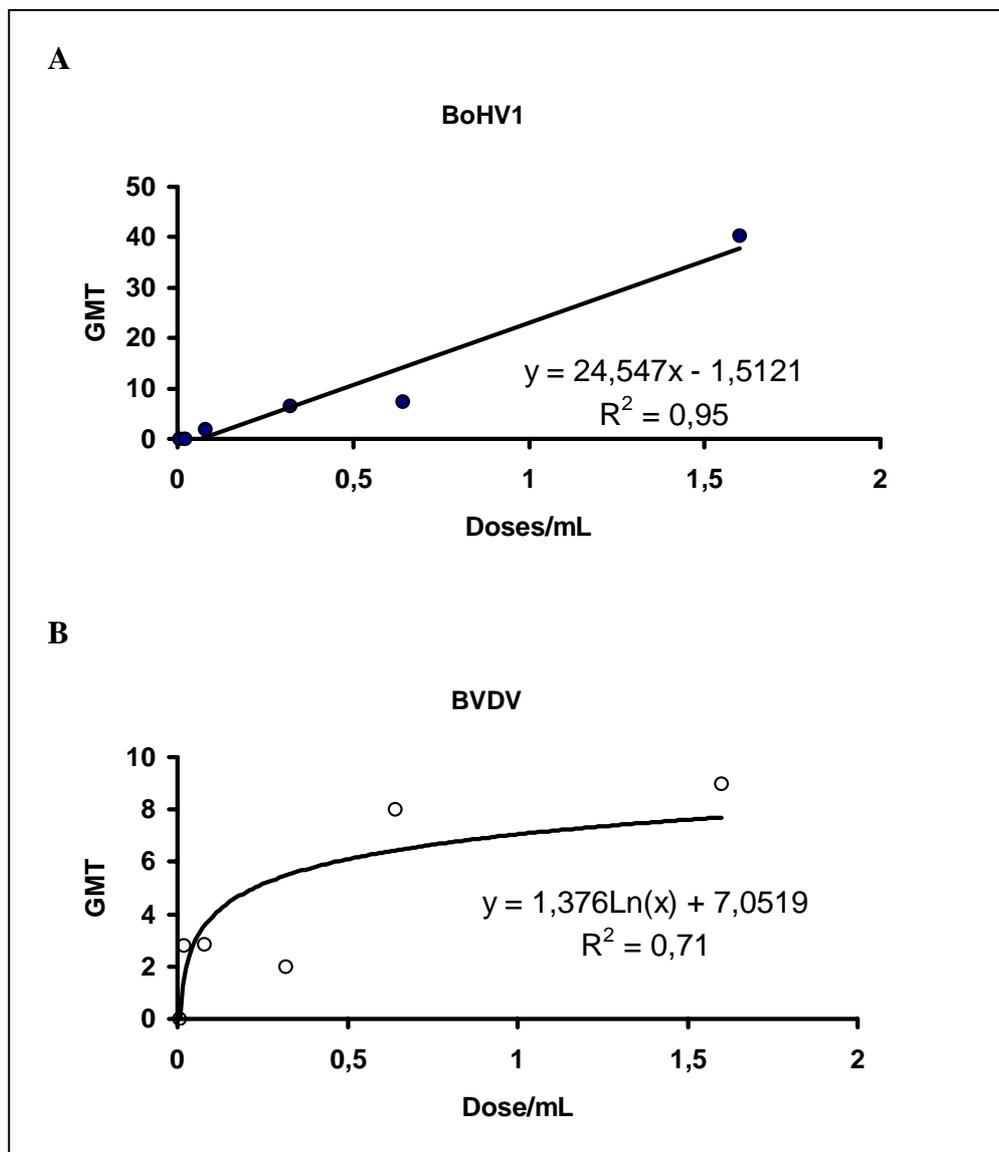


Figura 1: Correlação entre dose vacinal e títulos médios geométricos (GMT) de anticorpos neutralizantes contra o herpesvírus bovino tipo (BoHV-1) (A) e vírus da diarreia viral bovina (BVDV) (B) em cobaios imunizados com doses fracionadas de uma vacina experimental inativada.

CAPÍTULO 2

Anticorpos neutralizantes contra os herpesvírus bovino tipos 1 e 5 e vírus da diarreia viral bovina em bovinos imunizados com vacinas comerciais inativadas

**Neutralizing antibodies to bovine herpesvirus types 1 and 5 and bovine viral
diarrhea virus in cattle immunized with inactivated commercial vaccines**

Letícia Frizzo da Silva¹, Rudi Weiblen², Eduardo Furtado Flores²

¹Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil.

²Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), Centro de Ciências Rurais (CCR), UFSM, Santa Maria, RS, Brasil. Fone/fax: 55-32208034. E-mail: flores@ccr.ufsm.br.

* Autor para correspondência.

RESUMO

O presente trabalho avaliou a resposta sorológica de bovinos imunizados com seis vacinas comerciais multivalentes inativadas contra os herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e vírus da diarréia viral bovina (BVDV). Foram testadas uma vacina brasileira (BR), uma produzida nos Estados Unidos (US), duas no Uruguai (UR1 e UR2) e duas na Argentina (ARG1 e ARG2). Para isso, cinquenta e sete bovinos foram imunizados duas vezes (dias 0 e 21). Anticorpos neutralizantes contra o BoHV-1, BoHV-5 e BVDV foram pesquisados por testes de soroneutralização (SN) com o soro colhido nos dias 21 e 42 (21 dias após a revacinação). Os testes sorológicos do dia 42 indicaram a vacina US como a mais imunogênica para o BoHV-1. Os títulos induzidos por essa vacina foram superiores as demais (2 a ≥ 256 , GMT:38) ($P < 0,05$). A vacina UR1 induziu títulos neutralizantes (2 a ≥ 256 , GMT:20,2) de magnitude superior aos induzidos pelas vacinas BR (2 a 32, GMT:8,7), UR2 (4 a 32, GMT:7,3), ARG1 (<2 a 16, GMT:10) e ARG2 (2 a 16, GMT:6,3) ($P < 0,05$), que não diferiram entre si ($P > 0,05$). Os títulos neutralizantes contra o BoHV-5 foram inferiores em todos os grupos vacinais, porém para os grupos BR, ARG1 e ARG2, essas diferenças não foram significativas ($P > 0,05$). Com relação ao BVDV, somente os bovinos imunizados com a vacina US soroconverteram, desenvolvendo títulos entre 5 e ≥ 320 (BVDV-1) e entre <5 e 80 (BVDV-2). Com exceção das vacinas US (BoHV-1 e BVDV) e UR1 (BoHV-1), as demais vacinas induziram títulos de anticorpos de baixa magnitude contra o BoHV-1 e em níveis não detectáveis contra o BVDV. Essas observações questionam a imunogenicidade das vacinas disponíveis no mercado brasileiro e indicam a necessidade de se reavaliar os critérios para o licenciamento e/ou importação de vacinas contra esses vírus.

