

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**MODELO EXPERIMENTAL COM CAPRINOS E COBAIAS
PARA AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE VACINAS CONTRA
O HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 1 E O VÍRUS DA
DIARREIA VIRAL BOVINA TIPOS 1 E 2**

Bruna Alexandrino

Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

2012

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**MODELO EXPERIMENTAL COM CAPRINOS E COBAIAS
PARA AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE VACINAS CONTRA
O HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 1 E O VÍRUS DA
DIARREIA VIRAL BOVINA TIPOS 1 E 2**

Bruna Alexandrino

Orientador: Prof. Dr. Samir Issa Samara

Tese apresentada a Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária (Medicina Veterinária Preventiva).

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL
Janeiro de 2012

Alexandrino, Bruna
A381m Modelo experimental com caprinos e cobaias para avaliação da eficácia de vacinas contra o herpesvírus bovino tipo 1 e o vírus da diarreia viral bovina tipos 1 e 2. / Bruna Alexandrino. -- Jaboticabal, 2012
 xvi, 81 f. ; 28 cm

 Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2011
 Orientador: Samira Issa Samara
 Banca examinadora: Luís Antonio Mathias, Adolorata Aparecida Bianco Carvalho, Moacir Marchiori Filho, Fabio Carvalho Dias
 Bibliografia

 1. BoHV-1. 2. BVDV-1. 3. BVDV-2. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

 CDU 619:614.4:636.3

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

BRUNA ALEXANDRINO – nascida em 5 de março de 1980, no município de São Carlos – SP, filha de Osmil Alexandrino e Maria Regina Henrique Alexandrino. Ingressou em fevereiro de 2000 no Curso de Medicina Veterinária na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal (FCAV-UNESP – Jaboticabal), concluindo-o em dezembro de 2004. Em março de 2006 iniciou o Curso de Mestrado em Medicina Veterinária, área de concentração em Medicina Veterinária Preventiva, na FCAV-UNESP-Jaboticabal, concluindo-o em fevereiro de 2008. Ingressou no Curso de Doutorado em Medicina Veterinária, área de concentração em Medicina Veterinária Preventiva, na mesma instituição, concluindo-o em janeiro de 2012.

A princípio são pequenos, mas no seu percurso fazem-se mais fortes e profundos, e uma vez que tenham começado, já não têm volta. Assim sucede com os rios, os anos e as amizades.”

(Antigo versículo sânscrito)

Dedico

Aos meus amados, pais Osmil e Maria Regina, meus irmãos Emerson e Daniela e meus
sobrinhos Júlia, Pedro e Rafaela, por todo ensinamento e exemplo
de vida, pelo carinho, pela compreensão e pelo incentivo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço:

A Deus, por sempre guiar meus passos e iluminar meus pensamentos.

A minha família, que é o meu suporte, fonte de amor, carinho e respeito. Pelo total apoio que me deram sempre.

Ao orientador, Prof. Dr. Samir Issa Samara, pela oportunidade, pelos ensinamentos, pela dedicação e confiança em mim depositados.

À técnica do laboratório Andrea Souza Ramos de Medeiros pela amizade, pelo incentivo, ensinamentos e pela ajuda durante todo esse tempo.

Ao funcionário Milton de Souza Siqueira, pela imensa ajuda com as cobaias. Sou muito grata, pois seria muito difícil a realização desta pesquisa sem a sua colaboração.

Aos professores que participaram da banca de qualificação, Prof Dr. Iveraldo dos Santos Dutra e Prof. Dr. Hélio José Montassier, pela participação e contribuição.

À Dra. Sandra P. Gatti e Dr. Moacir Marchiori Filho, pela participação na banca de qualificação e pelo auxílio durante toda a pesquisa.

Ao Prof. Dr. Estevam Guilherme Lux Hoppe, pela ajuda na análise estatística desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Luis Antonio Mathias, pelo exemplo profissional, pela colaboração e pelas sugestões feitas na defesa desta tese e pelos ensinamentos.

À Profa. Dra. Adolorata Bianco Carvalho, primeiro pela amizade, confiança e pelo exemplo de educadora. Agradeço também pela colaboração e pelas sugestões feitas na defesa.

Aos docentes da graduação de Medicina Veterinária, da FCAV-UNESP, especialmente :Prof. Dr. Adjair Antonio do Nascimento, Profa Dra. Angela Banzatto de Carvalho, Prof. Dr. Antonio Nader Filho, Prof. Dr. Luiz Augusto do Amaral, Prof. Dr. Luiz Francisco Prata, Profa. Dra. Maria da Glória Buzinaro, Prof. Dr. Osvaldo Durival Rossi e Prof. Dr. Raul José Silva Gírio pela participação em minha formação profissional.

A todos os funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva pela ajuda, pela acolhida e pela amizade.

Aos meus irmãos de laboratório Lucimara Antonio Borges, mais conhecida por Pinga, Ingrid Bortolin Affonso, Mônica Costa Oliveira e Wesley, pelo apoio nas pesquisas.

Aos meus amigos de doutorado Fernanda de Rezende Pinto, José Roberto Ferreira Alves Júnior, Viviane Souza, Glaucenyra Cecília Pinheiro, Thalita Blankenheim, Gian R. O. Galli, Felipe J. da Silva, Roberta Salles e aos amigos do coral da UNESP, e do Kung Fu, pelo companheirismo e por tantos momentos felizes que passamos juntos.

A todos os proprietários dos rebanhos de bovinos e de caprinos trabalhados nesta tese.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP - Câmpus de Jaboticabal, pelo acolhimento e pela formação desde a graduação até o doutorado.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de doutorado processo nº140363/2010-6 e FAPESP, projeto nº2010/10399-0, pelo auxílio à pesquisa.

Enfim, agradeço a todos que direta ou indiretamente colaboraram no desenvolvimento deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABELAS	v
RESUMO	viii
SUMMARY	x
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	2
3 OBJETIVOS.....	24
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.1 Esquema experimental.....	24
4.2 Animais de experimentação.....	25
4.2.1 <i>Infecção experimental em bovinos e cobaias</i>	26
4.2.2 <i>Vacinação em bovinos</i>	27
4.2.3 <i>Vacinação em caprinos</i>	28
4.2.4 <i>Vacinação em cobaias</i>	29
4.3 Manutenção das culturas celulares.....	30
4.4 Amplificação viral.....	31
4.5 Titulação viral.....	31
4.6 Pesquisa de anticorpos virusneutralizantes.....	32
4.6.1 <i>VN para o BoHV-1</i>	32
4.6.2 <i>VN para o BVDV</i>	34
4.7 Controle das $DICT_{50}$	35
4.7.1 <i>Controle das $DICT_{50}$ para o BoHV-1</i>	35
4.7.2 <i>Controle das $DICT_{50}$ para o BVDV-1 e o BVDV-2</i>	36
4.8 Análise estatística.....	37
5 RESULTADOS.....	38
5.1 Infecções experimentais	38
5.1.1 <i>Bovinos</i>	38
5.1.2 <i>Cobaias</i>	41
5.1.3 <i>Comparação das cinéticas de respostas imunes</i>	42
5.2 Experimentos com seis vacinas comerciais disponíveis no mercado nacional.....	44
5.2.1 <i>Vacinação de bovinos</i>	44
5.2.2 <i>Vacinação de caprinos</i>	47
5.2.3 <i>Vacinação de cobaias</i>	53
6. DISCUSSÃO.....	58
7. CONCLUSÕES.....	64
8. REFERÊNCIAS.....	66

LISTA DE FIGURAS

		Páginas
Figura 1.	Comparação das médias geométricas dos títulos de anticorpos (GMT) anti-BoHV-1 (A), anti-BVDV-1 (B) e anti-BVDV-2 (C) para cada grupo de cobaias, inoculados com sua respectiva suspensão viral. Comparação das GMT anti-BoHV-1, anti-BVDV-1 e anti-BVDV-2 (D), para cada grupo de bovinos inoculados com sua respectiva suspensão viral.....	42
Figura 2.	Comparação das médias geométricas dos títulos de anticorpos anti-BoHV-1, obtidos 28 e 56 dias após a imunização de cada grupo de bovinos com diferentes formulações de vacinas comerciais nacionais.....	44
Figura 3.	Comparação das médias geométricas dos títulos de anticorpos anti-BVDV-1 e BVDV-2, obtidos aos 56 dias após a imunização de cada grupo de bovinos com diferentes formulações de vacinas comerciais nacionais...	46
Figura 4.	Comparação das médias geométricas dos títulos de anticorpos anti-BoHV-1, para cada grupo de caprinos inoculados com diferentes formulações de vacinas disponíveis no mercado nacional, nos diferentes dias de colheita.....	50
Figura 5.	Comparação da média geométrica dos títulos de anticorpos anti-BoHV-1 e anti-BVDV-1, para os grupos de cobaias inoculados com diferentes doses de uma vacina comercial nacional, 28 e 56 dias após a imunização.....	54
Figura 6.	Comparação das médias geométricas dos títulos de anticorpos anti-BoHV-1, para cada grupo de cobaias, inoculados com diferentes formulações de vacinas comerciais disponíveis no mercado nacional, 28 e 56 dias após a imunização.....	56

LISTA DE TABELAS

		Páginas
Tabela 1.	Média geométrica dos títulos de anticorpos (GMT), em grupos de bovinos, nos diferentes dias de colheita, após infecção experimental com o BoHV-1, o BVDV-1 e o BVDV-2.....	38
Tabela 2.	Comparação das médias geométricas dos títulos de anticorpos (GMT), dos grupos de bovinos, mostrando a reação cruzada no teste de virusneutralização, nos diferentes dias de colheita após infecção experimental com o BVDV-1 o BVDV-2.....	38
Tabela 3.	Média geométrica dos títulos de anticorpos (GMT), dos grupos de cobaias, nos diferentes dias de colheita, após infecção experimental com diferentes doses de BoHV-1.....	39
Tabela 4.	Média geométrica dos títulos de anticorpos (GMT), dos grupos de cobaias, nos diferentes dias de colheita, após infecção experimental com diferentes doses de BVDV-1.....	40
Tabela 5.	Média geométrica dos títulos de anticorpos (GMT), dos grupos de cobaias, nos diferentes dias de colheita, após infecção experimental com diferentes doses de BVDV-2.....	41
Tabela 6.	Média geométrica dos títulos de anticorpos (GMT) obtidos na virusneutralização para o BoHV-1 na primeira (28 dias) e segunda colheitas (56 dias), induzidos pela vacinação e revacinação de grupos de bovinos com diferentes formulações disponíveis no mercado nacional.....	43
Tabela 7.	Análise estatística dos dados obtidos na virusneutralização para o BoHV-1 na primeira (28 dias) e segunda colheita (56 dias), com média dos títulos de anticorpos (GMT) induzidos pela vacinação e revacinação, seguida pelo desvio padrão para cada grupo de bovinos que recebeu uma formulação comercial disponível no mercado nacional.....	44
Tabela 8.	Média geométrica dos títulos de anticorpos (GMT) obtidos na virusneutralização para o BVDV-1 e o BVDV-2 na segunda colheita (56 dias), induzidos pela vacinação e revacinação de grupos de bovinos com diferentes formulações disponíveis no mercado nacional.....	45

Tabela 9.	Análise da reatividade do teste de virusneutralização para o BoHV-1 com a média geométrica dos títulos de anticorpos (GMT) em soro de caprinos, nas cinco propriedades analisadas nos Estados de Minas Gerais e São Paulo.....	47
Tabela 10.	Média geométrica dos títulos de anticorpos (GMT) obtidos na virusneutralização para o BoHV-1, nas colheitas realizadas nos dias -21, 0, 28, 56, induzidos pela vacinação e revacinação de grupos de caprinos com uma das formulações de vacinas disponíveis no mercado nacional.....	49
Tabela 11.	Análise estatística dos dados obtidos na virusneutralização para o BoHV-1 nas colheitas dos dias 28 e 56, com média dos títulos de anticorpos (GMT) induzidos pela vacinação e revacinação, seguida pelo desvio padrão de cada grupo de caprinos que recebeu uma das formulações comerciais disponíveis no mercado nacional.....	49
Tabela 12.	Média geométrica dos títulos de anticorpos (GMT) obtidos na virusneutralização para o BVDV-1, nas colheitas realizadas nos dias 28 e 56, induzidos pela vacinação e revacinação de grupos de caprinos com uma das formulações disponíveis no mercado nacional.....	51
Tabela 13.	Média geométrica dos títulos de anticorpos (GMT) obtidos na virusneutralização para o BVDV-2, nas colheitas realizadas nos dias 28 e 56, induzidos pela vacinação e revacinação de grupos de caprinos com seis vacinas disponíveis no mercado nacional.....	51
Tabela 14.	Média geométrica dos títulos de anticorpos (GMT) obtidos na virusneutralização para o BoHV-1, nas colheitas realizadas nos dias 28 e 56, induzidos pela vacinação e revacinação de grupos de cobaias com frações de uma vacina disponível no mercado nacional.....	53
Tabela 15.	Média geométrica dos títulos de anticorpos (GMT) obtidos na virusneutralização para o BVDV-1, nas colheitas realizadas nos dias 28 e 56, induzidos pela vacinação e revacinação de grupos de cobaias com frações de uma vacina disponível no mercado nacional..	53
Tabela 16.	Média geométrica dos títulos de anticorpos (GMT) obtidos na virusneutralização para o BoHV-1, nas colheitas realizadas nos dias 28 e 56, induzidos pela vacinação e revacinação de grupos de cobaias com uma das vacinas disponíveis no mercado nacional.....	55

- Tabela 17.** Análise estatística dos dados obtidos na virusneutralização para o BoHV-1 nas duas colheitas realizadas no experimento, com média dos títulos de anticorpos (GMT) induzidos pela vacinação e revacinação, seguida pelo desvio padrão para cada grupo de cobaias que recebeu vacina comercial disponível no mercado nacional..... 56
- Tabela 18.** Média geométrica dos títulos de anticorpos (GMT) obtidos na virusneutralização para o BVDV-1, nas colheitas realizadas nos dias 28 e 56 do experimento induzidos pela vacinação e revacinação de grupos de cobaias com uma das formulações disponíveis no mercado nacional..... 57

MODELO EXPERIMENTAL COM CAPRINOS E COBAIAS PARA A AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE VACINAS CONTRA O HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 1 E O VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA TIPOS 1 E 2

RESUMO

A presente pesquisa teve como objetivo avaliar a utilização de cobaias e caprinos para teste de vacinas contra o herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e os vírus da diarreia viral bovina tipos 1 (BVDV-1) e 2 (BVDV-2). Inicialmente foi realizada a infecção experimental em cobaias e bovinos, com esses três vírus, para verificar a máxima resposta imunogênica em ambas as espécies. As médias geométricas dos títulos de anticorpos (GMT) dos bovinos foram altas para todos os agentes virais; em cobaias foi possível observar que o BoHV-1 induziu elevadas GMT, para o BVDV-1 a indução foi moderada, enquanto para o BVDV-2 foi baixa, podendo comprometer a viabilidade dos testes antigênicos. Após essa etapa, foram vacinados bovinos, cobaias e caprinos, com seis vacinas comerciais de antígenos inativados, para verificar a indução de anticorpos por estímulo vacinal. Nos bovinos, as GMT obtidas para o BoHV-1 mostraram que as vacinas utilizadas promoveram a indução moderada na resposta imunológica, e apenas três delas foram consideradas satisfatórias. Para o BVDV-1, apenas uma vacina pode ser considerada eficiente, e em relação ao BVDV-2 nenhuma delas poderia ser assim classificada. Os resultados da vacinação com os caprinos mostraram que, apesar de os animais serem reagentes ao BoHV-1 no início do experimento, as formulações foram capazes de induzir a produção de anticorpos com títulos elevados contra os três vírus estudados. As cobaias, por sua vez, receberam doses fracionadas de uma vacina comercial nacional e, das frações testadas, 3,2mL foi a que apresentou melhores resultados, sendo esta estabelecida para testar as demais vacinas nesta espécie. Depois da imunização, os resultados mostram que para o BoHV-1 as GMT foram altas; em relação ao BVDV-1, apenas duas vacinas foram capazes de induzir anticorpos, porém, suas GMT foram baixas; e não houve resposta imunológica contra o BVDV-2. Sendo assim, os caprinos podem ser viabilizados como modelos para teste das vacinas

contra os três vírus estudados e as cobaias contra o BoHV-1 e o BVDV-1, sendo comprometida sua utilização contra o BVDV-2.