Palavras-chave: *BoHV-1, BoHV-5, BVDV, vacinas comerciais, Brasil.*

ABSTRACT

The present study evaluated the serological response induced in cattle by six bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1) and bovine viral diarrhea virus (BVDV) commercial multivalent inactivated vaccines. The tested vaccines were as follows: a Brazilian (BR), one produced in the United States (US), two in Uruguay (UR1 and UR2) and two in Argentina (ARG1 and ARG2). To this purpose, fifty-seven calves were immunized twice (days 0 and 21). BoHV-1, BoHV-5 e BVDV antibodies were monitored by virus neutralization (VN) tests in serum collected at days 21 and 42 (21 days after booster). The serological response at day 42 demonstrated that the US vaccine was the most immunogenic to BoHV. The VN titers induced by this vaccine were higher than the others (2 to ≥ 256 , GMT:38) ($P < 0,05$). The UR1 vaccine induced VN titers (<2 to ≥ 256 , GMT:20,2) higher than that induced by the BR (2 to 32, GMT:8,7), UR2 (4 to 32, GMT:7,3), ARG1 (<2 to 16, GMT:10) e ARG2 (2 to 16, GMT:6,3) vaccines ($P < 0,05$), which did not differentiate among themselves ($P > 0,05$). The BoHV-5 VN titers were lower than that BoHV-1 in all groups, however to BR, ARG1 and ARG2 groups, these differences were no significant ($P > 0,05$). Only the calves immunized with the US vaccine seroconverted to BVDV and this vaccine induced titers between 5 and ≥ 320 (BVDV-1) and between <5 and 80 (BVDV-2). With the exception of the US (BoHV-1 e BVDV) and UR1 (BoHV-1) vaccines, the others induced low BoHV-1 VN titers and did not induce VN titers to BVDV. These data question the immunogenicity of Brazilian commercial vaccines and reinforce the need of reviewing the criteria for licensing and/or importation of vaccines against these viruses.

Key words: *BoHV-1, BoHV-5, BVDV, commercial vaccines, Brazil.*

INTRODUÇÃO

O herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e o vírus da diarreia viral bovina (BVDV) são patógenos importantes dos rebanhos bovinos. A infecção por esses vírus pode resultar em uma variedade de manifestações clínicas, que são responsáveis por perdas econômicas expressivas para a indústria pecuária em todo o mundo (TIKOO et al., 1995; BAKER, 1995).

O BoHV-1 (vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina, IBRV) e o BoHV-5 são membros da família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae* (ROIZMAN et al., 1992). Os isolados do BoHV-1 podem ser diferenciados em BoHV-1.1 (doença respiratória) e BoHV-1.2 [vulvovaginite infecciosa (IPV) e balanopostite (IPB)]. A manifestação clínica mais comum após a infecção com o BoHV-1 é uma rinotraqueíte febril e, menos frequentemente, abortos e natimortos (ENGELS & ACKERMAN, 1996), enquanto o BoHV-5 tem sido associado a surtos de meningoencefalite de curso geralmente fatal (ELY et al., 1996). Uma característica comum a esses vírus é a capacidade de estabelecer e reativar infecção latente, que é um importante mecanismo de disseminação e perpetuação do vírus (JONES, 1998).

Com exceção de alguns países europeus, que recentemente erradicaram a infecção, o BoHV-1 está distribuído mundialmente (VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, 2006). Em contrapartida, a distribuição geográfica e prevalência da infecção pelo BoHV-5 é pouco conhecida, e isso se deve em grande parte à reatividade sorológica cruzada desse vírus com o BoHV-1 (BRATANICH et al., 1991; VOGEL et al., 2002b). A doença neurológica causada pelo BoHV-5 tem sido descrita com maior frequência no Brasil e na Argentina e produz grande impacto econômico nos rebanhos atingidos (ELY et al., 1996; SALVADOR et al., 1998).

A vacinação tem sido amplamente utilizada para reduzir as perdas diretas e minimizar a circulação do BoHV-1 em áreas endêmicas (VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, 2006). Atualmente já se encontram disponíveis vacinas contendo antígenos do BoHV-5 em

sua formulação (CARON L., comunicação pessoal), no entanto, nenhuma das vacinas testadas indicava a presença dos mesmos. Como o BoHV-1 e BoHV-5 são estreitamente relacionados antigenicamente, o uso de vacinas contra o BoHV-1 tem sido sugerido como tentativa de reduzir as perdas associadas à infecção pelo BoHV-5 (CASCIO et al., 1999; PETZHOLD et al., 2001). No entanto, a carência de cepas virais que reproduzam clinicamente a encefalite pelo BoHV-5 em condições experimentais dificulta a demonstração de proteção cruzada *in vivo* (PETZHOLD et al., 2001). Porém, a extensiva neutralização cruzada *in vitro* sugere que animais adequadamente imunizados contra o BoHV-1 possam também estar protegidos contra o BoHV-5 (FLORES, E.F. comunicação pessoal).

O BVDV é um vírus pertencente à família *Flaviviridae* e ao gênero *pestivirus* (HORZINEK, 1991). A infecção pelo BVDV pode resultar em uma variedade de afecções, incluindo doença gastroentérica aguda ou crônica (diarréia viral bovina, BVD), enfermidade respiratória, BVD aguda e hemorrágica além de infecções subclínicas (BAKER, 1995). A infecção de fêmeas prenhes soronegativas geralmente resulta em transmissão transplacentária do vírus, podendo causar perdas embrionárias ou fetais, malformações fetais, natimortos, neonatos fracos e inviáveis ou o nascimento de animais persistentemente infectados (PI) (BROWNLIE, 1991; BAKER, 1995). Animais PI replicam e excretam o vírus continuamente, constituindo-se no principal reservatório do vírus (HOUE, 1995).

A maior preocupação com relação à eficácia de vacinas contra o BVDV refere-se a grande variabilidade antigênica do vírus (FULTON et al., 2003). Com base em variações na região UTR 5' e na glicoproteína E2/gp53, dois grupos antigenicamente distintos foram identificados: BVDV-1 e BVDV-2 (PELLERIN et al., 1994). Como a E2/gp53 está envolvida na indução de anticorpos neutralizantes, a reatividade sorológica e a proteção cruzada entre BVDV-1 e BVDV-2 é geralmente baixa (DONIS, 1995). Estudos realizados no país revelam que ambos os genótipos estão circulando nos rebanhos brasileiros (FLORES et al., 2000) e

que os isolados locais apresentam uma baixa reatividade sorológica cruzada com cepas norte-americanas utilizadas na confecção das vacinas disponíveis no Brasil (BOTTON et al., 1998).

Na segunda metade da década de 90, várias vacinas contra o BoHV-1 e o BVDV foram introduzidas no mercado brasileiro, principalmente importadas dos Estados Unidos. No entanto, a restrição à importação de biológicos daquele país a partir de 2004, aliada à introdução de novas vacinas importadas do Uruguai e Argentina, alterou o perfil das vacinas disponíveis no mercado brasileiro. Devido à falta de uniformidade nos processos de produção e avaliação das vacinas, diferenças de cepas vacinais e de adjuvantes, assim como dos critérios para licenciamento, testes periódicos são recomendáveis para avaliação da eficácia das vacinas introduzidas no mercado. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial imunogênico de seis vacinas comerciais multivalentes inativadas frente ao BoHV-1, BoHV-5 e BVDV, tendo como indicador o título de anticorpos neutralizantes induzido nos animais vacinados.

MATERIAL E MÉTODOS

Grupos de bovinos foram imunizados duas vezes com cada uma das seis vacinas comerciais. A resposta sorológica à vacinação foi avaliada por testes de soroneutralização (SN) com soro colhido 21 dias após a revacinação.

Animais, vacinas e protocolo de vacinação: cinquenta e sete bovinos, com idade entre 10 e 14 meses, soronegativos para o BoHV-1, BoHV-5 e BVDV foram distribuídos aleatoriamente em 7 grupos. O grupo 7 (n= 10) serviu de controle e não foi vacinado. Os demais grupos foram utilizados para o teste de seis vacinas comerciais multivalentes inativadas. Os grupos e a especificação das vacinas testadas estão apresentados na Tabela 1. Os bovinos foram vacinados de acordo com instruções do fabricante: duas doses de 5mL com intervalo de 21 dias.