PALAVRAS-CHAVE: BoHV-1, BVDV-1, BVDV-2, modelo experimental, vacina

EXPERIMENTAL MODEL WITH GOATS AND GUINEA PIGS TO EVALUATE THE EFFICACY OF VACCINES AGAINST BOVINE HERPESVIRUS TYPE 1 AND THE BOVINE VIRAL DIARRHEA VIRUSES TYPES 1 AND 2

SUMMARY

The present research had as objective to evaluate the use of guinea pigs and goats in test of vaccines against the bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1) and the bovine viral diarrhea viruses types 1 (BVDV-1) and 2 (BVDV-2). First, an experimental infection was realized in guinea pigs and bovines, using these three viruses, to verify the maximum immune response in both species. The geometric means of antibodies titres (GMT) for bovines were high for the viral agents; in guinea pigs was possible to observe that the GMT induced by BoHV-1 was high, by BVDV-1 was moderate and by BVDV-2 was weak and could compromise the viability of antigenic tests. After this stage, the bovines, guinea pigs and goats were vaccinated using six commercial vaccines with inactivated antigens to verify the induction of antibodies production by vaccinal stimulus. In bovines, the GMT obtained for BoHV-1 showed the vaccines induced a moderate immune response, being only three of them considered satisfactory. For BVDV-1 only one and for BVDV-2 none of them can have the same classification. The results obtained with the goats, despite they were positive to BoHV-1 in the sorting, showed the formulations were able to induce high antibody production against the three virus studied. The guinea pigs, on the other hand, received fractional doses of a commercial vaccine well-established in the domestic trade and, from the fractions tested, 3.2 mL showed the best results, being established to test the other vaccines. After immunization, the results of GMT for BoHV-1 was high; relating to BVDV-1, only two vaccines were capable to induce antibodies production, but their GMT were weak; and there was no immune response against BVDV-2. Thus, goats can be enabled as a model to test of vaccines against the three virus studied and the guinea pigs against BoHV-1 and BVDV-1, but its use is compromised against BVDV-2.

KEY-WORDS: BoHV-1, BVDV-1, BVDV-2, experimental model, vaccine.

1. INTRODUÇÃO

Segundo o IBGE (2004), o Brasil possui o maior rebanho comercial de bovinos fato que possibilita classificar o país como um dos maiores produtores de alimento para o mundo. O número de importadores com mais exigências aumentaram, prioritariamente no âmbito sanitário, cujo sistema básico inicial começa com a febre aftosa. Mas essa enfermidade está controlada no nosso meio por esquema que associa vacinação periódica e vigilância. Como o reflexo sanitário de uma nação é monitorado à partir da febre aftosa, depois do seu controle, outras enfermidades que não tinham visibilidade passaram a ter outra conotação neste novo cenário.

Uma pesquisa feita pela empresa de consultoria USDA/BIGMA indicou que a pecuária leiteira nacional ocupa o quinto lugar no ranking dos produtores mundiais de leite, permanecendo atrás da União Européia, EUA, Índia e Rússia. Diante destes fatos, algumas enfermidades infectocontagiosas, ao atingirem os plantéis de carne e leite poderiam causar perdas irreparáveis ao produtor.

O objetivo dos produtores de bovinos é aumentar a eficiência reprodutiva e produtiva dos rebanhos e diminuir o custo da produção. Alguns fatores como enfermidades infecciosas, nutricionais e parasitárias podem afetar esse objetivo.

A sanidade do rebanho assume um papel de fundamental importância qualquer que seja o sistema de exploração animal para a produção de alimento saudável e lucratividade econômica. Ações de prevenção e controle de doenças, como por exemplo, a redução da exposição do rebanho as enfermidades e o aumento do nível de resistência do rebanho, contribuem para que o sistema imune do bovino tenha condições suficientes para funcionar adequadamente .

Desta forma, as enfermidades com afecções respiratórias e reprodutivas se tornaram mais destacadas neste contexto, com ênfase para o herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e o pestevírus bovino relacionado com a diarreia viral bovina, (BVD), que ganharam relevância no cenário nacional devido sua alta prevalência em nosso território.

2. REVISÃO DE LITERATURA

As infecções causadas pelo herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV) são endêmicas em rebanhos do mundo inteiro e podem resultar em uma ampla variedade de manifestações clínicas (KENDRICK et al., 1958). A alta prevalência dessas enfermidades associada aos transtornos reprodutivos causados em alguns rebanhos são as principais características que fazem com que tenham grande destaque sobre a pecuária mundial, pelos prejuízos que causam aos produtores (BAKER, 1995).

Os primeiros isolamentos do BoHV-1 ocorreram nos Estados Unidos, onde MILLER (1955) constatou a doença em bovinos no Estado do Colorado. Nos Estados Unidos, MADIN et al. (1956) cultivaram o vírus pela primeira vez em histoculturas. WEBSTER & MANKTELOW (1959) descreveram a virose nos animais da Nova Zelândia; na Alemanha, GRÜNDER et al. (1960) observaram a doença em bovinos. Foram descritos casos no Canadá, por STUDDERT et al. (1961); na África do Sul, MARÉ & VON RENSBURG (1961) associaram o isolamento viral com infertilidade, mediante neutralização cruzada com o vírus da rinotraqueíte dos bovinos; na Inglaterra, em Oxfordshire, DARBYSHIRE et al. (1962) reportaram o isolamento do vírus.

No Brasil, o primeiro relato de isolamento do BoHV-1 ocorreu no Estado da Bahia a partir de pústulas vaginais de vacas (ALICE, 1978). MUELLER et al. (1978) conseguiram isolar o vírus a partir do rim de um feto bovino proveniente de um matadouro em São Paulo. Desde então vários relatos da presença do agente em rebanhos bovinos brasileiros com problemas respiratórios e reprodutivos tem sido descritos (DEL FAVA, 2001).

No Estado do Rio Grande do Sul, WIZIGMANN & VIDOR (1969) demonstraram a presença de anticorpos contra o vírus da rinotraqueíte dos bovinos, em 33% dos soros examinados de bovinos originários de 11 municípios. Outro inquérito soropidemiológico realizado no Rio Grande do Sul por LOVATO et al. (1995), demonstrou nos rebanhos acometidos uma prevalência de 54,3%, sendo as maiores taxas em animais com idade superior a 24 meses.

O primeiro estudo sorológico por virusneutralização (VN), realizado no Estado da Bahia, detectou anticorpos anti-BoHV-1 no soro de 34,4% (158/458) dos animais testados. Desde então, diversos autores detectaram reatividade sorológica para a presença do BoHV-1 em bovinos de vários estados da federação com percentuais de positividade variando entre 27,1% e 85,7% nos rebanhos que foram analisados (PANDEY, 1994). Outros levantamentos sorológicos regionais, no Brasil, têm demonstrado rebanhos reagentes com taxas que variam de 28,9% a 82,7% (GALVÃO et al., 1963; RAVAZZOLO et al., 1989; LOVATO et al., 1995; VIDOR et al., 1995; SAMARA et al., 1997; MOLNÁR et al., 2001; ROCHA et al., 2001).

Entre os fatores de risco associados à disseminação da doença, destacam-se como mais importante a introdução no rebanho de animais em período de incubação, em fase aguda ou com infecção latente (BARBOSA et al., 2005; SOLIS-CALDERON et al., 2005; VAN SCHAIK et al., 2002; VAN SCHAIK et al., 1998). Os animais infectados são frequentemente aqueles com idade mais avançada, pela maior probabilidade e tempo de contato com o vírus e a proporção de reagentes é maior nos machos do que nas fêmeas; quanto mais denso o rebanho, maior a disseminação no local; e a participação do gado em leilões e feiras agropecuárias aumenta a probabilidade de infecção pelo provável contato com animais infectados (ALEXANDRINO, 2011; BOELAERT et al., 2005; BARBOSA et al., 2005; SOLIS-CALDERON et al., 2005; VONK NOORDEGRAAF et al., 2004; VAN SCHAIK et al., 2002).

O agente etiológico de todos estes transtornos é o BoHV-1, que pertence à família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae* (FENNER, 1987), gênero *Varicellovirus*. O tamanho da partícula viral do BoHV-1 está entre 70 e 110 nm de diâmetro e é constituída por um envelope lipoproteico que reveste um capsídeo icosaédrico, contendo, internamente, um DNA linear de fita dupla, rodeada por capsídeo, no qual se localizam, externamente, dez glicoproteínas (FENNER et al., 1974; FENNER, 1987, FENNER et al., 1993). As glicoproteínas são denominadas gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gK, gL e gM e cada uma tem propriedades antigênicas e funções biológicas distintas nos processos de interação com a célula hospedeira e com o mecanismo de replicação (SCHWYZER & ACKERMANN, 1996).

Esse agente viral foi classificado por meio de técnicas de biologia molecular no genótipo BoHV-1.1 causador da rinotraqueíte infecciosa bovina, isolado de animais com problemas respiratórios, infertilidade e abortamento; e BoHV-1.2, sendo dividido em subgenótipos BoHV-1.2a e BoHV-1.2b, respectivamente causadores de vulvovaginite e balanopostite, porém já foram também encontrados em animais com problemas respiratórios (EDWARDS et al., 1990; MILLER, 1991; D'ARCE et al., 2002). O subgenótipo 2b é considerado de patogenicidade reduzida e não tem sido associado ao aborto (QUINN et al., 2005; BATISTA et al., 2010).

A resistência do vírus depende de vários fatores como a temperatura, o pH, a radiação solar e a umidade. O BoHV-1 é inativado em temperatura de 56°C após 21 minutos, em temperatura de 37°C sobrevive até 10 dias e a 22°C, 50 dias. O vírus sobrevive até 30 dias no alimento (NANDI et al., 2009). Por ser envelopado, o vírus é sensível a solventes orgânicos, também ao clorofórmio, ao éter e à acetona, devido a sua camada lipoproteica. Os vírions perdem a infectividade após o contato com isopropanol ou etanol na concentração de 70% a 80% por 5 minutos, formaldeído na de 0,2% a 0,8%, e glutaraldeído na de 2%. São inativados por dez minutos em contato com substâncias com pH abaixo de 3 e acima de 11 (QUINN et al., 2005; FRANCO & ROEHE, 2007). O vírus sobrevive até 1 ano no semê congelado a 196°C negativos, fica estável por 1 mês à temperatura de 4°C, e no alimento resiste por até 30 dias (NANDI et al., 2009).

Após a infecção viral do animal, durante a fase aguda ocorre replicação do BoHV-1 nas células epiteliais da porta de entrada, principalmente na mucosa do trato respiratório ou na mucosa genital, causando necrose e apoptose nessas células (MUYLKENS et al., 2007). Quando o vírus se dissemina no hospedeiro em decorrência da viremia, pode atingir diferentes grupos de tecidos e órgãos, causando uma das formas clínicas ou patológicas (ENGELS & ACKERMANN, 1996), como, por exemplo, aborto em vacas prenhes (MILLER, 1991).

Os animais clinicamente doentes podem excretar altos títulos de vírus por até 15 a 16 dias (FRANCO & ROEHE, 2007), com um pico de 4 a 6 dias pós-infecção (NANDI et al., 2009). A morbidade varia de 20% a 30% e a mortalidade de 6% a 12%, esta

última ocorre com maior frequência em bovinos de engorda em manejo intensivo, inclusive podem aparecer complicações em decorrência de infecções bacterianas secundárias (KAHRS, 1977).

Após multiplicação nas células epiteliais da porta de entrada, ocorre viremia, fase na qual o vírus migra para o útero da vaca gestante. Uma vez no útero, o feto é atingido independentemente do estágio da gestação. De 1 a 3 dias após ter começado a multiplicação viral o feto morre e o aborto ocorre 2 a 7 dias após a sua morte. O processo completo a partir da infecção inicial da vaca ao aborto pode ser curto, com média de 18 dias, ou longo, com 3 meses (RICHEY, 1994).

Com a progressão da infecção nos animais, esse vírus penetra nas terminações nervosas periféricas locais e por via axonal retrógrada atinge os sítios de latência, que são principalmente os neurônios dos gânglios trigeminal e sacral, onde o nucleocapsídeo viral permanece no núcleo da célula hospedeira em forma não infecciosa, desencadeando o processo de portador latente (LEMAIRE et al., 1994). O vírus pode ser reativado quando os animais são expostos a fatores predisponentes estressantes, com a diminuição da resistência imunológica, comum durante o tratamento com glicocorticóides, parição, transporte ou outras enfermidades (LEMAIRE et al., 1994; TIKOO et al., 1995).

A latência se caracteriza quando existe o genoma viral no interior dos neurônios ganglionares, sem produção de progênie viral (ENGELS & ACKERMANN, 1996). Este vírus em latência não é detectado por procedimentos virológicos convencionais, mas pode determinar subsequentes e intermitentes episódios de re-excreção viral, normalmente não acompanhados de sinais clínicos; e mesmo com o estabelecimento de imunidade celular e humoral, pós-infecção ou pós-vacinação, o estado de latência permanece (FENNER et al., 1993); com isso, uma vez infectado pelo BoHV-1, o animal será sempre portador e potencial transmissor do vírus por toda a sua vida (MARSÍ et al., 1996). Em rebanhos infectados é comum a ocorrência de surtos esporádicos, que trazem prejuízos em decorrência das manifestações clínicas da doença (MARSÍ et al., 1996).

Reações inflamatórias e celulares são as primeiras respostas da infecção pelo BoHV-1 (MUYLKENS, 2007). A produção precoce de citocinas conduz ao recrutamento e à ativação de diferentes células tais como macrófagos, neutrófilos polimorfonucleares e linfócitos granulares atuando como células “natural killer” (MUYLKENS, 2007). Esses efeitos aumentam a primeira onda de substâncias antivirais pela secreção de citocinas no epitélio infectado, que, por consequência, matam as células infectadas pelo vírus (CAMPOS & ROSSI, 1986; CAMPOS et al., 1989).

A ativação das células imunes não específicas é ainda essencial pois iniciam a regulação da resposta imune específica ao BoHV-1 (BABIUK et al., 1996). A imunidade celular é detectada aos cinco dias pós-infecção e atinge o pico entre 7 e 10 dias, geralmente coincidindo com a recuperação das manifestações clínicas; e a imunidade específica humoral é detectada a partir do décimo dia (BABIUK et al., 1996).

Segundo BABIUK et al. (1996), os anticorpos parecem não ter muita participação na recuperação da infecção primária, mas provavelmente participam do “clearance” viral neutralizando partículas do BoHV-1 fora das células, prevenindo que a infecção extracelular se alastre. Desta forma, atuam na citotoxicidade celular, que é dependente de anticorpos. Todavia os anticorpos são importantes porque limitam as consequências da reativação viral e previnem a infecção secundária. No entanto a imunidade passiva proporcionada pelos anticorpos colostrais de vacas imunes ao BoHV-1 é totalmente eficiente para proteger os neonatos contra a doença sistêmica e letal (BABIUK et al., 1996).

O BoHV-1 acomete principalmente os bovídeos (KAHRS, 1977), porém a infecção natural também pode ocorrer em caprinos, ovinos, suínos e em algumas espécies selvagens como cervo (WYLER et al., 1989). Em animais de laboratório já foi relatada a infecção experimental desse agente em coelhos e cobaias (MEYER et al., 1996).

A transmissão horizontal do BoHV-1 ocorre principalmente pelo contato direto entre um animal doente e um suscetível, como no caso da cópula (VAN ENGELENBURG et al., 1995), ou indiretamente, seja por aerossóis, ingestão de águas contaminadas ou por intermédio de fômites (KAHRS & SMITH, 1965). Pela transmissão vertical, o embrião e o feto podem infectar-se pela via transplacentária (DEL FAVA et al., 2002).

A porta de entrada do vírus é a mucosa respiratória, a mucosa genital e o epitélio conjuntival (TAKIUCHI et al., 2001; MUYLKENS et al., 2007). Depois de instalado no hospedeiro, o vírus pode ser eliminado pelas secreções respiratórias, oculares, genitais, sêmen, líquidos e tecidos fetais (KAHRS, 1977; DEL FAVA, 2001).

A infecção pelo BoHV-1 afeta principalmente os tratos respiratório, causando a rinotraqueíte, e devido à viremia, pode causar aborto (ROIZMAN et al., 1995), e o trato genital, determinando em animais gestantes quadros de morte embrionária, fetal e aborto (BARR & ANDERSON, 1993), assim como diminuição da eficiência reprodutiva de touros e vacas (ALFIERI et al., 1998). A forma respiratória caracteriza-se por aumento da temperatura corporal, dispneia, rinite, hiperemia das mucosas, corrimento nasal seroso e lesões erosivas na mucosa nasal. A taxa de mortalidade é baixa, mas podem ocorrer complicações em decorrência de infecções bacterianas secundárias (KAHRS, 1977; WYLER et al., 1989).

A forma genital em fêmeas manifesta-se com o aparecimento de pequenas vesículas que evoluem para pústulas e erosões localizadas na vulva e vagina. O epitélio vulvar apresenta-se edemaciado, hiperêmico e com secreção que pode tornar-se mucopurulenta devido a infecção bacteriana secundária (GIBBS & RWEYEMANN, 1977; WYLER et al., 1989). Em experimento com infecção experimental, foi observado edema da mucosa vulvovestibular e da vagina posterior no segundo dia pós-infecção (HENZEL et al., 2008).

Podem ainda ocorrer conjuntivite, enterite, encefalite e distúrbios reprodutivos (KAHRS, 1977; STRAUB, 1991). As perdas reprodutivas podem ser observadas por elevadas taxas de serviço por concepção e baixas taxas de fecundação (WHITE & SNOWDON, 1973). Nas vacas prenhes, infectadas durante o segundo ou terceiro trimestre de gestação, há intensa replicação viral nos fetos, que resultará em morte fetal e abortamento (MILLER & VAN DER MATTEEN, 1985). Todavia, quando os bezerros são infectados na fase final da gestação ou logo após o nascimento, é mais comum ocorrer a forma sistêmica no recém-nascido (ROCHA, 1999).

A forma aguda se caracteriza por infecção com surgimento de lesões necróticas nas mucosas dos tratos respiratório e digestivo. Neste caso, podem ocorrer natimortos

ou nascer bezerros bastante debilitados, vindo a morrer em poucas horas (ROCHA, 1999). Há ainda retardo no crescimento de bezerros, diminuição da eficiência reprodutiva de touros e vacas, além de queda na produção de leite (BARR & ANDERSON, 1993; ALFIERI et al., 1998).

No entanto, todas essas manifestações clínicas não são patognomônicas; sendo assim, para diagnosticar a enfermidade causada pelo BoHV-1 é necessário utilizar métodos auxiliares laboratoriais indiretos, como pesquisar anticorpos, ou diretos, para caracterizar o agente etiológico (ALFIERI et al., 1998). Os testes sorológicos mais utilizados detectam anticorpos por meio de técnicas de VN ou ensaios imunoenzimáticos (ELISA); entretanto, esses testes são de difícil interpretação em rebanhos que adotam a vacinação profilática, pois essas metodologias de exame são incapazes de diferenciar os anticorpos induzidos por vírus vacinal daqueles oriundos da exposição natural a vírus de campo (TAKIUCHI et al., 2001).

O isolamento do BoHV-1 em cultivo celular é considerado o método padrão de diagnóstico direto (TAKIUCHI et al., 2001). O exame laboratorial para caracterização etiológica também pode ser obtido por imunofluorescência, imunoperoxidase e ELISA diretos (COLLINS et al., 1988), hibridização, microscopia eletrônica e reação em cadeia de polimerase (PCR) (ALFIERI et al., 1998, VILCEK et al., 1994).

Comprovado o diagnóstico, o tratamento dos animais doentes só é possível para amenizar os sinais clínicos e evitar o risco de complicações por aparecimento de infecções secundárias, pois não existe uma terapia específica (MOREIRA, 2004). Portanto, a melhor maneira de impedir a disseminação do vírus no rebanho é por meio da prevenção (DEL FAVA, 1996), com atuação e monitoração sistemática nos diferentes componentes da cadeia epidemiológica.

Além da rinotraqueíte infecciosa bovina, outra enfermidade envolvida no cenário reprodutivo econômico da pecuária bovina nacional é a determinada pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV). Apesar de as pesquisas no país mostrarem a importância do BVDV, as informações ainda são restritas aos profissionais que lidam diretamente com os rebanhos; também por se tratar de uma enfermidade basicamente de caráter

subclínico, tem sido erroneamente considerada de pouca importância na bovinocultura brasileira (DIAS & SAMARA, 2010).

Na metade do século passado, OLAFSON et al. (1946) descreveram uma nova doença infecciosa que acometeu um rebanho bovino leiteiro no Estado de Nova Iorque, Estados Unidos da América, caracterizada por leucopenia, febre alta, depressão, diarreia desidratação, anorexia, salivação, descarga nasal, erosões gastrointestinais e hemorragias em vários tecidos. Ainda no mesmo ano, CHILDS et al. (1946), no Canadá, relatou doença similar, porém mais severa. Posteriormente, descobriu-se que o agente causador era um vírus, e a doença passou a ser denominada de diarreia viral.

Quase duas décadas depois, PRITCHARD (1963) organizou os achados de literatura e considerou as observações de CHILDS como a primeira descrição da doença das mucosas (DM), por ter relatado manifestações mais severas e associadas a uma menor morbidade e alta letalidade em animais jovens, fato que o fez considerar uma enfermidade diferente da diarreia viral bovina (BVD).

Nesta mesma época, GILLESPIE et al. (1960), KNIAZEFF et al. (1967) e THOMSON & SAVAN (1963), por meio de estudos de neutralização cruzada, demonstraram que os agentes isolados da BVD e da DM na América do Norte e na Europa eram iguais, então concluíram que essas duas doenças eram apenas síndromes diferentes, causadas por um mesmo agente. Assim, por vários anos a doença ficou conhecida por BVD-DM, porém atualmente, a enfermidade é denominada apenas BVD. A partir da década de 90, vários estudos relacionaram o BVDV a doenças respiratórias em confinamentos bovinos. Nesse mesmo tempo surgiram os programas de erradicação sem vacinação dos animais nos países escandinavos (DEREGT, 2005).

Pela facilidade da transmissão, a distribuição geográfica desta enfermidade é considerada cosmopolita, tanto que se estima que, de toda população bovina adulta do mundo, entre 50% e 90% apresentam anticorpos contra esse vírus (KRAMPS et al., 1999). No Brasil, já foi constatado que 23,4% de amostras foram reagentes em 45,3% das propriedades pesquisadas no Estado do Rio Grande do Sul (KRAHL et al., 1997). Na avaliação da prevalência de animais com anticorpos contra o BVDV em 287 soros

de bovinos colhidos em matadouros de diversas regiões do Estado de Minas Gerais, FIGUEIREDO et al. (1997) encontraram 61,47% das amostras reagentes.

Mais abrangente, a Seção de Virologia do Instituto Biológico em São Paulo realizou, no período de julho de 1995 a agosto de 1997, exames para BVD em 4.065 amostras de rebanhos com problemas reprodutivos originários de vários estados; as análises mostraram 47,7% de positividade (PITUCO & DEL FAVA, 1998). Em outro trabalho, SAMARA et al. (2004) encontraram pelo menos um animal reagente no teste de VN do BVDV em todas as dez propriedades pesquisadas, das amostras do Sul do Estado de Minas Gerais, 57,56% eram positivas e do Nordeste do Estado de São Paulo, 56,49% eram soropositivas.

Os principais fatores de risco associados ao BVDV são a entrada de animal persistentemente infectado (PI) no rebanho ou a presença tanto de vacas saudáveis que sofrem a infecção aguda durante o início da gestação como a do animal transitoriamente infectado (GOYAL & RIDPATH, 2005). Outros fatores que contribuem com a disseminação dessa enfermidade no rebanho são a grande densidade da população na propriedade (SOLIS-CALDERON et al., 2005) e o tipo de exploração comercial do rebanho. Segundo ALEXANDRINO et al. (2011), os animais de corte são mais propensos à infecção pelo BVDV, seguidos pelos animais de criação mista, e por último os bovinos leiteiros. Quanto à idade, animais mais velhos apresentam maiores chances de exposição ao vírus, e portanto há maior probabilidade de sofrerem a infecção (MAINER-JAIME et al., 2001; ALEXANDRINO et al., 2011).

O BVDV apresenta estrutura contendo uma cadeia simples de RNA como material genético dentro do capsídeo envolvido por envelope glicoproteico proveniente da membrana das células do hospedeiro infectado (RIDPATH, 2005). Classificado como sendo da família *Flaviviridae* e do gênero *Pestivirus* (COLLET et al., 1988), o BVDV é causador de uma doença viral importante que afeta o sistema reprodutivo dos bovinos, como também o trato gastrintestinal (BAKER, 1995), o respiratório e o sistema imune (BOLIN & RIDPATH, 1996). Devido à diversidade de síndromes que este vírus pode causar, ele foi denominado de patógeno que apresenta muitas faces (BROCK, 2004).

A análise do genoma viral pode revelar a existência dos genótipos: BVDV-1 e BVDV-2 (PELLEGRIN et al., 1994). Os genótipos virais ainda são classificados em subgenótipos BVDV-1a, BVDV-1b, BVDV-2a e BVDV-2b (RIDPATH et al., 2000; FLORES et al., 2002), porém VILCEK et al. (2001) subdividiram o BVDV-1 em 11 subgenótipos de A a K. Além disso, o BVDV pode ser classificado no biótipo citopatogênico (CP) e não citopatogênico (NCP), com base no efeito da sua replicação em células de cultivo (GOYAL & RIDPATH, 2005). Amostras NCP predominam entre os isolados de campo, e as amostras CP, que não ultrapassam 5% da prevalência, são isoladas quase exclusivamente de animais acometidos pela doença das mucosas (DUBOVI, 1992).

A replicação do BVDV está bem caracterizada em células de animais da família dos artiodáctilos, principalmente bovinos e ovinos. A replicação ocorre no citoplasma de células infectadas, e grande quantidade de novos vírions (100 a 1.000) são liberados por exocitose a partir de 10 horas após a infecção (DENG & BROCK, 1993). O BVDV é inativado pelo calor, resistindo até 1 hora à temperatura de 56°C, e pelos desinfetantes comuns como os fenóis; porém pode manter sua infectividade por até 16 meses à temperatura de 40°C negativos (MURPHY et al., 1999). No ambiente, ele pode sobreviver, quando protegido por temperaturas amenas, por vários dias ou mesmo semanas (HOUE, 1995).

Este vírus perde a infectividade após contato com solventes orgânicos como o éter, o clorofórmio, e desinfetantes tais como o iodoform, o fenol, o aldeído e o hipoclorito; após exposição a raios ultravioleta, e numa faixa de pH menor que 5,7 e maior que 9,3 (TREMBLAY, 1996). No estudo realizado por GUNN (1993), sobre a resistência do BVDV em agulhas contaminadas, mantidas em condições ambientais, o vírus sobreviveu por no mínimo três dias.

As consequências clínico-patológicas da infecção pelo BVDV variam de acordo com a idade ou a condição fisiológica do animal (FLORES et al., 2005). A infecção aguda em animais não prenhes pode acometer todas as faixas etárias, principalmente bezerros maiores de seis meses. O fator primordial que determina a intensidade da doença é a virulência da estirpe (FLORES et al., 2005).

Estirpes menos virulentas geram doença assintomática e autolimitante, cursando com alta morbidade e baixa letalidade, ou até mesmo ausente. Estudos sobre a migração do vírus indicam que o BVDV é predominantemente encontrado nos tecidos linfoides. Após sua penetração no hospedeiro pela via oronasal, a principal porta de entrada, o BVDV se replica primariamente nas tonsilas e na mucosa nasal. Em seguida, atinge a corrente linfática e a sanguínea, disseminando-se para linfonodos, timo, baço e mucosa intestinal. Seis dias após a infecção, o vírus desaparece dos tecidos por um rápido período de “clearance” viral (LIEBLER-TENORIO, 2005).

As estirpes de alta virulência causam enfermidade severa, porém inespecífica, caracterizada por febre alta, anorexia, depressão, diarreia, e, em alguns casos, hemorragia. A letalidade pode ser elevada. A migração dessa estirpe é similar à de menor virulência. Contudo, a quantidade de antígenos encontrada nos tecidos é maior que aquelas produzidas pela estirpe de menor virulência. Outra diferença é que a presença dessa estirpe não se restringe aos tecidos linfoides, sendo encontrada na medula óssea. O “clearance” viral dos tecidos não acontece, e o vírus continua se disseminando (LIEBLER-TENORIO, 2005).

O BVDV pode infectar células do sistema imune inato, como por exemplo neutrófilos, monócitos, macrófagos e células dendríticas, afetando suas funções (POTGIETER, 1995; GLEW et al., 2003). Apoptose pode ocorrer em monócitos infectados com BVDV CP (GLEW et al., 2003; LAMBOT et al., 1998). Em bezerros infectados por BVDV pode ocorrer diminuição entre 30% e 70% no número de monócitos (ARCHAMBAULT et al., 2000).

Independentemente da virulência, este vírus é imunossupressor, predispondo os animais acometidos a infecções secundárias por agentes oportunistas como o BoHV-1, o vírus respiratório sincicial bovino, a *Pasteurella haemolytica*, a *Salmonella*, a *Escherichia coli*, além de helmintoses agudas, mastites e metrites (POTGIETER, 1995). Enfermidade respiratória crônica associada a diferentes bactérias e quadros persistentes de dermatite em bezerros confinados têm sido associados ao BVDV (FLORES, 2003).

A principal fonte de infecção para o vírus da BVDV é o bovino persistentemente infectado (PI). Ele elimina continuamente o vírus na natureza até o fim de sua vida. Uma outra importante fonte de infecção é o doente na fase aguda. Esse animal elimina o agente num curto período, sendo conhecido como animal transitoriamente infectado (TI) (FLORES, 2003).

O vírus pode penetrar no animal pelas mucosas do trato respiratório, aparelho genital, aparelho digestório, pela conjuntiva ocular e pela pele; e este pode ser encontrado em quantidades variáveis nas secreções e excreções como descarga nasal, saliva, sêmen, secreções uterinas, urina, fezes, lágrima, leite e colostro (THURMOND, 2005).

A transmissão ocorre por contato indireto e principalmente pelo contato direto entre um animal doente e um suscetível, seja pela cópula, pelo leite e colostro e por transmissão vertical (THURMOND, 2005).

A infecção aguda em animais prenhes é responsável pelos maiores impactos econômicos causados pelo vírus (ROSS et al., 1986). Mesmo sendo originalmente isolado de casos de doença entérica e historicamente associado a episódios de doença digestiva, o conhecimento sobre esse agente mostra que a atuação essencial do BVDV está relacionada aos processos reprodutivos de bovinos (ELLIS et al., 1995; FLORES, 1997).

Após infectar fêmeas prenhes, o BVDV atravessa a placenta e infecta o feto. As sequelas dessa infecção são determinadas pelo período da gestação e pelo biotipo viral CP ou NCP (LIEBLER-TENORIO, 2005). Dependendo do estágio gestacional, se a fêmea for infectada nos dias que antecedem o cio ou nos primeiros dias logo após a cobertura, pode ocorrer infertilidade com repetição de cio (WHITMORE et al., 1981).