Células e vírus: os procedimentos de multiplicação viral e testes de soroneutralização (SN) foram realizados com células MDBK (*Madin-Darby bovine kidney; American Type Culture Collection* (ATCC) CCL-22) livres de *pestivirus*. As células foram cultivadas em meio essencial mínimo (MEM) acrescido de 10.000UI/L de penicilina, 200mg/L de estreptomicina, 2.5mg/L de fungizona e soro equino (10%). As cepas padrão do BoHV-1 (*Cooper*), BVDV-1 (*Singer*) e BVDV-2 (VS-253) utilizadas para os testes sorológicos foram gentilmente cedidas pelo Dr. Fernando Osório e Dr. Ruben Donis (Department of Veterinary and Biomedical Science, University of Nebraska at Lincoln, Lincoln, USA). A cepa SV-507 (BoHV-5) foi isolada de um bovino com sinais neurológicos e submetida a seqüenciamento completo do genoma (DELHON et al., 2003).

Sorologia: amostras colhidas no dia da primeira dose vacinal (dia 0), no dia da segunda dose (dia 21) e 21 dias após (dia 42) foram testadas para anticorpos neutralizantes contra o BoHV-1, BoHV-5 e BVDV tipos 1 e 2 pela técnica de SN conforme descrito por BRATANICH et al. (1991) e BOTTON et al. (1998), respectivamente. Os testes de SN foram realizados utilizando-se diluições crescentes de soro, partindo de 1:2 (BoHV-1 e BoHV-5) e 1:5 (BVDV-1 e BVDV-2) frente a doses constantes de vírus (100 DICC₅₀ – doses infectantes para 50% das células/cavidade) e células MDBK como indicador. A interpretação dos testes foi realizada com 72h (BoHV-1 e 5) e 96h (BVDV) de incubação. Os títulos de anticorpos neutralizantes foram expressos como a recíproca da maior diluição de soro capaz de prevenir a replicação viral.

Análise estatística: As médias dos títulos foram transformadas em títulos médios geométricos (GMT) (THRUSFIELD, 1986) pela relação: $GMT = 2^a$, onde “a” é a média do \log_a do título de anticorpos em cada vacina e em cada genótipo viral. Para esse cálculo, somente foram considerados os títulos de anticorpos dos animais soropositivos (títulos ≥ 2 para o BoHV-1 e

BoHV-5 e ≥ 5 para BVDV-1 e BVDV-2). A comparação entre as médias foi realizada através da análise de variância pelo teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A vacinação contra o BoHV-1 e BVDV vem sendo amplamente utilizada nos Estados Unidos e Europa (VAN OIRSCHOT et al., 1999; VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, 2006). No Brasil, com exceção de bacias leiteiras e de criações intensivas de gado de corte, a vacinação contra o BoHV-1 e o BVDV ainda não é uma prática amplamente difundida (FLORES et al., 2005). O número de doses comercializado no país (aproximadamente 2,5 milhões em 2003) é significativamente inferior ao volume de doses das vacinas contra a raiva (113 milhões) e febre aftosa (aproximadamente 300 milhões) comercializado anualmente (FLORES E.F. comunicação pessoal). Portanto, para um rebanho que consiste em mais de 195 milhões de bovinos, a vacinação contra o BoHV-1 e o BVDV é mais uma exceção do que uma regra (FLORES et al., 2005).

As estratégias de vacinação, assim como o perfil das vacinas que vem sendo utilizadas, não têm sido suficientemente discutidos e estudos avaliando a eficácia relativa dessas vacinas são escassos. Além disso, as medidas de fiscalização e critérios de licenciamento das vacinas comerciais são discutíveis (FLORES et al., 2005). Existe ainda uma tendência mundial de se substituir vacinas convencionais por vacinas diferenciais (PATEL, 2005a; MOENNIG et al., 2005). Portanto, dados obtidos a partir da realização de testes de vacinas convencionais podem ser ferramentas úteis na avaliação das vacinas disponíveis atualmente e na formulação de futuras vacinas.

Os resultados dos testes sorológicos realizados com o soro dos bovinos colhidos 21 dias após a revacinação (dia 42) estão resumidos na tabela 2. Nessa tabela são apresentados o

número de animais que reagiu sorologicamente a cada vacina, os títulos de anticorpos neutralizantes individuais contra o BoHV-1 e BoHV-5 e os GMTs.

Os títulos de anticorpos neutralizantes contra o BoHV-1 induzidos pelas diferentes vacinas variaram entre <2 e ≥ 256 . A vacina US induziu títulos superiores as demais vacinas testadas (2 e ≥ 256 , GMT:38) ($P < 0,05$). A vacina UR1 induziu títulos neutralizantes (2 a ≥ 256 , GMT:20,2) superiores aos induzidos pelas vacinas BR (2 a 32 , GMT:8,7), UR2 (4 a 32 , GMT:7,3), ARG1 (<2 a 16 , GMT:10) e ARG2 (2 a 16 , GMT:6,3) ($P < 0,05$), que não diferiram entre si ($P > 0,05$). O GMT de 10 verificado no grupo ARG1 não significa que essa vacina seja mais imunogênica que as vacinas BR, UR2, e ARG2. Enquanto nos outros grupos, todos os bovinos soroconverteram ao BoHV-1, no grupo ARG1 a maioria ($5/8$) permaneceu soronegativa. O cálculo do GMT exclui os bovinos não-reagentes, e a média resultante pode não ser fiel aos reais títulos vacinais individuais, portanto deve ser interpretado com cautela.

Apesar de títulos de anticorpos neutralizantes de magnitude elevada já terem sido demonstrados com o uso de vacinas inativadas (até ≥ 2048) (BOSCH et al. 1996), ainda não se estabeleceu uma correlação entre títulos neutralizantes e proteção das enfermidades causadas pelo BoHV-1 (BOSCH et al. 1996; PATEL, 2005a). POSPISIL et al. (1996) demonstraram que títulos entre 32 e 128, induzidos por vacinas inativadas, protegeram bovinos da infecção respiratória e intra-uterina. No entanto, outros estudos relacionam proteção com a resposta em nível celular induzida por vacinas atenuadas, e não com a resposta humoral induzida por vacinas inativadas (BOSCH et al., 1996). BABIUK et al. (1996) sugerem que os anticorpos neutralizantes são mais efetivos na prevenção e controle da infecção secundária e rápida eliminação viral após reativação da infecção latente, enquanto a imunidade mediada por células é importante na recuperação da infecção primária. No presente estudo, somente os bovinos dos grupos US e UR1 apresentaram títulos contra o BoHV-1 (32 a ≥ 256) comparáveis aos sugeridos como protetores por POSPISIL et al. (1996). Porém, as variações

individuais verificadas dentro desses grupos e a ausência de correlação entre anticorpos e proteção (BOSCH et al., 1996; PATEL, 2005a) não permitem concluir que essas vacinas protegeriam bovinos da enfermidade.

Para o BoHV-5, os títulos neutralizantes foram menos variáveis, porém inferiores aos títulos anti-BoHV-1 em todos os grupos (<2 e 64) (Tabela 2). No entanto, nos grupos BR, ARG1 e ARG2, essas diferenças não foram significativas ($P>0,05$). Da mesma forma que para o BoHV-1, a vacina US foi a mais imunogênica e induziu títulos anti-BoHV-5 (8 a 64, GMT:17,5) significativamente superiores aos induzidos pelas demais vacinas ($P<0,05$). As vacinas UR1 (<2 a 32, GMT:10,8) e BR (2 a 16, GMT:6,2) induziram títulos semelhantes entre si ($P>0,05$) e superiores aos induzidos pelas vacinas UR2 (<2 a 4, GMT:2,5), ARG1 (<2 e 8, GMT:8) e ARG2 (<2 a 8, GMT:4). Assim como verificado para o BoHV-1, o GMT da vacina ARG1 (8) mascara os títulos individuais. Nesse grupo, apenas 2/8 bovinos soroconverteram ao BoHV-5. Somente nos grupos BR e US a totalidade dos bovinos desenvolveu títulos anti-BoHV-5. Nos demais grupos, vários bovinos permaneceram não-reagentes: (2/9) UR1, (2/8) UR2, e (1/6) ARG2.