A mal formação fetal geralmente ocorre quando a infecção se estabelece entre os dias 100 a 150 da gestação (LIEBLER-TENORIO, 2005). Lesões oculares e no sistema nervoso central são as mais freqüentes, pelo fato de esses sistemas se encontrarem no estágio final de sua organogênese quando ocorre a infecção (LIEBLER-TENORIO, 2005), podendo observar-se aplasia tímica, braquignatismo,

retardo de crescimento e artrogripose (FLORES, 2007). Em alguns rebanhos, as má-formações são os únicos achados que sugerem a presença do BVDV (FLORES, 2005).

Nestes animais prenhes, o BVDV também pode causar morte fetal, reabsorção, abortamento, mumificação, nascimento de bezerros PI (LARSON, 1996; FRAY et al., 2000), natimortos, nascimento de bezerros fracos, débeis, prematuros ou com alterações no crescimento (KRAMPS et al., 1999). A infecção no estágio final de gestação pode comprometer o sistema imune dos bezerros (FRAY et al., 2000). Segundo LARSON (1996), o BVDV pode levar ao abortamento em qualquer fase da gestação, só que a maior ocorrência concentra-se no primeiro trimestre de prenhez. Porém normalmente a morte fetal ocorre até o quarto mês de prenhez, e a partir desse período, há o nascimento de bezerros fracos ou com alterações congênitas (HOUE et al., 1993)

Comprometimento reprodutivo em fêmeas não prenhes infectadas também pode ser observado, como quadros de infertilidade e repetições de cio (WHITMORE et al., 1981). A infecção por BVDV também pode suprimir o sistema imune e predispor os animais a outros patógenos (BAKER, 1995).

Nas espécies não bovídeas, o pestivírus causa em animais não prenhes uma enfermidade geralmente subclínica, porém nas prenhes o vírus também é capaz de atravessar a barreira transplacentária e infectar o feto, podendo, assim, gerar um animal PI, como o BVDV, ou ainda causar abortos, nascimento de animais fracos, inviáveis ou malformações congênitas (FLORES, 2007).

O nascimento de bezerros PI, que se constitui na principal fonte de infecção da doença (BROWNLIE, 1990), ocorre quando fetos são infectados por cepas não citopatogênicas até o 120º dia de gestação, ocasião em que o sistema imune do feto ainda está imaturo, sendo desenvolvidas lesões não letais, e os animais acometidos se tornam imunotolerantes ao vírus, ou seja, não apresentam manifestações clínicas nem desenvolvem respostas imunes, incluindo anticorpos na circulação, porém se mantêm infectados por toda a vida (BIELEFELDT-OHMANN, 1995; DUBOVI, 1998). A prevalência de animal PI em rebanhos infectados é baixa, estando entre 0,5% e 2%; porém nos lotes específicos de bovinos jovens, esse valor pode chegar a 4% (HOUE,

1995). Em pesquisa realizada por DIAS et al. (2010b), a prevalência de PI encontrada em animais jovens, num rebanho com 76 animais, foi de 2,63%.

A doença das mucosas é a forma mais grave da infecção pelo BVDV. Ela acomete animais PI que são sobreinfectados pelo biotipo CP originado, provavelmente, da mutação do biotipo NCP que provocou a infecção persistente, ou seja, de origem endógena (FLORES, 2003). A maioria dos animais PI desenvolve doença das mucosas dos 6 aos 18 meses de idade ou morre antes dos dois anos de idade (BROWNLIE, 1990).

A forma aguda dessa síndrome cursa com baixa morbidade e altíssima letalidade, sendo caracterizada por febre alta, salivação, leucopenia severa, descarga nasal e ocular, diarreia hemorrágica profusa, desidratação, depressão e morte. Na necropsia podem ser observadas lesões ulcerativas e erosivas em toda a mucosa do trato digestório (FLORES 2007).

Há também a forma crônica, que é menos comum. É caracterizada por lesões erosivas crônicas na mucosa oral e na pele, inapetência, perda de peso e apatia progressiva. Os animais podem sobreviver por muitos meses morrendo após debilitação progressiva (FLORES et al., 2005).

Embora a imunidade humoral ativa e a passiva sejam protetoras, elas diferem na longevidade e na habilidade de potencializar uma resposta imune subsequente à exposição viral (HOWARD et al., 1992). A presença de anticorpos contra o BVDV é detectada entre duas e três semanas pós-infecção e pode atingir o platô entre 10 e 12 semanas (HOWARD et al., 1992).

No caso do BVDV, a transmissão ocorre por saliva, fezes, urina, sêmen, embrião, placenta, secreções nasais e oculares, sangue e fômites, e se caracteriza por elevadas taxas de animais soropositivos nos rebanhos expostos aos vírus (REVELL et al., 1988).

Quanto à suscetibilidade ao vírus da diarreia viral bovina (BVDV), o bovino é a espécie de predileção do agente, mas pode ocorrer infecção natural também em suínos e uma grande variedade de ruminantes domésticos e silvestres (RIDPATH & FLORES, 2007). Deste modo, KIM et al. (2006) foram os primeiros a relatar a presença do BVDV-2 em caprinos. O vírus da doença da fronteira, também conhecido por border disease,

que acomete principalmente ovinos, pode infectar naturalmente bovinos, caprinos e suínos (RIDPATH & FLORES, 2007).

As manifestações da diarreia viral bovina podem ser depressão, anorexia, descarga oculonasal, ocasionalmente lesões orais caracterizadas por ulcerações e erosões, diarreia, decréscimo na produção de leite e morte repentina em alguns casos (BAKER, 1995).

A doença normalmente é severa e fatal em bezerros mais jovens, enquanto em animais mais velhos os sinais clínicos geralmente são moderados, evoluindo para a cura (BRUM et al., 2002). Entretanto a manifestação reprodutiva, seja em fêmeas soronegativas, seja em soropositivas, causa o maior impacto econômico, principalmente quando as prenhes soronegativas são infectadas (ROSS et al., 1986).

Os quadros mais graves que evoluem para a morte normalmente se devem a infecções bacterianas secundárias (BÖTTCHER et al., 1993). O processo mais preocupante é a imunossupressão desencadeada pela presença do BVDV, pois os linfócitos de animais infectados apresentam resposta de memória diminuída para outros patógenos (LAMONTAGNE et al., 1989), independentemente de ser uma infecção branda ou aguda, facilitando a patogenicidade de outros microrganismos (HOLLAND et al., 1993). Essa situação proporciona um aumento considerável na incidência e na severidade de doenças do trato respiratório, como, por exemplo, as causadas pelo BoHV-1 ou por patógenos bacterianos (POTGIETER, 1997).

Às vezes, a infecção pelo BVDV pode desencadear sinais clínicos que são muito inespecíficos; portanto, para o diagnóstico é necessária a comprovação laboratorial (DONATE & MAZZUCHELLI, 1995). Como métodos de diagnóstico direto do agente viral são empregados o isolamento em cultivos celulares, a identificação pela imunoperoxidase ou imunofluorescência diretas e a PCR (ALFIERI, 1998).

O método padrão de diagnóstico sorológico mais utilizado para detecção de anticorpos anti-BoHV-1 e anti-BVDV é a VN, que tem como princípio a inibição da infectividade dos vírus em células de cultivo (FULTON et al., 1995). Sendo uma técnica sensível e altamente específica, pode ser utilizada tanto para fins qualitativos, para detecção dos animais positivos, quanto quantitativos, para dosar os títulos de

anticorpos (SANDVIK, 1999). No entanto, o teste de ELISA, que também é eficiente e apresenta alta especificidade e sensibilidade, tem a desvantagem de ser somente qualitativo, não possibilitando a titulação dos anticorpos (CHASE et al., 2003).

Ao realizar o teste de VN para o diagnóstico do BVDV, a maioria dos laboratórios utiliza apenas a estirpe do BVDV-1, sem levar em consideração que existem diferenças entre os genótipos. Tanto que DIAS et al. (2010a), ao examinarem pela VN 1.925 amostras encontraram 1.209 (62,8%) positivas para os dois genótipos, 51 (2,65%) reagindo apenas ao BVDV-1 e 67 (3,5%) somente ao BVDV-2. Apesar de não ter ocorrido diferença estatisticamente significativa, os autores consideram importante a inclusão dos dois genótipos para comprovação sorológica de anticorpos para cada tipo de vírus, pois 118 animais reagiram apenas a um tipo do BVDV. Portanto na rotina de laboratório que empregasse somente o BVDV-1 para diagnóstico, 67 animais teriam resultados falso-negativos. A baixa reatividade cruzada entre o BVDV-1 e o BVDV-2 já tinha sido observada em pesquisas anteriores realizadas por FULTON et al. (1997) e JONES et al. (2001).

As enfermidades virais causadas pelo BoHV-1, pelo BVDV-1 e pelo BVDV-2 acometem principalmente os bovídeos e estão distribuídas em vários países, exceto alguns europeus como Suíça, Áustria, Noruega, Finlândia, Dinamarca e Suécia (ACKERMANN et al., 1990a e 1990b; VAN OIRSCHOT et al., 1999), que, por meio de vacinas com marcadores genéticos, conseguiram erradicar estas enfermidades; outros, por sua vez, estão realizando programas de controle visando a erradicação.

Essas duas realidades ainda estão muito distante das condições sanitárias do Brasil devido às características patogênicas desses vírus, à dimensão do território nacional, ao tamanho da população de bovídeos e à alta prevalência de animais reativos em provas sorológicas em plantéis destinados tanto à produção de leite quanto de carne, o que inviabiliza uma política nacional de erradicação, pelo menos em curto prazo (ALFIERI, et al., 1998).

As medidas de controle da infecção pelo BoHV-1 incluem principalmente o uso de imunização com vacinas vivas atenuadas, inativadas, com marcadores, recombinantes e deletadas (GASTRUCCI et al., 2002). Os principais objetivos do uso

de vacina com marcador são proteger contra a infecção e principalmente diferenciar animal vacinado de animal infectado. Além disso, vacinas vivas atenuadas são capazes de estabelecerem latência com possível reativação e re-excreção viral (ACKERMAN & ENGELS, 2006), não sendo totalmente seguras, porque quando há reversão da virulência ocorre o desencadeamento de abortos (BOLIN, 1995).

No entanto vacinas de vírus vivo modificado mostram ser mais eficientes em reduzirem as manifestações clínicas e conseqüentemente a excreção viral (BOSCH et al., 1998). A vacina inativada, por sua vez, mostrou ser mais eficaz do que a atenuada onde somente exista portadores na condição de animais latente (BOSCH et al., 1997). Para a erradicação dessa enfermidade, a forma mais eficaz é identificar e abater os animais soropositivos, não utilizando vacinas (ACKERMANN et al., 1989).

O controle de infecções causadas por BoHV-1 e BVDV pode ser realizado com ou sem o uso de vacinas (LINDBERG & ALENIUS, 1999). O controle das enfermidades sem utilização de vacinas consiste em diagnosticar e eliminar animais infectados, exigir atestado com resultado negativo para essas viroses antes do ingresso de animais no rebanho e a utilização de sêmen certificado sanitariamente (LINDENBERG & ALENIUS, 1999).

As vacinas que estão disponíveis no mercado são formulações com vírus inativado ou de estirpes modificadas misturadas em adjuvantes oleosos ou de hidróxido de alumínio (VAN DRUNEN LITTEL – VAN DEN HURK, 2005). Essas vacinas normalmente são polivalentes combinando antígenos dos vírus BoHV-1, BVDV, vírus da parainfluenza 3 (PI3V) e vírus sincicial respiratório bovino (BRSV) (PETERS et al., 2004). Contudo, também existem vacinas atenuadas que não são comercializadas no Brasil. Estas vacinas podem induzir níveis de imunidade protetora maior do que as inativadas contra o BoHV-1 e BVDV (BOSCH et al., 1996; LIMA et al., 2005).

No Brasil, são comercializadas vacinas inativadas contra BoHV-1 e BVDV, inclusive algumas delas com estirpes isoladas no país nas formulações (FLORES et al., 2005). Os órgãos oficiais de defesa sanitária animal brasileira, ainda não estabeleceram um programa sanitário para BoHV-1 e BVDV, ficando a critério dos veterinários e produtores adequar individualmente as medidas de controle; portanto, a decisão de

vacinar os animais tem de considerar o diagnóstico correto e a avaliação do custo/benefício do procedimento (DEL FAVA et al., 2003).

A vacinação contra BoHV-1 minimiza os sinais clínicos, diminui a excreção de vírus pelos animais infectados e reduz o curso da enfermidade num possível surto (VAN DRUNEN LITTEL – VAN DEN HURK, 2005; DONKERSGOED & BABIUK, 1991), porém não previne totalmente a ocorrência de infecções primárias e o estabelecimento da latência viral (PATEL, 2005).

Para uma vacina estabelecer proteção segura contra o BoHV-1 é necessário que ocorra a indução simultânea das imunidades humoral e celular (BABIUK et al., 1996). Todavia, nas vacinas com antígenos inativados, predomina a resposta humoral (BOSCH et al., 1996). A vacinação contra o BoHV-1 induz uma proteção relativa contra o BoHV-5, devido a similaridades antigênicas existentes entre os dois vírus, o que leva também a uma reatividade cruzada nos testes sorológicos (VOGEL et al., 2002).

Apesar de as vacinas serem efetivas na redução do impacto clínico causado pelo BoHV-1, pesquisas colocam em dúvida a sua capacidade de prevenir a difusão da enfermidade (MUYLKENS et al., 2007). No Brasil, em certos casos, acredita-se que o uso de vacinas convencionais somente em animais infectados possibilita o convívio, pela diminuição drástica de transmissão do vírus, entre os infectados e os não-infectados (DEL FAVA, 1996). A prática simplista de vacinar os rebanhos com baixa prevalência de infecção não deve ser recomendada; nestes casos, é aconselhável uma política de segregação e descarte racional dos animais soropositivos (STRAUB, 1991).

O controle e a profilaxia do BVDV dependem das condições específicas de cada rebanho (HOUE, 2003). De forma geral, as estratégias consistem em impedir a entrada de animais PI ou sua eliminação do rebanho e a utilização de vacinas (VAN OIRSCHOT et al., 1999; FULTON & BURGE, 2001). O principal objetivo da vacinação são prevenir a infecção do animal e impedir a infecção fetal das fêmeas gestantes (KELLING, 2004). Pesquisa realizada por ARENHART et al. (2008) com formulação atenuada do BVDV mostrou que para conferir proteção fetal o título individual dos animais deve ser alto, e no rebanho deve estar homogêneo, provavelmente acima de 160-320.

As formulações vacinais com antígenos inativados são produzidas com uma ou mais amostras virais e geralmente induzem baixas ou moderadas taxas de anticorpos; por isso necessitam de doses de reforço e revacinações anuais (BOLIN, 1995). A baixa imunogenicidade pode ser multifatorial sendo considerados como fatores que interferem na resposta imune: a concentração antigênica PARREÑO et al. (2010), os métodos de inativação, a formulação e a concentração de adjuvantes e os métodos e/ou a eficiência da emulsificação dos antígenos (SILVA et al., 2007b).

Outro complicador é a existência de dois grupos antigênicos distintos (BVDV-1 e BVDV-2), com grande variabilidade antigênica do vírus, o que prejudica a eficácia das vacinas (VAN OIRSCHOT et al., 1999; DUBOVI, 2004), pois a proteção cruzada entre os dois grupos geralmente é muito baixa (FLORES et al., 2000). Ainda para melhorar a eficácia das vacinas comerciais, é importante incluir estirpes nacionais obtidas de amostras isoladas em focos da enfermidade nos rebanhos de diversas partes do Brasil (JORDÃO et al., 2011).

Nas vacinas contra a BVD, a principal glicoproteína do vírion relacionada com a proteção e, conseqüentemente, com a indução de anticorpos neutralizantes é a E2/gp53 (DONIS et al., 1995). Porém os dois genótipos, BVDV-1 e BVDV-2, são antigenicamente distintos, sobretudo na região dessa glicoproteína (PELLERIN et al., 1994). Por isso existe a reatividade sorológica e a proteção cruzada entre o BVDV tipos 1 e 2 em baixos níveis (FLORES et al., 2000).

No Brasil são comercializadas vacinas cujas estirpes virais do BVDV são americanas (LIMA et al., 2004) e geralmente contêm unicamente o genótipo tipo 1; por isso, o potencial dessas vacinas de induzir títulos de anticorpos que neutralizem o tipo 2 é questionável (SILVA, 2006). Essas vacinas induzem baixos títulos de anticorpos neutralizantes em bovinos e ovinos, principalmente contra amostras brasileiras do BVDV-2 e foram incapazes de conferir proteção fetal em ovelhas prenhes (VOGEL et al., 2002). Os estudos são enfáticos em demonstrar que vacinas convencionais induzem títulos maiores contra o genótipo homólogo relacionado ao BVDV-1 do que contra o genótipo heterólogo, ou seja, o BVDV- 2 (FULTON & BURGE, 2001; VOGEL et al., 2002).

Todavia, mesmo existindo no mercado nacional várias vacinas que ajudam no controle das enfermidades relacionadas neste trabalho precisam ser aprimoradas, para tornarem-se mais seguras e eficientes (ACKERMANN & ENGELS et al., 2006; PETRINI et al., 2011). Além disso, existe a preocupação da indústria farmacêutica veterinária em incluir antígenos desses vírus em vacinas comerciais polivalentes (FLORES et al., 2005).

Para disponibilizar vacinas no mercado é importante o fabricante comprovar a sua eficácia. Um fator relevante é a potência de uma vacina, que é definida como a atividade relativa de um produto biológico determinado por um teste que é realizado no produto final, conforme descrito e aprovado pelas agências reguladoras como o Code Federal Regulation (CFR, 2011). O teste de potência de um lote vacinal é um importante componente para controle realizado no produto final para confirmar a consistência da fabricação e garantir a qualidade lote a lote (McVEY et al., 2003).

A potência de uma vacina é determinada pela atividade relativa do produto biológico em um teste que é aprovado pelas agências reguladoras (CFR, 2011). O teste de potência de um lote vacinal é um importante componente para o controle realizado no produto final para confirmar a consistência da fabricação e garantir a qualidade da vacina lote-a-lote (McVEY, et al., 2003)

O CFR (2011) faz a aprovação dos lotes de vacina e estabelece que, para o BVDV e o BoHV-1, para serem considerados protegidos contra essa enfermidade, 80% dos animais vacinados devem apresentar titulação mínima 8. Estudo realizado por POSPISIL et al. mostrou que títulos neutralizantes maiores ou iguais a 16 têm sido apontados como os mínimos necessários para proteger os animais frente a uma exposição ao agente do BoHV-1 (POSPISIL et al., 1996).

Porém os resultados dos testes sorológicos obtidos em animais vacinados são difíceis de serem interpretados. Para entender parte desta problemática, as pesquisas com infecções experimentais têm respondido muitas questões. Todavia, o uso de espécie-alvo para esses estudos é extremamente oneroso e é difícil conseguir selecionar lotes de bovinos soro-negativos devido a alta prevalência de animais reativos.

Pelo exposto, fica então evidente que é muito importante encontrar um mecanismo alternativo de avaliação da eficácia dessas vacinas que facilite e minimize os problemas apontados. A utilização de modelo experimental com outras espécies de animais é alternativa que tem dinamizado pesquisas em diversas áreas da microbiologia, facilitando o desenvolvimento e a comprovação de eficácia de vacinas (NIEWIESK & PRINCE, 2002). Espécies de menor porte são mais econômicas, têm vantagens como a facilidade de obtenção de animais sem anticorpos contra as enfermidades estudadas (PARREÑO et al., 2010); há a possibilidade de avaliar uma quantidade maior de animais, o que viabiliza uma maior repetibilidade dos dados; além de facilidade de manutenção e manuseio dos animais em condições controláveis, minimizando os fatores de risco que podem interferir nos resultados (SILVA, et al. 2007a).

Vários animais de laboratório têm sido utilizados como modelo experimental para estudos em virologia. Coelhos já foram usados em pesquisa do BoHV-1 e herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5), porém seu soro foi citotóxico, fato que impossibilita a utilização do teste de VN para análise sorológica. Contudo cobaias têm sido modelos eficientes para estudar patogenia e os 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). Além de modelos para estudos de patogenia do HSV-1 e do HSV-2 (LUBINSKI et al., 1998; BERNSTEIN et al., 2000), as cobaias têm sido frequentemente utilizadas em testes de vacinas recombinantes e de subunidade contra esses vírus (DA COSTA et al., 1997; BOURNE et al., 2003; HOSHINO et al., 2005). Nesse sentido, pela pesquisa em apreço, acreditou-se que essa espécie merece ser investigada como alternativa para testes preliminares de vacinas com BoHV-1 e BVDV inativados, principalmente em produtos que já estão no comércio brasileiro.

Há poucos trabalhos realizados com vacinas de bovinos que fazem estudos comparativos mostrando a cinética de anticorpos induzidas por vacinação, o título máximo que as vacinas comerciais são capazes de induzir; avaliação de vacinas monovalentes e polivalentes; testes com diferentes tipos de adjuvantes, comparativo de

vacinas que usam como antígeno estirpes isoladas em outros países e estirpes de isolados nacional.

Devido à importância do uso de vacinas no controle e na prevenção tanto do BoHV-1 quanto do BVDV, este trabalho tem o objetivo de estudar modelos alternativos na avaliação da eficácia das vacinas que são lançadas no mercado e propor uma espécie que não seja a alvo do vírus, para o teste dessas vacinas.

3. OBJETIVOS

Esta pesquisa teve como objetivo geral propor caprinos e cobaias como espécies correlatas de modelo para determinação da eficiência de vacinas comerciais na indução de anticorpos contra o BoHV-1, o BVDV-1 e o BVDV-2

Para isso, dentro dos objetivos específicos buscou-se avaliar comparativamente a eficácia da resposta imunológica em anticorpos pela VN contra o BoHV-1, o BVDV-1 e o BVDV-2 em:

- cobaias e bovinos inoculados experimentalmente com suspensões virais;
- caprinos, cobaias e bovinos imunizados com seis vacinas comerciais disponíveis no mercado nacional e formuladas com antígenos inativados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Esquema experimental

A pesquisa foi dividida em dois experimento. No primeiro foi feita a infecção

experimental em bovinos e cobaias para verificar o título obtido mediante a inoculação do BoHV-1, do BVDV-1 ou do BVDV-2. No segundo experimento foi feita a vacinação de bovinos, caprinos e cobaias para avaliar seis vacinas comerciais disponíveis no mercado nacional. Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética e Bem-Estar Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, câmpus de Jaboticabal, número de protocolo 019456/09.

Na parte experimental que envolve a vacinação das três espécies animais, foram avaliadas as seguintes vacinas nacionais encontradas no comércio:

Vacina 1 (V1): Indicada para a imunoprofilaxia das seguintes enfermidades: BVDV-1 e BVDV-2, BoHV-1, leptospirose, vírus respiratório sincicial bovino, parainfluenza tipo 3 e campilobacteriose. Adjuvante contendo hidróxido de alumínio e selenato de sódio na relação de 4,8mg/mL de vacina. A dose recomendada de 5 mL foi aplicada por via subcutânea.

Vacina 2 (V2): Indicada para a imunoprofilaxia das seguintes enfermidades: BVDV, BoHV-1, leptospirose, campilobacteriose e hemofilose bovina. Adjuvante contendo hidróxido de alumínio. A dose recomendada é de 5 mL, para ser aplicada por via subcutânea.

Vacina 3 (V3): suspensão líquida de antígenos inativados por betapropiolactona, em adjuvante contendo gel de hidróxido de alumínio. Indicada para a imunoprofilaxia das seguintes enfermidades: BVDV-1, BVDV-2, BoHV-1, leptospirose, vírus respiratório sincicial bovino, parainfluenza tipo 3 e pasteurelose bovina. A dose recomendada é de 5 mL, para ser aplicada por via subcutânea.

Vacina 4 (V4): Indicada para a imunoprofilaxia das seguintes enfermidades: BVDV-1 e BVDV-2, BoHV-1, BoHV-5 e leptospirose. Adjuvante oleoso (emulsão com óleo mineral leve). A dose recomendada é de 5 mL, para ser aplicada por via subcutânea.

Vacina 5 (V5): Indicada para a imunoprofilaxia das seguintes enfermidades: BVDV, BoHV-1, vírus respiratório sincicial bovino, parainfluenza tipo 3 e leptospirose. Adjuvante contendo hidróxido de alumínio. A dose recomendada é de 5 mL, para ser aplicada por via intramuscular.

Vacina 6 (V6): Indicada para a imunoprofilaxia das seguintes enfermidades: BVDV-1, BVDV-2, BoHV-1, BoHV-5, leptospirose e campilobacteriose. Adjuvante contendo selenato de sódio na relação de 4,8 mg/mL na vacina e hidróxido de alumínio a 10%. A dose recomendada é de 5 mL, para ser aplicada por via subcutânea.

Todos os fabricantes enfatizam a necessidade da aplicação da dose de reforço da vacina nos primovacinação, com intervalos de 21 a 28 dias e revacinação anual, exceto a V1 que recomenda revacinação semestral.

4.2 Animais de Experimentação

4.2.1 Infecção experimental em bovinos e cobaias

Os animais envolvidos na infecção experimental ficaram confinados no setor de infectório de enfermidades infecciosas do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, da FCAV. Foram selecionados seis bovinos soronegativos que apresentavam bom escore corporal, estavam entre 12 e 15 meses de idade e eram mestiços. Os animais foram organizados em três grupos de dois animais cada, e em cada grupo foi utilizada uma suspensão viral contendo um dos três vírus estudados. Os animais do primeiro grupo foram desafiados com uma suspensão viral de BoHV-1 estirpe *Nebraska*, proveniente da Universidade Estadual de Londrina – PR; os do segundo grupo, com uma suspensão de BVDV-1 estirpe *Singer*, e os do terceiro, com suspensão de BVDV-2 estirpe VS253; ambas as estirpes de BVDV foram provenientes do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria – RS.

As doses infectivas em culturas de tecidos ($DICT_{50}$) foram calculadas pelo método de REED & MUENCH (1938). A inoculação viral nos bovinos foi realizada por via intranasal, para simular uma infecção ambiental natural, em uma dose viral de $10\text{mL} \times 10^{6,5}$ para o BoHV-1, $10\text{mL} \times 10^{5,8}$ para o BVDV-1 e $10\text{mL} \times 10^{5,7}$ para o BVDV-2, sendo instilados 5mL da suspensão em cada narina. Os animais permaneceram isolados e a inoculação viral ocorreu em diferentes dias para cada grupo, para evitar que ocorresse infecção cruzada nos animais. Amostras de sangue foram colhidas por punção da veia cauda nos dias 0, 7, 15 e 30 do experimento para acompanhar a resposta sorológica após a infecção dos animais.

Também foram empregadas 96 cobaias machos, com peso aproximado de 300g (+/- 50g) provenientes do biotério da UNESP, câmpus de Botucatu. Para a infecção com o BoHV-1 foram utilizados 24 animais, separados em dois grupos, G1 e G2, com 12 animais cada. Em cada um desses grupos foram inoculados por via subcutânea doses diferentes de suspensão viral de BoHV-1, sendo $1,25\text{mL} \times 10^{6,5}$ para os animais do G1 e $0,625\text{mL} \times 10^{6,5}$ para as cobaias do G2.

Em relação ao BVDV-1 e ao BVDV-2 foram testadas três doses de suspensão viral, utilizando-se 72 cobaias, que foram separadas em seis grupos de doze animais cada, sendo três grupos inoculados por via subcutânea com suspensão de BVDV-1 e os demais com o BVDV-2. As estirpes virais foram as mesmas utilizadas nos bovinos, e a dose de vírus utilizados para infecção do BVDV-1 foram de $2,5\text{mL} \times 10^{5,8}$; $1,25\text{mL} \times 10^{5,8}$; e $0,625\text{mL} \times 10^{5,8}$; e para o BVDV-2 foram de $2,5\text{mL} \times 10^{5,7}$; $1,25\text{mL} \times 10^{5,7}$; e $0,625\text{mL} \times 10^{5,7}$. As doses foram baseadas em dados obtidos no trabalho de SILVA et al. (2007a), que vacinou cobaias com formulações contendo BoHV-1 e BVDV-1. Foi considerado como dia zero do experimento o dia em que os animais foram inoculados com as suspensões virais. Foram colhidas amostras de sangue nos dias 15, 30, 60 e 90, por punção intracardíaca, para acompanhar a resposta sorológica após a infecção dos animais.

4.2.2 Vacinação em bovinos

Para este experimento foram utilizados 61 fêmeas bovinas holandesas, com faixa etária variando dos 10 meses até a fase adulta. Todos foram soronegativos no teste de VN para os três vírus de estudo. Com esses animais foram organizados seis grupos experimentais: V1Bo, formado por nove animais; V2Bo, por 17; V3Bo, V4Bo e V5Bo, por sete; e V6Bo, por oito. O grupo controle, que tinha cinco animais, não foi vacinado. Os animais receberam as formulações, segundo as recomendações dos fabricantes, nos dias 0 e 28 do experimento; e as colheitas de sangue foram realizadas nos dias 28 e 56, por punção da veia caudal. Após este procedimento, o sangue foi mantido em repouso para obtenção do soro, que, por sua vez, foi armazenado em tubos tipo “eppendorf”, em freezer com temperatura de aproximadamente 20°C negativos até o momento do uso.

4.2.3. Vacinação em caprinos

Inicialmente, o trabalho também seria realizado em caprinos soronegativos quanto à presença de anticorpos neutralizantes contra os vírus estudados. Porém foram triados soros de 309 animais, oriundos de cinco propriedades localizadas nos Estados de Minas Gerais, municípios de Itamogi e Monte Santo de Minas; e São Paulo, municípios de Ipiruá, Paulo de Faria e Poloni.

Das 309 amostras analisadas, nenhuma foi reagente ao BVDV-1 e ao BVDV-2, porém 209 amostras foram positivas para o BoHV-1. Diante da dificuldade de encontrar animais negativos para o BoHV-1, foram utilizados os animais das três propriedades localizadas no Estado de São Paulo.

Desta forma, foram selecionados 68 caprinos, 27 oriundos da propriedade localizada em Ipiruá, 19 de Paulo de Faria e 22 de Poloni. Os animais foram organizados em seis grupos, para testar as mesmas seis vacinais comerciais usadas no experimento com bovinos. Os caprinos foram separados em grupos: V1Cp e V5Cp com 10 animais, V2Cp, V3Cp e V4Cp com nove animais cada, V6Cp com 11 e o grupo

controle com 10 animais. Os animais estavam na faixa etária dos 4 meses até a fase adulta, alguns eram mestiços, outros da raça bôer e anglo nubiano.

Os animais foram vacinados nos dias 0 e 28 do experimento, tendo cada grupo recebido a dosagem na via de administração recomendada pelo fabricante para bovinos. Foi considerado o dia 0 o dia da realização da primovacinação. Para uma melhor análise dos resultados, amostras de sangue foram colhidas nos dias -21, ou seja, 21 dias antes da primeira vacinação; 0, 28 e 56 do experimento, por punção da veia jugular, através de tubo vacutainer. Logo após este procedimento, o sangue foi mantido em repouso e após obteve-se o soro, que, por sua vez, foi colocado em tubos tipo “ependorf” e armazenado em freezer com temperatura de aproximadamente 20°C negativos até o momento do uso.

4.2.4 Vacinação em cobaias

A parte experimental usando cobaias provenientes do biotério da UNESP, câmpus de Botucatu, foi separada em duas etapas. Para a primeira etapa foram selecionadas 65 cobaias e para a segunda 78, todos machos e com peso individual aproximado de 350g. Em ambas as etapas os animais ficaram confinados no setor de infectório de enfermidades infecciosas do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, da FCAV.