A reatividade cruzada entre BoHV-1 e BoHV-5 verificada em todos os grupos vacinais corrobora estudos realizados *in vitro* (TEIXEIRA et al., 1998; VOGEL et al., 2002b) e *in vivo* em bovinos (CASCIO et al., 1999) e coelhos (BELTRÃO et al., 2000; SILVA et al., 2006). Essa menor reatividade frente ao BoHV-5 era esperada e justifica-se pelo fato de que as vacinas testadas contêm somente antígenos do BoHV-1. Apesar da extensiva reatividade sorológica cruzada existente entre esses vírus, títulos superiores são induzidos contra o vírus homólogo (PETZHOLD et al., 2001; VOGEL et al., 2002b).

Com relação ao BVDV, somente os bovinos imunizados com a vacina US soroconverteram em títulos detectáveis pela técnica de SN (≥ 5). Em consequência disso, os dados paramétricos foram insuficientes para análise estatística. No entanto, observou-se que

no grupo que apresentou soroconversão, os títulos neutralizantes anti-BVDV-1 (5 a ≥ 320 , GMT:94) foram superiores aos títulos contra o BVDV-2 (<5 a 80, GMT:30) ($P < 0,05$) (dados não demonstrados).

De um total de 47 bovinos imunizados com as diferentes vacinas, apenas 4 animais do grupo US desenvolveram títulos anti-BVDV-1 (≥ 320) comparáveis aos sugeridos por HOWARD et al. (1989) e BOLIN & RIDPATH (1996) como protetores da doença clínica (≥ 240) (dados não demonstrados). No entanto, o principal objetivo dos programas de vacinação contra o BVDV é prevenir a infecção fetal (VAN OIRSCHOT et al., 1999). Apesar de muitas vacinas possuírem potencial para induzir títulos de anticorpos de magnitude relativamente elevada, nenhuma correlação entre os títulos e proteção fetal está definitivamente estabelecida (BRUSCHKE et al. 1999). Além disso, títulos neutralizantes de magnitude moderada ou relativamente baixa têm sido associados à proteção fetal em ovinos (PATON et al., 1999) e bovinos (CORTESE et al., 1998) imunizados com vacinas vivas modificadas (MLV), sugerindo a participação da imunidade mediada por células nesse mecanismo.

As vacinas utilizadas no presente estudo contêm apenas antígenos do genótipo BVDV-1 na sua formulação. Em consequência disso, os títulos frente ao genótipo heterólogo (BVDV-2) foram inferiores aos induzidos para o genótipo homólogo (BVDV-1). Resultados semelhantes têm sido demonstrados por outros estudos (BRUSCHKE et al., 1999; FULTON & BURGE, 2001; VOGEL et al. 2002a) e questionam a adequação dessas vacinas no controle do BVDV. Nesse sentido, a circulação de ambos os genótipos nos rebanhos brasileiros, o surgimento de cepas altamente patogênicas do BVDV-2, a fraca proteção cruzada entre os diferentes genótipos de BVDV, aliada à ausência de imunogenicidade verificada na maioria dos imunógenos testados, indicam a necessidade de uma análise criteriosa das vacinas atualmente disponíveis (FLORES et al., 2005).

Em todos os grupos vacinais, a evolução dos títulos médios anti-BoHV-1 e BoHV-5 comportou-se de maneira semelhante, apresentando uma elevação após a revacinação no dia 21 (Figura 1). A atividade neutralizante induzida pela primeira dose das vacinas foi de magnitude baixa e pouco consistente (dados não demonstrados). Esse comportamento é esperado em vacinas inativadas, cuja primovacinação deve ser seguida da administração de uma segunda dose 20 a 30 dias após, bem como revacinações anuais (PATEL, 2005a). Resultados semelhantes têm sido relatados em outros testes vacinais e títulos baixos pré-revacinação são mais freqüentemente observados com o uso de vacinas inativadas (FULTON & BURGE, 2001; PATEL, 2005a). É importante se considerar que esses testes foram realizados em condições ideais de intervalo, ou seja, até 21 dias após a revacinação, quando ocorre o pico de anticorpos neutralizantes em resposta ao antígeno administrado. Ao contrário das vacinas com vírus vivo, que geralmente induzem imunidade de magnitude, espectro e duração superiores, dispensando muitas vezes a revacinação (PATEL, 2005b), a atividade neutralizante resultante da imunização com vacinas inativadas tende a decrescer a partir dos 30 dias após revacinação (PATEL, 2005a).

Diferentes adjuvantes têm sido utilizados em vacinas inativadas (PATEL, 2005a). No presente estudo, a maioria das vacinas (US, UR1, ARG1 e ARG2) continha o adjuvante hidróxido de alumínio em sua formulação, enquanto as vacinas BR e UR2 continham adjuvante oleoso (Tabela 1). Nenhuma relação aparente entre adjuvante e imunogenicidade foi observada, pois tanto as vacinas mais imunogênicas (US e UR1) como a menos imunogênica (ARG1) possuíam o mesmo adjuvante. Segundo PATEL (2005a), além do adjuvante, fatores como o agente utilizado para inativação e a massa antigênica por dose são determinantes na eficácia de vacinas inativadas.

CONCLUSÕES

As observações mais relevantes do presente estudo foram: i. as vacinas (com exceção da US e UR1) induziram títulos moderados a baixos de anticorpos neutralizantes na maioria dos animais para o BoHV-1 e BoHV-5. ii. somente os bovinos imunizados com a vacina US soroconverteram para o BVDV. iii. vários bovinos não responderam sorologicamente a vacinação. iv os títulos de anticorpos induzidos pelas vacinas variaram amplamente entre os animais e entre os grupos.

Essas observações mais uma vez questionam a imunogenicidade das vacinas disponíveis no mercado brasileiro e podem contribuir para uma discussão mais ampla sobre as estratégias de formulação, licenciamento e utilização de vacinas destinadas a proteção da infecção pelo BoHV-1, BoHV-5 e BVDV.

REFERÊNCIAS

- BABIUK, L.A. et al. Immunology of bovine herpesvirus 1 infection. **Veterinary Microbiology**, v.53, n.1-2, p.31-42, 1996.
- BAKER, J.C. Clinical manifestations of bovine viral diarrhea infection. **Veterinary Clinics of North America**, v.11, n.3, p.425-445, 1995.
- BELTRÃO, N. et al. Infecção e enfermidade neurológica pelo herpesvírus bovino tipo 5 (BHV-5): coelhos como modelo experimental. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.20, n.4, p.144-150, 2000.
- BOLIN, S.R.; RIDPATH, J.F. Glicoprotein E2 of bovine viral diarrhea virus expressed in insect cells provides calves limited protection from systemic infection and disease. **Archives of Virology**, v.141, n.8, p.1463-1477, 1996.

BOSCH, J.C. et al. An attenuated bovine herpesvirus-1 marker vaccine induces better protection than two inactivated marker vaccines. **Veterinary Microbiology**, v.52, n.3-4, p.223-224, 1996.

BOTTON, S.A. et al. Antigenic characterization of Brazilian bovine viral diarrhea virus isolates by monoclonal antibodies and cross-neutralization. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.31, n.11, p.1429-1438, 1998.

BRATANICH, A.C. et al. Comparative studies of BHV-1 variants by in vivo – in vitro tests. **Journal of Veterinary Medicine B**, v.38, n.1, p.41-48, 1991.