Na primeira etapa as 65 cobaias foram distribuídas em seis grupos de 10 animais cada, como estabelecido no trabalho de SILVA et al. (2007a) para avaliação de vacina. Os animais foram vacinados, por via subcutânea, nos dias 0 e 28 do experimento e a vacina utilizada nesta etapa continha suspensão líquida de antígeno inativado do vírus do BVDV-1, BVDV-2, BoHV-1, leptospirose, vírus respiratório sincicial bovino e parainfluenza tipo 3. Foi considerado dia 0 do experimento o dia em que os animais receberam a primovacinação. A dose recomendada pelo fabricante em bovinos é de 5mL e a via de administração pode ser subcutânea ou intramuscular. As doses fracionadas da vacina foram: 0,32mL, 0,64mL; 1,6mL; 2,0mL; 2,5mL e 3,2mL, conforme

parâmetros da literatura pertinente (SILVA et al., 2007a). Cinco animais não foram vacinados formando o grupo controle.

Depois de estabelecida a dose que melhor induziu resposta imunológica nas cobaias da primeira etapa, foi realizada a segunda parte do experimento, testando-se agora seis vacinas comerciais disponíveis no mercado nacional, que foram as mesmas utilizadas nos bovinos e caprinos. As cobaias de cada grupo receberam a dose de 3,2mL de uma das vacinas. Nesta etapa, assim como na anterior, cinco animais não foram vacinados, formando o grupo controle.

Amostras de sangue das cobaias foram colhidas em seringas descartáveis por meio de punção intracárdica nos dias 28 e 56 de ambas as etapas do experimento. Logo após este procedimento, o sangue foi transferido para um tubo sem anticoagulante o qual foi mantido em repouso e após obteve-se o soro, que, por sua vez, foi colocado em tubos tipo “eppendorf” e armazenado em freezer com temperatura de aproximadamente 20°C negativos até o momento do uso.

4.3 Manutenção das culturas celulares

As células de linhagem permanente Madin & Darby Bovine Kidney (MDBK), adquiridas no Cell Bank, localizada no Rio de Janeiro, eram mantidas por monocamada em frascos de cultura celular de poliestireno (TPP®), contendo meio de crescimento Eagle-MEM® (*Minimum Essencial Medium*), acrescidos de 0,2% de bicarbonato de sódio e adicionado de 10% de soro fetal bovino livre de micoplasma e BVDV. O meio de cultivo era frequentemente renovado de acordo com a necessidade e a produção celular. Para a obtenção da suspensão celular o meio era descartado e posteriormente era adicionada solução de tripsina sobre a monocamada, a qual era mantida durante dois a três minutos para promover o desprendimento do tapete celular e a individualização das células. Em seguida a solução de tripsina era desprezada e as células da monocamada eram ressuspensas com meio de crescimento (Eagle-MEM)

contendo 10% soro fetal bovino, de maneira a apresentar concentração equivalente a 2×10^5 céls/mL, sendo redistribuídas em novos frascos para a utilização após 72 horas.

4.4 Amplificação viral

As amostras dos vírus BoHV-1 (Nebraska), BVDV-1 (Singer) e BVDV-2 (VS253) eram mantidas em laboratório por meio de passagens sucessivas em células MDBK, cultivadas em monocamada, utilizando-se frascos de poliestireno e meio Eagle-MEM como nutriente. Para a amplificação viral era removido o meio de cultura contido na garrafa de poliestireno e à monocamada eram acrescentados 3 mL de meio de manutenção celular para promover a retirada das células mortas. Em seguida esse meio era desprezado e 1mL de um dos vírus era acrescentado ao tapete celular. A cultura então era incubada à temperatura de 37°C, durante 60 minutos para que ocorresse a adsorção do vírus às células. Após esse período, adicionava-se 15mL do meio Eagle nas culturas com BoHV-1 e, nas culturas com BVDV-1 ou BVDV-2, além do meio de manutenção era acrescentado 5% de SFB, sendo depois as culturas mantidas em incubação à temperatura de 37°C. A leitura do efeito citopatogênico foi acompanhada várias vezes ao dia, por observação no microscópio invertido. Quando o efeito citopatogênico atingia aproximadamente 70% do tapete celular, o material era congelado, e logo após, passado por um descongelamento rápido a fim de ocasionar a lise das células e liberar as partículas virais que estavam localizadas internamente. A solução obtida era submetida a centrifugação à temperatura de 4°C durante 15 minutos para a decantação dos restos celulares. Posteriormente, o sobrenadante foi distribuído em alíquotas de 1mL em criotubos para armazenamento em nitrogênio líquido, com temperatura de 196°C negativos.

4.5 Titulação viral

A titulação viral foi realizada em placas de microtitulação, após a preparação de oito tubos com diluições seriadas na base 10 da suspensão viral original, desde 10^{-1} até 10^{-8} . Em uma placa de poliestireno de 96 orifícios (12 colunas x 8 linhas), de fundo chato, foram distribuídos 50µL de meio de manutenção celular nas colunas de 1 a 8 e de 10 a 12. A seguir, foram adicionados 50µL de cada diluição em uma das respectivas colunas da placa, sendo a coluna 1 correspondente à diluição 10^{-1} e assim sucessivamente, até a oitava coluna, com a diluição 10^{-8} . Nas colunas de 10 a 12 foram acrescentados apenas 100 µL de meio de manutenção celular. Por último, foram adicionados 50µL de suspensão celular em uma concentração de 3×10^5 céls/mL, em todas as cavidades da placa, exceto na coluna 9, que permaneceu vazia para separar as colunas do controle celular das que recebiam suspensão viral.

A placa foi então mantida em incubadora com atmosfera controlada de 5% de CO_2 e na temperatura de 37°C. Decorridas 72 horas foi realizada a leitura final em microscópio óptico invertido com objetiva de 100. O cálculo da DICT_{50} foi realizado pelo método de REED & MUENCH (1938).

4.6 Pesquisa de anticorpos virusneutralizantes

Antes de se realizar os testes, os soros foram inativados em banho-maria a uma temperatura de 56°C por um período de 30 minutos. As alíquotas de soro foram testadas em duplicata pela técnica de VN, segundo o procedimento operacional preconizado pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE, 2009).

O soro de cobaia é naturalmente citotóxico para as células de linhagem MDBK que são utilizadas nas reações de VN. Com a finalidade de neutralizar esse efeito tóxico, os soros provenientes das cobaias foram incubados em estufa a 37 °C, por um período de uma hora, numa proporção de 1:2 de amostra de soro de cobaias com SFB (JORDÃO, 2006).

4.6.1 VN para o BoHV-1

Nos testes para detecção de anticorpos contra o BoHV-1 foram utilizadas suspensões virais com 200 DICT₅₀ partindo da diluição 1:2 com o soro dos bovinos e dos caprinos; devido ao efeito da citotoxicidade do soro das cobaias, partiu-se então da diluição 1:4, nesta espécie, pelos motivos expostos anteriormente.

Em cada placa de microtitulação com 96 cavidades de fundo chato, sendo oito linhas por doze colunas, foram analisadas quatro amostras de soro de bovinos em duplicata. As colunas um e dois de cada placa foram utilizadas respectivamente para o controle do tapete celular e da citotoxicidade do soro do animal, tendo sido adicionados 100 µL de meio de manutenção celular MEM[®] em cada cavidade da coluna um e 50 µL de meio adicionados nos poços da coluna dois. Da coluna três em diante, a diluição do soro foi realizada iniciando-se com 1:2 até 1:1024. Para isto foram adicionados 50 µL de soro do animal nas colunas três e quatro e 50µL do meio de manutenção em todas as cavidades das colunas de quatro a 12. Em seguida, foi realizada a diluição das amostras. Foi homogeneizada a mistura da quarta coluna, depois foram retirados 50 µL e passados para as cavidades da quinta coluna e assim sucessivamente até a décima segunda; após a homogeneização da mistura foram retirados e descartados 50 µL, para manter a igualdade dos volumes dessa última coluna com as demais.

Após a diluição seriada, em cada poço, foram adicionados 50µL da suspensão viral ajustada a uma concentração de 200 DICT₅₀ do BoHV-1 da estirpe Nebraska, para em seguida as microplacas serem incubadas em estufa com atmosfera controlada de 5% de CO₂ à temperatura de 37°C por um período de 18 a 24 horas. Na próxima etapa, na mistura soro com vírus foram acrescentados 100µL de uma suspensão de células MDBK, em uma concentração de 3 X 10⁵ céls/mL, e novamente as placas foram submetidas à incubação sob as mesmas condições. Decorrido um período de 72 horas, foi feita a leitura em microscópio óptico com objetiva invertida. Foi considerada reagente a amostra de soro que neutralizou o vírus a partir da diluição 1:2. O título de anticorpos foi considerado a partir da última diluição do soro que neutralizou o vírus, ou seja,

expresso como a recíproca da última diluição em que não foi observado efeito citopatogênico característico, sendo o seu valor o inverso da diluição.

As amostras de soro provenientes das cobaias foram também submetidas à técnica de VN da mesma forma que os soros dos bovinos. A diferença é que, por ser um soro naturalmente citotóxico às culturas da MDBK, os soros destes animais foram incubados em estufa com atmosfera controlada com tensão de 5% de CO₂, à temperatura de 37°C, numa proporção de 1:2 com soro fetal bovino, por um período de uma hora, antes de se proceder à diluição seriada. Portanto, as diluições obtidas com esses soros foram de 1:4 até 1:2048.

4.6.2 VN para o BVDV

Os soros testados passaram pelos mesmos processos que o descrito anteriormente para o BoHV-1, porém, na reação de virusneutralização para o BVDV-1 e o BVDV-2 foram utilizadas suspensões virais com 100 DICT₅₀, partindo da diluição 1:10 para os soros dos bovinos e caprinos e 1:4 para o soro das cobaias.

As colunas um e dois permaneceram como controles de tapete celular e soro animal, respectivamente. Para o soro dos bovinos foram adicionados 100µL de meio de manutenção nos poços da coluna um. Nas colunas dois e três foram adicionados 80 µL de meio acrescidos de 20 µL de soro animal nas cavidades destas duas colunas. Nas colunas de quatro a doze foram pipetados 50 µL de meio. Em seguida foi realizada a diluição seriada partindo da coluna três até a coluna 12, como descrita na pesquisa de anticorpos de BoHV-1.

Após a diluição seriada, em cada poço foram adicionados 50µL da suspensão viral ajustada a uma concentração de 100 DICT₅₀ da estirpe *Singer* de BVDV-1 e SV253 de BVDV-2, para em seguida as microplacas serem incubadas em estufa com atmosfera controlada de 5% de CO₂, à temperatura de 37°C. Transcorrida uma hora, à mistura soro e vírus foram acrescentados 50µL de uma suspensão de células MDBK, em uma concentração de 3×10^5 céls/mL, sendo novamente incubada nas mesmas

condições por um período de 96 horas, para posterior leitura em microscópio invertido. A amostra de soro considerada reagente pela presença de anticorpos foi aquela que neutralizou o vírus a partir da diluição 1:10. Assim como na reação para detecção de anticorpos contra o BoHV-1, o título foi expresso com o valor inverso da última diluição em que foi observado o efeito citopatogênico.

As amostras das cobaias submetidas à pesquisa de anticorpos contra BVDV-1 e BVDV-2 tiveram a primeira diluição de 1:4 seguindo até 1:2048, como na reação para a pesquisa de anticorpos contra o BoHV-1.

4.7 Controle das DICT₅₀

Nas reações de VN foram também verificadas se as DICT₅₀ do BoHV-1, do BVDV-1 e o BVDV-2 estavam dentro do intervalo de validação do teste preconizado pelo Manual of Diagnostic Tests and Vaccines of Terrestrial Animals” (OIE, 2007), que é de 100 a 200 DICT₅₀ para o BoHV-1, e de 30 a 300 DICT₅₀ para ambos os BVDV.

4.7.1 Controle das DICT₅₀ para o BoHV-1

Inicialmente, para o preparo das 200 DICT₅₀ utilizadas na reação de VN para o BoHV-1, do valor apresentado na titulação viral foi subtraído o logaritmo de 200 DICT₅₀ (2,3) e do resultado dessa subtração foi obtido o antilogaritmo correspondente, que representava o volume final da diluição que conteria as 200 DICT₅₀. A mesma diluição que definiu as 200 DICT₅₀ para o BoHV-1 também foi utilizada na placa de validação da reação. A partir delas foram obtidas as diluições que definiram 0,2, 2, 20 e 200 DICT₅₀.

Para o preparo da diluição com 20 DICT₅₀, foi adicionado 0,2 mL da diluição de 200 DICT₅₀ em 1,8 mL de meio de manutenção Eagle-MEM, e para o preparo da diluição que definiu 2 DICT₅₀ foi diluído 0,2 mL da diluição de 20 TCID₅₀ em 1,8 mL de meio de manutenção Eagle-MEM e por fim, para o preparo da diluição que definiu 0,2

DICT₅₀ foi diluído 0,2 mL da diluição de 2 DICT₅₀ em 1,8 mL de meio de manutenção Eagle-MEM.

Após o preparo das diluições, em uma placa de microtitulação com 96 cavidades, (8 linhas x 12 colunas) foram adicionados 50 µL em cada cavidade das quatro primeiras colunas da placa de microtitulação, respectivamente das diluições 0,2, 2, 20 e 200 DICT₅₀. Nesta placa, a última coluna foi destinada ao controle de suspensão celular e não foi adicionado nenhum reagente na quinta e na décima primeira coluna, consistindo assim colunas limítrofes.

Em cada reação também eram realizados os mesmos procedimentos de titulação descritos no item 4.5, pois a suspensão viral foi obtida a partir de uma das diluições (10^1 a 10^{-8}), e o título viral estabelecido foi confirmado utilizando as cinco colunas que ainda restavam na placa. Pelo fato do título já ser previamente conhecido, foram utilizadas apenas as diluições com intervalos próximos ao título. Sendo assim, foram adicionados, em cada coluna, 50 µL de diluição por cavidade nas colunas correspondentes as diluições desejadas. Após esse procedimento a placa era incubada em estufa com atmosfera controlada com 5% de CO₂ e temperatura de 37 °C, por um período de 1 hora, pois esta placa foi submetida aos mesmos intervalos de tempo da reação de VN. Transcorrido essa etapa, foram adicionados, em todas as cavidades da placa, 50 µL de suspensão celular contendo 3×10^5 cels/mL em meio de manutenção Eagle-MEM com 10% de soro fetal bovino.

A placa de validação foi mantida em estufa a 37°C com atmosfera controlada contendo 5% de CO₂ por 72 horas. A sua leitura foi realizada antes das demais placas da reação de VN, pois os resultados nela encontrados validavam ou não o teste realizado.

4.7.2 Controle das DICT 50 para o BVDV-1 e o BVDV-2

O controle das DICT₅₀ foi o mesmo para ambos os BVDV, sendo utilizado 100 DICT₅₀. O valor subtraído era o logaritmo de 100 (2,0) e as 100 DICT₅₀ também foi utilizada na placa de validação da reação. A partir delas foram obtidas as diluições que

definiram 1, 10 e 30 DICT₅₀ para ambos os BVDV. Para o preparo da diluição com 10 DICT₅₀, foi adicionado 0,2 mL da diluição de 100 DICT₅₀ em 1,8 mL de meio de manutenção Eagle-MEM, e para o preparo da diluição que definiu 1 DICT₅₀ foi diluído 0,2 mL da DICT₅₀ de 10 DICT₅₀ em 1,8 mL de meio de manutenção Eagle-MEM. No calculo de 30 TCID₅₀ foi diluído 0,6 mL de 100 DICT₅₀ em 1,4 mL de meio de manutenção Eagle-MEM.

A partir desse ponto a reação foi realizada da mesma forma que para o controle das DICT₅₀ como descritas para o BoHV-1, sendo a única diferença o período final de incubação que, neste caso, foi de 72 horas.