BRONWLIE, J. The pathways of bovine virus diarrhea virus biotypes in pathogenesis of disease. **Archives of Virology**, Supplement, v.3, p.79-96, 1991.

BRUSCHKE, C.J.M. et al. An experimental multivalent bovine virus diarrhea virus E2 subunit vaccine and two experimental conventionally inactivated vaccines induce partial fetal protection in sheep. **Vaccine**, v.17, n.15-16, p.1983-1991, 1999.

CASCIO, K.E. et al. Encephalitis induced by bovine herpesvirus 5 and protection by prior vaccination or infection with bovine herpesvirus 1. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.11, n.2, p.134-139, 1999.

CARON, L. Comunicação pessoal. (Laboratório IRFA – Química e Biotecnologia Industrial, Porto Alegre, RS, E-mail: luizinhocaron@yahoo.com.br).

CORTESE, V.S. et al. Protection of pregnant cattle and their fetuses against infection with bovine viral diarrhea virus type 1 by use of modified-live virus vaccine. **American Journal of Veterinary Research**, v.59, n.11, p.1409-1413, 1998.

DELHON G. et al. Genome of bovine herpesvirus 5. **Journal of Virology**, v.77, n.19, p.10339-10347, 2003.

DONIS, R.O. Molecular biology of bovine viral diarrhea virus and its interactions with the host. **Veterinary Clinics of North America**, v.11, n3, p.393-423, 1995.

- ELY, R.W. et al. Bovine herpesviral encephalitis: a retrospective study on archived formalin-fixed, paraffin-embedded brain tissue. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.8, n.4, p.487-492, 1996.
- ENGELS, M.; ACKERMANN, M. Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. **Veterinary Microbiology**, v.53, n.1-2, p.3-15, 1996.
- FLORES, E.F. et al. Clinical, pathological and antigenic aspects of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) type 2 isolates identified in Brazil. **Veterinary Microbiology**, v.77, n.1-2, p.175-183, 2000.
- FLORES, E.F. et al. A infecção pelo vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV) no Brasil – histórico, situação atual e perspectivas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.25, n.3, p.125-134, 2005.
- FULTON, R.W.; BURGE, L.J. Bovine viral diarrhoea virus types 1 and 2 antibody response in calves receiving modified live or inactivated vaccines. **Vaccine**, v.19, n.2-3, p.264-274, 2001.
- FULTON, R.W. et al. Bovine viral diarrhoea virus antigenic diversity: impact on disease and vaccination programmes. **Biologicals**, v.31, n.2, p.89-95, 2003.
- HORZINEK, M.C. Pestivirus-taxonomic perspectives. **Archives of Virology**, Supplement, v.3, p.1-5, 1991.
- HOUE, H. Epidemiology of bovine viral diarrhoea virus. **Veterinary Clinics of North America**, v.11, n.3, p.521-547, 1995.
- HOWARD, C.J. et al. Protection against respiratory infection with bovine virus diarrhoea virus by passively acquired antibody. **Veterinary Microbiology**, v.19, n.3, p.195-203, 1989.
- JONES, C. Alphaherpesvirus latency: its role in disease and survival of the virus in nature. **Advances in Virus Research**, v.51, p.81-133, 1998.
- MOENNIG, V. et al. BVD control in Europe: current status and perspectives. **Animal Health Research Reviews**, v.6, n.1, p.63-74, 2005

PATEL, J.R. Relative efficacy of inactivated bovine herpesvirus-1 (BHV-1) vaccines. **Vaccine**, v.23, n.31, p.405-481, 2005a.

PATEL, J.R. Characteristics of live bovine herpesvirus-1 vaccines. **The Veterinary Journal**. v.169, n.3, p.404-416, 2005b.

PATON, D.J. et al. Foetal cross-protection experiments between type 1 and type 2 bovine viral diarrhoea virus in pregnant ewes. **Veterinary Microbiology**, v.64, n.2-3, p.185-196, 1999.

PELLERIN, C. et al. Identification of a new group of bovine viral diarrhoea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. **Virology**, v.203, n.2, p.260-267, 1994.

PETZOLD, S.A. et al. Neutralizing antibodies to bovine herpesvirus types 1 (BHV-1) and 5 (BHV-5) induced by an experimental, oil-adjuvanted, BHV-1 vaccine. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.38, n.4, p.184-187, 2001.

POSPISIL, Z. et al. Development of a disease control programme based on the use of an inactivated vaccine against infectious bovine rhinotracheitis. **Veterinary Microbiology**, v.53, n.1-2, p.199-206, 1996.

ROIZMANN, B. et al. The family Herpesviridae: an update. The herpesvirus study group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. **Archives of Virology**, v.123, n.3-4, p.425-449, 1992.

SALVADOR, S.C. et al. Meningoencefalite em bovinos causada por herpesvírus bovino-5 no Mato grosso do Sul e São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.18, n.2, p.76-83, 1998.

SILVA, A.D. et al. Vaccination with a gE-negative bovine herpesvirus type 1 vaccine confers insufficient protection to a bovine herpesvirus type 5 challenge. **Vaccine**, v.24, n.26, p.3313-3320, 2006.

TEIXEIRA, M.F.B. et al. Diferenças em níveis de anticorpos neutralizantes contra herpesvírus bovinos tipos 1 (BHV-1) e 5(BHV-5). **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v.4, n.1, p.61-65, 1998.

THRUSFIELD, M. **Veterinary Epidemiology**. London : Butterworths, 1986, 280p.

TIKOO, K.S. et al. Bovine herpesvirus 1 (BHV-1): biology, pathogenesis and control. **Advances in Virus Research**, v.45, p. 191-223, 1995.

VAN DRUNEN LITTLE-VAN DEN HURK, S. Rationale and perspectives on the success of vaccination against bovine herpesvirus-1. **Veterinary Microbiology**, v.31, n.113, p3-4, 2006.

VAN OIRSCHOT, J.T. et al. Vaccination of cattle against bovine viral diarrhea. **Veterinary Microbiology**, v.64, n.2-3, p.169-183, 1999.

VOGEL, F.S.F. et al. Magnitude, duração e especificidade da resposta sorológica em bovinos vacinados contra o vírus da diarréia viral bovina (BVDV). **Ciência Rural**, v.32, n.1, p.83-89, 2002a.

VOGEL, F.S.F. et al. Atividade neutralizante anti-herpesvírus bovino tipos 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5) no soro de bovinos imunizados com vacinas contra o BHV-1. **Ciência Rural**, v.32, n.5, p.881-883, 2002b.

Tabela 1: Grupos vacinais com os respectivos antígenos e adjuvantes submetidas ao teste de imunogenicidade.

Vacina / (n) ^a	Antígenos	Adjuvante
BR / (8)	BoHV-1 e BVDV-1	Oleoso
US / (8)	BoHV-1, BVDV-1, BRSV, PI3V, <i>Leptospira spp</i>	Hidróxido de Alumínio
UR1 / (9)	BoHV-1, BVDV-1, <i>Leptospira spp</i> , <i>C. jejuni</i> ,	Hidróxido de Alumínio
UR2 / (8)	BoHV-1, BVDV-1 e PI3V	Oleoso
ARG-1 / (8)	BoHV-1, BVDV-1, <i>Leptospira spp</i> , <i>C. jejuni</i>	Hidróxido de Alumínio
ARG-2 / (6)	BOHV-1, BVDV-1, <i>Leptospira spp</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>H. somnus</i>	Hidróxido de Alumínio
Controle / (10)	—	—

^a Vacinas testadas: Brasil (BR), Estados Unidos (US), Uruguai (UR1 e UR2) e Argentina (ARG1 e ARG2) / (número de bovinos em cada grupo).

Tabela 2 – Resposta sorológica de bovinos imunizados com seis vacinas comerciais inativadas frente aos herpesvírus bovinos tipos 1 (BoHV-1) e 5 (BoHV-5), 21 dias após a revacinação.

Vacina ^a	BoHV-1			BoHV-5		
	Positivos ^b	Títulos individuais ^c	GMT ^d	Positivos	Títulos individuais	GMT
BR	8/8	2, 4(2), 8(2), 16, 32(2)	8,7 ^{f*}	8/8	2, 4(3), 8(2), 16(2)	6,2 ^{f*}
US	8/8	2, 32(4), 64, 128, 256	38 ^g	8/8	8(3), 16(2), 32(2), 64	17,5 ^g
UR1	9/9	2(3), 16, 32(2), 128(2), 256	20,2 ^h	7/9	<2(2), 2, 8(3), 16, 32 (2)	10,8 ^f
UR2	8/8	4(5), 8, 32(2)	7,3 ^f	6/8	<2(2), 2(4), 4(2)	2,5 ^h
ARG1	3/8	<2 ^e (5), 4, 16(2)	10 ^{f*}	2/8	<2(6), 8(2)	8 ^{f*}
ARG2	6/6	2, 4, 8(3), 16	6,3 ^{f*}	5/6	<2, 2, 4(3), 8	4 ^{h*}
Controle	0/10	na	na	na	na	na

^a Vacinas testadas: Brasil (BR), Estados Unidos (US), Uruguai (UR1 e UR2) e Argentina (ARG1 e ARG2).

^b Número de bovinos que reagiu sorologicamente a vacinação/total de vacinados.

^c Títulos desenvolvidos pelos bovinos do grupo (número de reagentes com o mesmo título).

^d Título Médio Geométrico (GMT).

^e Anticorpos neutralizantes não detectados na menor diluição de soro testada 1:2.

^{fgh} Valores de GMT com letras iguais não diferiram entre si frente ao BoHV-1 ou ao BoHV-5.

^{*} Valores de GMT não diferiram entre o BoHV-1 e BoHV-5.

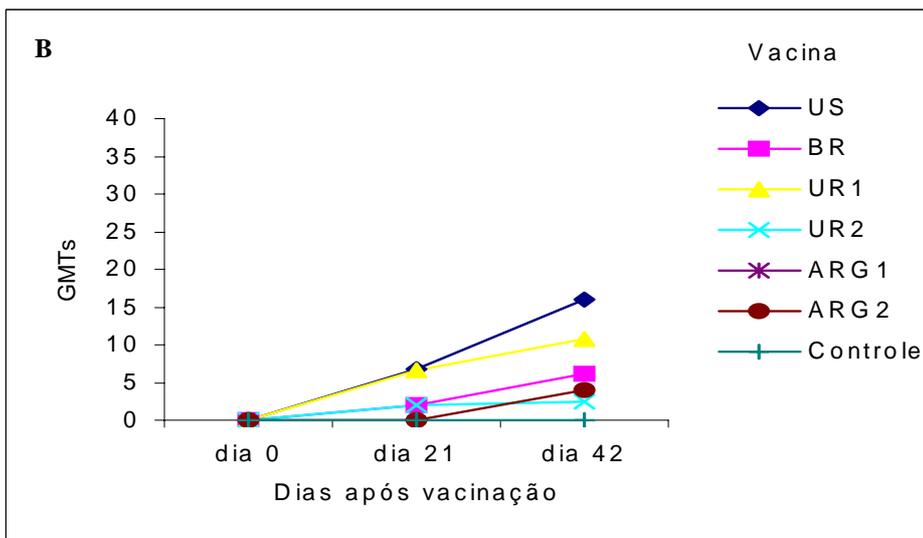
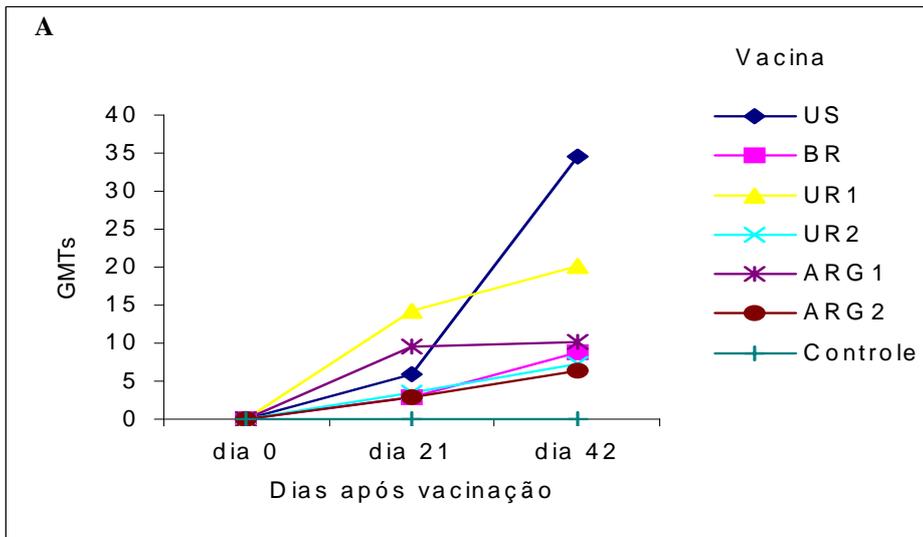


Figura 1 – Evolução dos títulos médios geométricos (GMTs) de anticorpos neutralizantes contra os herpesvírus bovinos tipos 1 (BoHV-1) (A) e 5 (BoHV-5) (B) em bovinos imunizados com seis vacinas comerciais inativadas.

4. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, pode-se afirmar:

- Os cobaios se constituem em modelos adequados para testes de imunogenicidade de antígenos do BoHV-1 associados ao adjuvante hidróxido de alumínio.
- Doses entre 1/16 e 1/8 da dose bovina induzem em cobaios títulos de anticorpos neutralizantes equivalentes aos induzidos em bovinos imunizados com a dose recomendada.
- Doses maiores do que as utilizadas no presente estudo são necessárias para induzir em cobaios títulos anti-BVDV de magnitude equivalente aos induzidos nos bovinos.
- Somente as vacinas US e UR1 induziram títulos de magnitude moderada a alta frente ao BoHV-1 e BoHV-5; e os títulos neutralizantes contra o BoHV-1 foram superiores aos contra o BoHV-5.
- Os títulos de anticorpos neutralizantes anti-BoHV-1 e BoHV-5 variaram amplamente entre os diferentes grupos e entre os animais do mesmo grupo.
- Somente a vacina US foi imunogênica para o BVDV e os títulos induzidos contra o genótipo homólogo (BVDV-1) foram superiores aos induzidos contra o genótipo heterólogo (BVDV-2).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BABA, K. et al. Specificity of skin test with varicella-zoster antigen in varicella-zoster and herpes simplex virus infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v.25, n.11, p.2193-2196, 1987.

BABIUK, L.A. et al. Immunology of bovine herpesvirus 1 infection. **Veterinary Microbiology**, v.53, n.1-2, p.31-42, 1996.

BABIUK, L.A. et al. Induction of immune response by DNA vaccines in large animals. **Vaccine**, v.21, n.7-8, p.649-658, 2003.

BAKER, J.C. Clinical manifestations of bovine viral diarrhoea infection. **Veterinary Clinics of North America**, v.11, n.3, p.425-445, 1995.

BELTRÃO, N. et al. Infecção e enfermidade neurológica pelo herpesvírus bovino tipo 5 (BHV-5): coelhos como modelo experimental. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.20, n.4, p.144-150, 2000.