4.8 Análise estatística

Os resultados obtidos com a infecção experimental foram submetidos a comparações das médias dos títulos de anticorpos entre os diversos grupos de cobaias infectadas nos diferentes períodos utilizando um delineamento com medidas repetidas no tempo com dois fatores: o volume de suspensão viral do grupo infectado, sendo dois volumes para o BoHV-1, e três para o BVDV-1 e o BVDV-2, como um dos fatores; e o tempo, com quatro períodos, sendo 15, 30, 60 e 90 dias após a infecção, como o outro fator. Quando houve diferença entre as médias pelo teste F, a comparação foi feita pelo teste de Tukey, com probabilidade de 5%.

No experimento com vacinação dos animais os valores não apresentaram homocedasticidade, mesmo após a transformação logarítmica dos títulos individuais dos animais; neste caso, foi utilizada estatística não paramétrica. Foram realizadas as comparações entre os grupos no mesmo tempo, pelo método de Kruskal-Wallis, com comparação múltipla de Dunn, e comparação entre tempos amostrais no mesmo grupo, pelo método de Mann-Whitney. Para isso foi utilizado o programa Graph Pad Prism versão 5.0.

5 RESULTADOS

O soro dos animais foram submetidos a técnica de VN e a média geométrica dos títulos de anticorpos (GMT) calculada em todos os grupos, para os diferentes vírus e vacinas, foram realizadas apenas com os animais que apresentaram anticorpos detectáveis nesta técnica, desconsiderando-se dessa forma, os animais não reagentes, como foi realizado no trabalho de SILVA et al. (2007a).

5.1 Infecções experimentais

5.1.1 Bovinos

Assim como na infecção experimental com cobaias, a média geométrica dos títulos de anticorpos (GMT) calculadas em todos os grupos dos bovinos, para os diferentes vírus, foram realizadas apenas com os animais que apresentaram anticorpos, desconsiderando-se dessa forma, os animais que permaneceram com títulos inferiores aos detectados na técnica de VN.

Os bovinos inoculados com o vírus do BoHV-1 e do BVDV-1 apresentaram febre moderada, corrimento nasal seromucoso por um período de 5 dias e aparecimento de úlcera na mucosa bucal; porém os animais inoculados com o BVDV-2 apresentaram apenas febre moderada no período observado.

No caso das infecções experimentais em bovinos, como pode ser visto na tabela 1, aqueles inoculados com BoHV-1 apresentaram considerável título de anticorpos sete dias após a infecção, sendo de 215 a GMT obtida nesse período. Aos 15 dias, a GMT aumentou para 1024, e aos 30 dias, para 2048.

Os dois bovinos inoculados com BVDV-1 não apresentaram resposta imune ao vírus aos 7 dias após a infecção. Aos 15 dias a GMT foi 28, e aos 30 dias, 1076. (tabela 1).

Os bovinos infectados com BVDV-2 também não desenvolveram resposta ao vírus no dia 7 após a infecção. Na segunda colheita, aos 15 dias do experimento, os dois animais responderam ao vírus e a GMT foi igual a 24, aumentando consideravelmente para 905 aos 30 dias após a infecção. (tabela 1).

Tabela 1. Média geométrica dos títulos de anticorpos (GMT), em grupos de bovinos, nos diferentes dias de colheita, após infecção experimental com o BoHV-1, o BVDV-1 e o BVDV-2

Vírus	7 dias	15 dias	30 dias
BoHV-1 - 10mL x 10 ^{6,5} DICT ₅₀)	215	1024	2048
BVDV-1 - 10 mL x 10 ^{5,8} DICT ₅₀)	0	28	1076
BVDV-2 - 10 mL x 10 ^{5,7} DICT ₅₀)	0	24	905

É importante ressaltar que, aos 15 dias após a infecção, os bovinos infectados com BVDV-1 soroconverteram de forma heteróloga para BVDV-2 e vice-versa. A GMT anti-BVDV-2 foi de 20 nos animais infectados com o BVDV-1 aos 15 dias e de 320 aos 30 dias após a inoculação. A GMT anti-BVDV-1 nos animais infectados com o BVDV-2 foi de 3 e 40, nos dias 15 e 30, respectivamente. Os animais infectados com BoHV-1 não se tornaram reagentes a nenhum dos tipos de BVDV. Esses dados estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2. Comparação das médias geométricas dos títulos de anticorpos (GMT), dos grupos de bovinos, mostrando a reação cruzada no teste de virusneutralização, nos diferentes dias de colheita após infecção experimental com o BVDV-1 o BVDV-2

Vírus	7 dias	15 dias	30 dias
	BVDV-1/BVDV-2	BVDV-1/BVDV-2	BVDV-1/BVDV-2
BVDV-1 -10mL x 10 ^{5,8} DICT ₅₀	0/0	28/20	1076/320
BVDV-2 – 10mL x 10 ^{5,7} DICT ₅₀	0/0	3/24	40/905

5.1.2 Cobaias

Durante o decorrer do experimento com cobaias, alguns animais morreram no procedimento de colheita do sangue e outros morreram por motivos inexplicados, fatos

que ocorreram em todos os grupos inoculados, independentemente da suspensão viral utilizada. Todas as cobaias sobreviventes infectadas com o vírus BoHV-1 desenvolveram resposta imune detectada em todas as colheitas. Como podem ser observadas na tabela 3, as GMT, somente dos animais que foram reagentes na VN, produzidos pelo grupo infectado com 0,625mL de suspensão viral aos 15, 30, 60 e 90 dia foram, respectivamente, 116, 84, 155 e 48. Para o grupo infectado com 1,250mL de suspensão viral, as GMT nos mesmos períodos foram, respectivamente, 166, 187, 174 e 52. Esses dados estão apresentados na tabela 3.

Não houve diferença estatística significativa entre as médias dos títulos de anticorpos dos dois grupos pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, o que indica que para o BoHV-1 os níveis de anticorpos não aumentaram com a inoculação de maior quantidade de vírus (Tabela 3).

As médias dos títulos de anticorpos das cobaias aos 15, 30 e 60 dias também foram consideradas estatisticamente semelhantes, porém aos 90 dias após a infecção houve uma queda estatisticamente significativa nos títulos de anticorpos nos dois grupos (Tabela 3).

Tabela 3. Média geométrica dos títulos de anticorpos (GMT), dos grupos de cobaias, nos diferentes dias de colheita, após infecção experimental com diferentes doses de BoHV-1

Doses	GMT (animais reagentes/analizados)			
	15	30	60	90
0,625mL x 10^{6,5} DICT₅₀	116 ^{aA*} (11/11)	84 ^{aA} (10/10)	155 ^{aA} (9/9)	48 ^{aA} (7/7)
1,250mL x 10^{6,5} DICT₅₀	166 ^{aA} (10/10)	187 ^{aA} (9/9)	174 ^{aA} (8/8)	52 ^{aA} (8/8)

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si significativamente pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade.

Em relação ao BVDV-1, nem todas as cobaias infectadas desenvolveram resposta imune humoral depois da inoculação. Das cobaias infectadas com 0,625mL x 10^{5,8} DICT₅₀, 60% (6/10) apresentaram anticorpos aos 15 dias após a infecção, com 5 de GMT; aos 30, 60 e 90 dias, 80% (8/10) cobaias apresentaram anticorpos para o BVDV-1, com 25, 11 e 7 de GMT respectivamente. No grupo infectado com 1,25mL,

observou-se que 63% (7/11) das cobaias foram reagentes ao BVDV-1, 15 dias após a infecção, com 5 de GMT; aos 30 dias, 88% (8/9) apresentaram positividade, com 35 de GMT; aos 60 dias, 62% (5/8), com 10 de GMT, e aos 90 dias 57% (4/7), com 8 de GMT.

No grupo inoculado com 2,5mL de suspensão viral, aos 15 dias após a infecção, 81% (9/11) das cobaias infectadas apresentaram anticorpos contra o vírus, com 20 de GMT; aos 30 dias, todas as cobaias foram reagentes, com 102 de GMT; aos 60 dias, 88% (8/9) apresentaram anticorpos detectáveis na reação, com 53 de GMT; e aos 90 dias, todos os animais estavam reagentes, com 58 de GMT. Os animais não reagentes, na primeira diluição foram considerados como tendo título menor do que 4 e seus dados não foram incluídos nos cálculos das GMT. Todos esses dados estão apresentados na tabela 4.

Para o BVDV-1, a análise estatística indicou que as doses de 0,625mL e 1,250mL de suspensão viral induziram uma resposta imune semelhante, porém a dose de 2,5mL induziu resposta significativamente maior. A comparação entre os dias de colheita indicou que as médias dos títulos de anticorpos aos 15, 60 e 90 dias são estatisticamente semelhantes e que a média aos 30 dias é significativamente superior, o que indica que houve um pico na produção de anticorpos nesse período. (Tabela 4)

Tabela 4. Média geométrica dos títulos de anticorpos (GMT), dos grupos de cobaias, nos diferentes dias de colheita, após infecção experimental com diferentes doses de BVDV-1

Doses	GMT (animais reagentes/analizados)			
	15	30	60	90
0,625mL x 10^{5,8} DICT₅₀	5 ^{ba*} (6/10)	25 ^{aA} (8/10)	11 ^{ba} (8/10)	7 ^{ba} (8/10)
1,25mL x 10^{5,8} DICT₅₀	5 ^{ba} (7/11)	35 ^{aA} (8/9)	10 ^{ba} (5/8)	8 ^{ba} (4/7)
2,5mL x 10^{5,8} DICT₅₀	20 ^{bb} (9/11)	102 ^{ab} (11/11)	53 ^{bb} (8/9)	58 ^{bb} (9/9)

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si significativamente pelo teste de Tukey a um nível de 5% de probabilidade.

Poucas cobaias infectadas com o BVDV-2 apresentaram títulos de anticorpos neutralizantes igual ou superior a 4, que é o menor título detectado na reação de VN para essa espécie.

Contra o BVDV-2, aos 15 dias após a infecção nenhuma cobaia apresentou anticorpos, portanto o título desses animais foi considerado menor que 4. Das cobaias infectadas com BVDV-2, cuja dose foi $0,625\text{mL} \times 10^{5,7} \text{ DICT}_{50}$, 23% (3/12) responderam ao vírus aos 30 dias após a infecção, com 28 de GMT; aos 60 dias, 30% (4/13) dos animais apresentaram anticorpos neutralizantes anti-BVDV-2, com 34 de GMT; e aos 90 dias, 15% (2/12) com 24 de GMT. No grupo infectado com 1,25mL de vírus, 33% (4/12) responderam imunogenicamente ao vírus aos 30 dias após a infecção, com 22 de GMT. Aos 60 dias, apenas um animal dos 12 (8%) apresentava anticorpos anti-BVDV-2, com 20 de GMT, e aos 90 dias, 25% (2/8), com 40 de GMT. No grupo infectado com 2,5mL de suspensão viral, somente 14% (1/7) apresentou anticorpos aos 30 dias, com 20 de GMT; aos 60 e 90 dias, 42% (3/7) foram reagentes, com GMT 28 e 22, respectivamente.

Os fatos apurados mostraram que as três doses usadas para infecção não diferiram estatisticamente na indução de anticorpos, sendo também os títulos de anticorpos estatisticamente semelhantes nos três períodos de colheita. Esses dados estão apresentados na tabela 5.

Tabela 5. Média geométrica dos títulos de anticorpos (GMT), dos grupos de cobaias, nos diferentes dias de colheita, após infecção experimental com diferentes doses de BVDV-2

Doses em mL	GMT (animais: reagentes/analizados)			
	15	30	60	90
$0,625 \text{ mL} \times 10^{5,7} \text{ DICT}_{50}$	$\leq 4^{aA^*}$ (0/13)	28^{aA} (3/13)	34^{aA} (4/13)	24^{aA} (2/13)
$1,25 \text{ mL} \times 10^{5,7} \text{ DICT}_{50}$	$\leq 4^{aA}$ (0/12)	22^{aA} (4/12)	20^{aA} (1/12)	20^{aA} (2/8)
$2,5 \text{ mL} \times 10^{5,7} \text{ DICT}_{50}$	$\leq 4^{aA}$ (0/10)	20^{aA} (1/7)	28^{aA} (3/7)	22^{aA} (3/7)

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si significativamente pelo teste de Tukey a um nível de 5% de probabilidade.

5.1.3 Comparação das cinéticas de respostas imunes

As comparações das respostas imunes das cobaias e dos bovinos infectados com o BoHV-1, o BVDV-1 e o BVDV-2, aos 15 e 30 dias, estão exibidas na figura 1. Nelas pode ser observado que, apesar de a GMT dos bovinos ser muito superior à das cobaias, a cinética teve comportamento semelhante, pois os títulos de anticorpos aumentaram tanto nos bovinos como nas cobaias, independentemente da quantidade de suspensão viral inoculada.

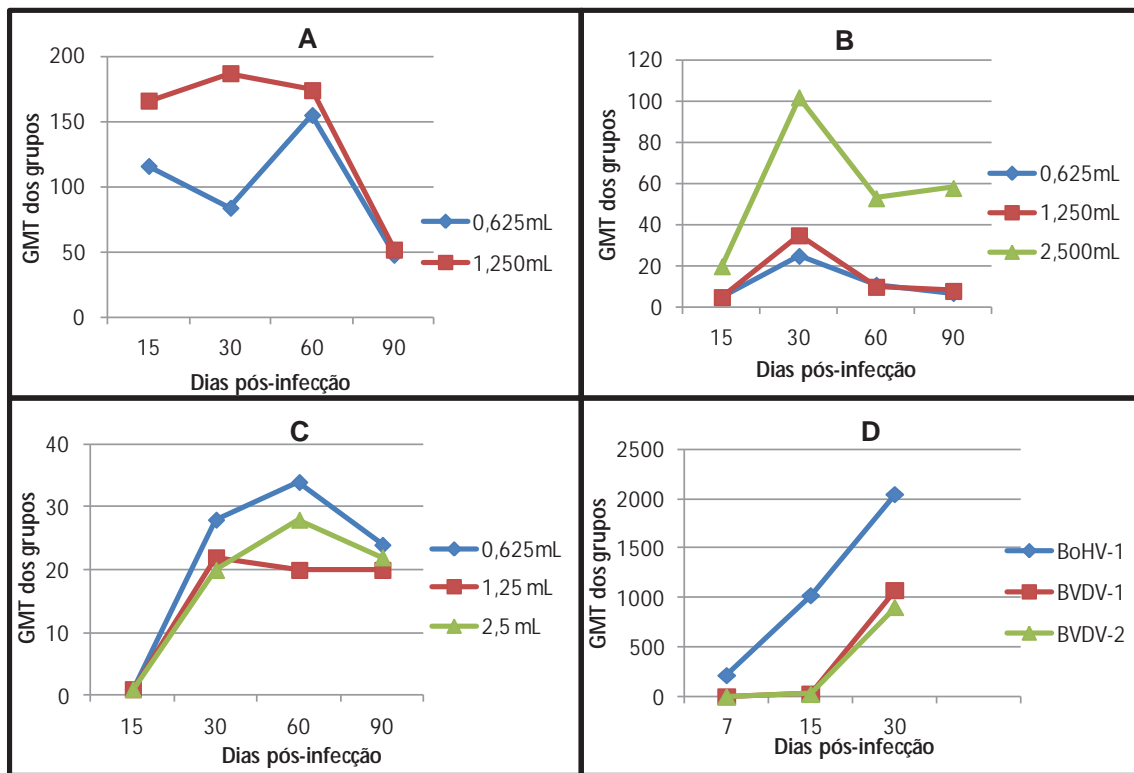


Figura 1. Comparação das médias geométricas dos títulos de anticorpos (GMT) anti-BoHV-1 (A), anti-BVDV-1 (B) e anti-BVDV-2 (C) para cada grupo de cobaias, inoculados com sua respectiva suspensão viral. Comparação das GMT anti-BoHV-1, anti-BVDV-1 e anti-BVDV-2 (D), para cada grupo de bovinos inoculados com sua respectiva suspensão viral.