BERNSTEIN, D.I. et al. Pathogenesis of acyclovir-resistant herpes simplex type 2 isolates in animal models of genital herpes: models for antiviral evaluations. **Antiviral Research**, v.47, n.3, p.159-169, 2000.

BOLIN, S. R. Control of bovine viral diarrhoea infection by use of vaccination. **Veterinary Clinics of North America**, v.11, n.3, p.615-625, 1995.

BOLIN, S.R.; RIDPATH, J.F. Glicoprotein E2 of bovine viral diarrhoea virus expressed in insect cells provides calves limited protection from systemic infection and disease. **Archives of Virology**, v.141, n.8, p.1463-1477, 1996.

BOSCH, J.C. et al. An attenuated bovine herpesvirus-1 marker vaccine induces better protection than two inactivated marker vaccines. **Veterinary Microbiology**, v.52, n.3-4, p.223-234, 1996.

BOTTON, S.A. et al. Antigenic characterization of Brazilian bovine viral diarrhoea virus isolates by monoclonal antibodies and cross-neutralization. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.31, n.11, p.1429-1438, 1998.

BOURNE, N. et al. Herpes simplex virus (HSV) type 2 glycoprotein D subunit vaccines and protection against genital HSV-1 or HSV-2 disease in guinea pigs. **The Journal of Infectious Diseases**, v.187, p.542-549, 2003.

BRONWLIE, J. The pathways of bovine virus diarrhoea virus biotypes in pathogenesis of disease. **Archives of Virology**, Supplement, v.3, p.79-96, 1991.

BROWNLIE, J. et al. Protection of the bovine fetus from bovine viral diarrhoea virus by means of a new inactivated vaccine. **Veterinary Record**, v.137, n.3, p.58-62, 1995.

BRUM, M.C.S. et al. Proteção fetal frente a desafio com o vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV) em ovelhas imunizadas com duas amostras de vírus modificadas experimentalmente. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.22, n.2, p.64-71, 2002.

BRUSCHKE, C.J.M. et al. A subunit vaccine based on glycoprotein E2 of bovine virus diarrhoea virus induces fetal protection in sheep against homologous challenge. **Vaccine**, v.15, n.17-18, p.1940-1945, 1997.

BRUSCHKE, C.J.M. et al. An experimental multivalent bovine virus diarrhoea virus E2 subunit vaccine and two experimental conventionally inactivated vaccines induce partial fetal protection in sheep. **Vaccine**, v.17, n.15-16, p.1983-1991, 1999.

CARON, L. et al. Latent infection by bovine herpesvirus type 5 in experimentally infected rabbits: virus reactivation, shedding and recrudescence of neurological disease. **Veterinary Microbiology**, v.84, n.4, p.285-295, 2002.

CORTESE, V.S. et al. Protection of pregnant cattle and their fetuses against infection with bovine viral diarrhoea virus type 1 by use of modified-live virus vaccine. **American Journal of Veterinary Research**, v.59, n.11, p.1409-1413, 1998.

DA COSTA, X. et al. Construction and characterization of replication-defective herpes simplex virus 2 ICP 8 mutant strain and its use in immunizations studies in guinea pig model of genital disease. **Virology**, v.232, n.1, p.1-12, 1997.

DONIS, R.O. Molecular biology of bovine viral diarrhoea virus and its interactions with the host. **Veterinary Clinics of North America**, v.11, n3, p.393-423, 1995.

ELAHI, S.M. et al. Recombinant adenovirus expressing the E2 protein of bovine viral diarrhoea virus induce humoral and cellular immune responses. **FEMS Microbiology Letters**, v.177, n.1, p.159-166, 1999.

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

FLORES, E.F. et al. Efficacy of a deletion mutant bovine herpesvirus-1 (BHV-1) vaccine that allows serologic differentiation of vaccinates from naturally infected animals. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.5, n.4, p.534-540, 1993.

FLORES, E.F. et al. Clinical, pathological and antigenic aspects of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) type 2 isolates identified in Brazil. **Veterinary Microbiology**, v.77, n.1-2, p.175-183, 2000.

FLORES, E.F. et al. Phylogenetic analysis of Brazilian bovine viral diarrhoea virus type 2 (BVDV-2) isolates: evidence for a subgenotype within BVDV-2. **Virus Research**, v.87, n.1, p.51-69, 2002.

FLORES, E.F. et al. A infecção pelo vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV) no Brasil – histórico, situação atual e perspectivas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.25, n.3, p.125-134, 2005.

FRANCO, A.C. et al. Construction and characterization of a glycoprotein E deletion mutant of bovine herpesvirus mutant type 1.2 strain isolated in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.33, n.3, p.274-278, 2002a.

FRANCO, A.C. et al. A Brazilian glicoproteína E-negative bovine herpesvirus type 1.2a (BHV-1.2a) mutant is attenuated for cattle and induces protection against wild type virus challenge. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.22, n.4, p.135-140, 2002b.

FREY, H.R. et al. Foetal protection against bovine virus diarrhoea virus after two-step vaccination. **Journal of Veterinary Medicine. B**, v.49, n.10, p.489-493, 2002

FULTON, R.W. et al. Antibody responses by cattle after vaccination with commercial viral vaccines containing bovine herpesvirus-1, bovine viral diarrhoea virus, parainfluenza-3 virus, and bovine respiratory syncytial virus immunogens and subsequent revaccination at day 140. **Vaccine**, v.13, n.8, p.725-733, 1995.

FULTON, R.W.; BURGE, L.J. Bovine viral diarrhoea virus types 1 and 2 antibody response in calves receiving modified live or inactivated vaccines. **Vaccine**, v.19, n.2-3, p.264-274, 2001.

FULTON, R.W. et al. Humoral immune response and assessment of vaccine virus shedding in calves receiving modified live virus vaccines containing bovine herpesvirus-1 and bovine viral diarrhea virus 1a. **Journal of Veterinary Medicine B**, v.50, n.1, p.31-37, 2003a.

FULTON, R.W. et al. Bovine viral diarrhea virus antigenic diversity: impact on disease and vaccination programs. **Biologicals**, v.31, n.2, p.89-95, 2003b.

GRAHAM, B.S. et al. Immune-mediated disease pathogenesis in respiratory syncytial virus infection. **Immunopharmacology**, v.48, n.3, p.237-246, 2000.

HOLT, P.G. Functionally mature virus-specific CD8⁺ T memory cells in congenitally infected newborns: proof of principle for neonatal vaccination? **The Journal of Clinical Investigation**, v.111, n.11, p.1645-1647, 2003.

HORZINEK, M.C. Pestivirus-taxonomic perspectives. **Archives of Virology**. Supplement, v.3, p.1-5, 1991.

HOSHINO, Y. et al. Comparative efficacy and immunogenicity of replication-defective, recombinant glycoprotein, and DNA vaccines for herpes simplex virus 2 in mice and guinea pigs. **Journal of Virology**, v.79, n.1, p.410-418, 2005.

JONES, C. Alphaherpesvirus latency: its role in disease and survival of the virus in nature. **Advances in Virus Research**, v.51, p.81-133, 1998.

KAASHOEK, M..J. et al. An inactivated vaccine based on a glycoprotein E – negative strain of bovine herpesvirus 1 induces protective immunity and allows serological differentiation. **Vaccine**, v.13, n.4, p.342-346, 1995.

KERKHOF, P. et al. Enhancement of the immune response and virological protection of calves against bovine herpesvirus type 1 with an inactivated gE-deleted vaccine. **Veterinary Record**, v.152, n.22, p.681-686, 2003.

KOVACS, F. et al. The live attenuated ovine viral diarrhea virus components of a multi-valent vaccine confer protection against fetal protection. **Veterinary Microbiology**, v.96, n.2, p.117-131, 2003.

KWEON, C.H. et al. Expression of envelope protein (E2) of bovine viral diarrhea virus in insect cells. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.59, n.5, p.415-419, 1997.

KWEON, C.H. et al. Bovine herpesvirus expressing envelope protein (E2) of bovine viral diarrhoea virus as a vaccine candidate. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.61, n.4, p.395-401, 1999.

LINDBERG, A.L. Bovine viral diarrhoea virus infections and its control. A review. **Veterinary Quarterly**, v.25, n.1, p.1-16, 2003.

LINDBERG, A.L.; HOUE, H. Characteristics in the epidemiology of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) of relevance to control. **Preventive Veterinary Medicine**, v.72, n.1-2, p.55-73, 2005.

LINDENBACH, B.D.; RICE, C.M. Flaviviridae: the virus and their replication. In: KNIPE, D.M., et al. **Fields Virology**. Lippincot Williams & Wilkins. Philadelphia, PA, USA. 2001. Cap.32, p.991-1042.

LUBINSKI, J. M. et al. Herpes simplex virus type 1 glycoprotein gC mediates immune evasion in vivo. **Journal of Virology**, v. 72, n.10, p.8253–8257, 1998.

MATSUNGA, Y. et al. Experimental infection and immune response of guinea pigs with varicella-zoster virus. **Infectious and Immunity**, v.37, n.2, p.407-412, 1982.

MAYER, S.V. et al. Dexamethasone-induced reactivation of bovine herpesvirus type 5 latent infection in experimentally infected rabbits results in a broader distribution of latent viral DNA in different regions of the brain. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.39, n.3, p.335-343, 2006.

MOENNIG, V. et al. BVD control in Europe: current status and perspectives. **Animal Health Research Reviews**, v.6, n.1, p.63-74, 2005a.

MOENNIG, V. et al. Implementation of two-step vaccination in control of bovine viral diarrhoea. **Preventive Veterinary Medicine**, v.72, n.1-2, p.109-114, 2005b.

NIEWIESK, S.; PRINCE, G. Diversifying animal models: the use of hispid cotton rats (*Sigmodon hispidus*) in infectious diseases. **Laboratory Animals**, v.36, p.357-372, 2002.

NOBIRON, I. et al. Cytokine adjuvancy of BVDV DNA vaccine enhances both humoral and cellular immune responses in mice. **Vaccine**, v.19, n.30, p.4226-4235, 2001.

NOBIRON, I et al. DNA vaccination against bovine viral diarrhoea virus induces humoral and cellular responses in cattle with evidence for protection against viral challenge. **Vaccine**, v.21, n.17-18, p.2082-2092, 2005.

O'ROURKE, K. BVDV: 40 years of effort and the disease still has a firm hold. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.220, n.12, p.1770-1773, 2002.

PATEL, J.R. et al. Prevention of transplacental infection of bovine foetus by bovine viral diarrhoea virus through vaccination. **Archives of Virology**, v.147, n.12, p.2453-2463, 2002.

PATEL, J.R. Characteristics of live bovine herpesvirus-1 vaccines. **The Veterinary Journal**, v.169, n.3 p.404-416, 2005a.

PATEL, J.R. Relative efficacy of inactivated bovine herpesvirus-1 (BHV-1) vaccines. **Vaccine**, v.23, n.31, p.405-481, 2005b.

PATON, D.J. et al. Fetal cross-protection experiments between type 1 and type 2 bovine viral diarrhoea virus in pregnant ewes. **Veterinary Microbiology**, v.64, n.2-3, p.185-196, 1999.

PELLERIN, C. et al. Identification of a new group of bovine viral diarrhoea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. **Virology**, v.203, n.2, p.260-267, 1994.

PETERS, A.R. et al. Duration of immunity of a quadrivalent vaccine against respiratory diseases caused by BHV-1, PI3V, BVDV and BRSV in experimentally infected calves. **Preventive Veterinary Medicine**, v.66, n.1-4, p.63-77, 2004.

POSPISIL, Z. et al. Development of a disease control programs based on the use of an inactivated vaccine against infectious bovine rhinotracheitis. **Veterinary Microbiology**, v.53, n.1-2, p.199-206, 1996.

RIDPATH, J.F.; BOLIN, S.R. Differentiation of types 1a, 1b and 2 bovine viral diarrhoea virus (BVDV) by PCR. **Molecular and Cellular Probes**, v.12, n.2, p.101-106, 1998.

ROIZMANN, B. et al. The family Herpesviridae: an update. The herpesvirus study group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. **Archives of Virology**, v.123, n.3-4, p.425-449, 1992.

SILVA, A.D. et al. Vaccination with a gE-negative bovine herpesvirus type 1 vaccine confers insufficient protection to a bovine herpesvirus type 5 challenge. **Vaccine**, v.24, n.16, p.3313-3320, 2006.

SMEE, D.; LEONHARDT, J.A. Vaccination against bovine herpes mammilitis virus infections in guinea pigs. **Intervirology**, v.37, n.1, p.20-24, 1994.

SPIPKI, F.R. et al. Neurovirulência e neuroinvasividade de herpesvírus bovinos tipos 1 e 5 em coelhos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.22, n.2, p.58-63, 2002.

SPIPKI, F.R. et al. Field evaluation of safety during gestation and horizontal spread of recombinant differential bovine herpesvirus 1 (BHV-1) vaccine. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.25, n.1, p.54-58, 2005.

TOUSSAINT, J.F. et al. Prime-boost strategies combining DNA and inactivated vaccines confer high immunity and protection in cattle against bovine herpesvirus-1. **Vaccine**, v.23, n.43, p.5073-5081, 2005.

VAN DRUNEN LITTLE-VAN DEN HURK, S et al. A subunit gIV vaccine , produced by transfected mammalian cells in culture, induces mucosal immunity against bovine herpesvirus-1 in cattle. **Vaccine**, v.12, n.14, p.1295-1302, 1994.

VAN DRUNEN LITTLE-VAN DEN HURK, S. Rationale and perspectives on the success of vaccination against bovine herpesvirus-1. **Veterinary Microbiology**, v.31, n.113, p.3-4, 2006.

VAN OIRSCHOT, J.T. et al. An enzyme-linked immunosorbent assay to detect antibodies against glycoprotein gE of bovine herpesvirus 1 allows differentiation between infected and vaccinated cattle. **Journal of Virological Methods**, v.67, n.1, p.23-44, 1997.

VAN OIRSCHOT, J.T. et al. Vaccination of cattle against bovine viral diarrhea. **Veterinary Microbiology**, v.64, n.2-3, p.169-183, 1999.

VOGEL, F.S.F. et al. Resposta sorológica e avaliação de proteção fetal em ovelhas prenhes vacinadas contra os vírus da diarréia viral bovina (BVDV). **Ciência Rural**, v.31, n.5, p.831-838, 2001.

VOGEL, F.S.F. et al. Magnitude, duração e especificidade da resposta sorológica em bovinos vacinados contra o vírus da diarréia viral bovina (BVDV). **Ciência Rural**, v.32, n.1, p.83-89, 2002.

WILLIAMS, J.V. et al. The cotton rat (*Sigmond hispidus*) is a permissive small animal model of human metapneumovirus infection, pathogenesis, and protective immunity. **Journal of Virology**, v.79, n.17, p.10944-10951, 2005.

YATES, W.D. A review of infectious bovine rhinotracheitis, shipping fever pneumonia and viral-bacterial synergism in respiratory disease of cattle. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v.46, n.3, p.225-263, 1982.

ZHENG, C.F. et al. Intracellular trafficking of the major tegument protein VP22 of bovine herpesvirus 1 and its application to improve DNA vaccines. **Archives of Virology**, (in press), 2005.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)