5.2 Experimentos com seis vacinas comerciais disponíveis no mercado nacional

5.2.1 Vacinação de bovinos

A análise sorológica dos bovinos referente a primeira colheita mostrou que de todos os animais vacinados, apenas um deles, pertencente ao grupo V1Bo não respondeu imunologicamente ao BoHV-1. As GMT dos grupos foram próximas para os grupos V1Bo (7), V2Bo (5), V3Bo (4) e o V4Bo (4), sendo maior nos grupos V5Bo (16) e V6Bo (15). Os dados estão apresentados na tabela 6.

Tabela 6. Média geométrica dos títulos de anticorpos (GMT) obtidos na virusneutralização para o BoHV-1 na primeira (28 dias) e segunda colheitas (56 dias), induzidos pela vacinação e revacinação de grupos de bovinos com diferentes formulações disponíveis no mercado nacional

Vacinas (nº animais)	1ª Colheita		2ª Colheita	
	GMT _i *	GMT _i **	GMT _i	GMT _t
V1Bo (9)	<2, 2, 4(2), 8(4), 32	7	11, 16(2), 32(2), 45, 91(2), 128	37
V2Bo (17)	2(4), 4(8), 8(4), 16	4	4, 6, 8(2), 11, 16(4), 23(2), 32(3), 45, 64, 128	19
V3Bo (7)	3, 4(5), 8	4	8, 11, 23, 32, 45, 128, 181	35
V4Bo (7)	2(3), 4(3), 64	4	4, 6, 8(3), 11, 16	8
V5Bo (7)	8(3), 16(2), 32, 64	16	23, 32(2), 45, 64(2), 181	50
V6Bo (8)	4(2), 8(2), 16(2), 64, 128	15	23, 32(2), 45(4), 128	43
Controle (5)	<2(5)	0	<2(5)	0

*Títulos desenvolvidos pelos bovinos do grupo (número de reagentes com o mesmo título)

**GMT_i média geométrica dos títulos de anticorpos, por grupo

Na segunda colheita, houve um aumento considerável nas GMT em quase todos os grupos, exceto no grupo V4Bo, em que, apesar do efeito “booster”, a GMT (8) foi muito baixa. O grupo V2Bo apresentou GMT (19) intermediária, e os demais grupos tiveram GMT próximas: V1Bo (37), V3Bo (35), V5Bo (50) e V6Bo(43). (Tabela 6 e Figura 2). Em relação ao percentual da segunda colheita, 88,89% dos animais do grupo V1Bo apresentaram título de 16, mínimo para conferir proteção, assim como o V2Bo teve percentual de 70,58%, no grupo V3Bo foi de 71,43%, no grupo V4Bo foi de 11,11%, nos grupos V5Bo e V6Bo foi de 100%.

Na primeira colheita houve diferença estatística ($P < 0,05$) entre os grupos V2Bo e V5Bo, V4Bo e V5Bo, e V4Bo e V6Bo; na análise da segunda colheita mostrou diferença significativa ($P < 0,05$) do grupo V1Bo com o V4Bo; do grupo V4Bo com o grupo V5Bo, e do grupo V4Bo com o V6Bo. (Tabela 7).

Tabela 7. Análise estatística dos dados obtidos na virusneutralização para o BoHV-1 na primeira (28 dias) e segunda colheita (56 dias), com média dos títulos de anticorpos (GMT) induzidos pela vacinação e revacinação, seguida pelo desvio padrão para cada grupo de bovinos que recebeu uma formulação comercial disponível no mercado nacional

Dias	Grupos Vacinais					
	GMT \pm Desvio Padrão					
	V1Bo	V2Bo	V3Bo	V4Bo	V5Bo	V6Bo
28	9,0 \pm 8,2 ^{abA}	5,18 \pm 3,54 ^{acA}	4,23 \pm 1,62 ^{abA}	10,5 \pm 21,64 ^{abA}	21,71 \pm 20,51 ^{abA}	31,0 \pm 43,86 ^{bcA}
56	51,33 \pm 41,74 ^{abB}	28,24 \pm 30,01 ^{abB}	61,14 \pm 66,76 ^{abB}	8,38 \pm 3,7 ^{abB}	63,0 \pm 54,42 ^{abB}	49,38 \pm 32,86 ^{abA}

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si significativamente pelo teste de Kruskal-Wallis com comparação múltipla de Dunn, a um nível de 5% de probabilidade.

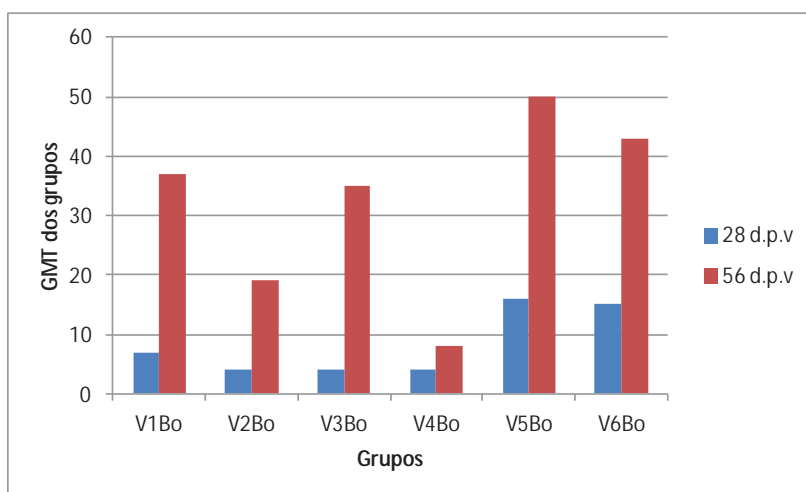


Figura 2. Comparação das médias geométricas dos títulos de anticorpos anti-BoHV-1, obtidos 28 e 56 dias após a imunização de cada grupo de bovinos com diferentes formulações de vacinas comerciais nacionais

Por outro lado, tanto o BVDV-1 quanto o BVDV-2 não induziram resposta vacinal nos animais durante a primeira colheita, sendo, portanto todos negativos na diluição inicial de 1:10, como preconizado no teste de VN pela OIE (2010). Lembrando que a

GMT foi feita com resultados dos animais positivos somente. Na segunda colheita, para ambos BVDV, novamente poucos animais responderam. Contra o BVDV-1, apenas um bovino do grupo V2Bo apresentou anticorpos, com 20 de GMT, um do V4Bo com 40 de GMT e oito do V5Bo, com 194 de GMT; os demais grupos não apresentaram anticorpos detectáveis na VN. O percentual de animais com titulação mínima de 10, que confere proteção, foi de 5,8% para o grupo V2Bo, 14,3% para o grupo V4Bo e 85,7% para o grupo V5Bo. (Tabela 8 e figura 3).

Contra o BVDV-2, na primeira colheita, de todos os animais vacinados apenas os grupos V3Bo e V4Bo apresentaram um animal reagente, com 10 e 40 de GMT, respectivamente; cinco do grupo V5Bo responderam com 46 de GMT. Na segunda colheita continuou não havendo animais com anticorpos detectáveis na reação de VN para os grupos V1Bo, V2Bo e V6Bo, porém o percentual de animais com título mínimo de 10 foi de 14,28% para os grupos V3Bo e V4Bo e 71,42% para o grupo V5Bo. Os dados referentes à segunda colheita estão apresentados na tabela 8 e figura 3.

Tabela 8. Média geométrica dos títulos de anticorpos (GMT) obtidos na virusneutralização para o BVDV-1 e o BVDV-2 na segunda colheita (56 dias), induzidos pela vacinação e revacinação de grupos de bovinos com diferentes formulações disponíveis no mercado nacional

Vacinas (Nº animais)	BVDV-1		BVDV-2	
	GMT _i *	GMT _t **	GMT _i	GMT _t
V1Bo (9)	<10(9)	0	<10(9)	0
V2Bo (17)	<10(16), 20	20	<10(17)	0
V3Bo (7)	<10(7)	0	<10(6), 10	10
V4Bo (7)	<10(6), 40	40	<10(6), 40	40
V5Bo (7)	<10, 28, 160(2), 256, 453, 640	194	<10(2), 20(2), 40, 57, 256	46
V6Bo (8)	<10(8)	0	<10(8)	0
Controle (5)	<10(5)	0	<10(5)	0

*Títulos desenvolvidos pelos bovinos do grupo (número de reagentes com o mesmo título)

** média geométrica dos títulos de anticorpos, por grupo

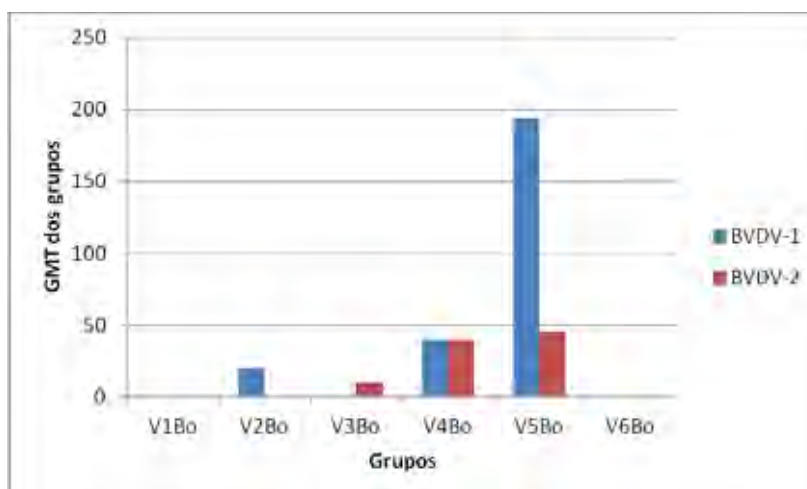


Figura 3. Comparação das médias geométricas dos títulos de anticorpos anti-BVDV-1 e BVDV-2, obtidos aos 56 dias após a imunização de cada grupo de bovinos com diferentes formulações de vacinas comerciais nacionais.

Os cinco animais do grupo controle permaneceram negativos durante o decorrer do experimento, para os três vírus estudados, inclusive foram amostrados três bezerros que nasceram no decorrer da pesquisa e todos também foram soronegativos até o final do experimento.

5.2.2 Vacinação de caprinos

Para organização dos grupos houve a necessidade da triagem de caprinos negativos para o BoHV-1, o BVDV-1 e o BVDV-2. Para tanto foram avaliados 337 animais provenientes de duas propriedades localizadas no sul do Estado de Minas Gerais e de três propriedades localizadas no nordeste do Estado de São Paulo. Das amostras testadas, 36 foram advindas de animais da propriedade situada no Município de Itamogi (P_1) e 228 de Monte Santo de Minas (P_2), ambas localizadas no Estado de Minas Gerais. Do Estado de São Paulo, foram 30 amostras de caprinos de uma propriedade do Município de Ipiguá (P_3), 19 de Paulo de Faria (P_4) e 24 de Poloni (P_5).

Os resultados dos testes de VN mostraram que todos os animais eram negativos tanto para o BVDV-1 quanto para o BVDV-2, porém em relação ao BoHV-1, 62% (209/337) foram positivos. A taxa de positividade nos animais oriundos do Estado de Minas Gerais foi de 57,2% (151/264), sendo que os animais da propriedade P₁ apresentaram 88,9% (32/36) de positividade, e os da propriedade P₂, 52,2% (119/228).

Nos animais do Estado de São Paulo, a taxa de positividade encontrada foi de 79,5% (58/73), sendo 86,7% (26/30) nos caprinos da propriedade P₃, 63,1% (12/19) da propriedade P₄ e 83,3% (20/24) da propriedade P₅. Como pode ser observado, os animais do Estado de São Paulo apresentaram a maior ocorrência.

As GMT somente dos animais positivos foram iguais, com valor 3 para as propriedades P₂, P₃, P₄ e P₅; e 4 para a P₁. Os dados encontram-se na tabela 9.

Tabela 9. Análise da reatividade do teste de virusneutralização para o BoHV-1 com a média geométrica dos títulos de anticorpos (GMT) em soro de caprinos, nas cinco propriedades analisadas nos Estados de Minas Gerais e São Paulo

Estado	Propriedades	Reagentes/total	% _a	GMT _i *	GMT _t *
Minas Gerais	P ₁	32/36	88,9	<2(4), 2(11), 4(10), 8(10), 16	4
	P ₂	119/228	52,2	<2(109), 2(67), 4(30), 6(3), 8(8), 11(3), 16(3), 23, 32(3), 64	3
Sub- total	P ₁ +P ₂	151/264	57,2		
São Paulo	P ₃	26/30	86,7	<2(4), 2(13), 4(9), 8(4)	3
	P ₄	12/19	63,1	<2(7), 2(7), 4(5)	3
	P ₅	20/24	83,3	<2(4), 2(11), 4(9)	3
Sub-total	P ₃ + P ₄ + P ₅	58/73	79,5	<2(15), 2(31), 4(23), 8(4)	3
Total		209/337	62		

^a Porcetagem dos animais positivos em relação ao total de animais analisados

* Média geométrica dos títulos dos anticorpos, individuais (i) (números de reagentes com mesmo título) e total (t)

Das cinco propriedades analisadas, apenas em uma (P₂), localizada no Município de Monte Santo de Minas, havia relatos de problemas reprodutivos com testes negativos para leptospirose, toxoplasmose e brucelose nos animais. Apesar de existir quantidade suficiente de animais negativos nessa propriedade para realizar o experimento em questão, os problemas reprodutivos eram críticos, principalmente relacionados a aborto e retorno de cio. Sendo assim, o produtor desanimou e resolveu

se desfazer da criação, fato que impossibilitou a realização do experimento naquele local.

Pela complexidade dos problemas relatados, a única alternativa viável foi implantar o experimento nas três propriedades localizadas no Estado de São Paulo (P₃, P₄, P₅), cujos animais apresentavam anticorpos para o BoHV-1 e eram soronegativos tanto para o BVDV-1 quanto para o BVDV-2. Para ter um parâmetro do título individual dos animais, foram realizadas duas colheitas de sangue com intervalo de 21 dias, antes da vacinação, sendo a última colheita concomitante com a primeira vacinação. Foi considerado como dia 0 do experimento o dia da primovacinação, sendo assim foram realizadas colheitas de sangue nos dias -21, 0, 28 e 56 e os animais submetidos a vacinação nos dias 0 e 28.

As GMT dos animais positivos para os grupos, contra o BoHV-1 foram V1Cp 3 e 3; V2Cp 4 e 3, V3Cp 3 e 2, V4Cp 4 e 3, V5Cp 4 e 3 e V6Cp 3 e 3, respectivamente para as colheitas dos dias -21 e 0 do experimento. Como resultado da VN referente a colheita do dia 28, contra o BoHV-1 foram detectados anticorpos em todos os caprinos, e as GMT dos animais positivos, dos grupos, foram próximas V1Cp (17), V2Cp (15), V3Cp (30), V5Cp (29) e V6Cp (13), exceto o V4Cp que apresentou maior valor (78). O percentual de animais que apresentaram titulação mínima de 16 na colheita do dia 28 foi de 77,8% para o V1Cp e o V2Cp, 100% para o V3Cp, V4Cp e V5Cp, e 54,5% para o V6Cp. Referente à colheita do dia 56, os animais apresentaram mesmo perfil de GMT, porém com valores maiores do que na colheita anterior. Os valores foram próximos entre os grupos V1Cp (97), V2Cp (101), V3Cp (94), V5Cp (100) e V6Cp (41), sendo maior no V4Cp (697) (Tabela 10).

O percentual dos animais que apresentaram titulação mínima de 16, na colheita do dia 56, foi de 88,5% para o V1Cp, 100% para o V2Cp, V3Cp, V4Cp, V5Cp e 81,8% para o V6Cp. Houve diferença estatística significativa pelo teste de Kruskal-Wallis com comparação múltipla de Dunn com 5% de probabilidade entre os grupos V1Cp e V4Cp, V2Cp e V4Cp, V4Cp e V6Cp. Os dados são apresentados na tabela 11 e figura 4.

Para o BVDV-1, nas colheitas dos dias -21 e 0, os animais não apresentaram anticorpos. Nos resultados da VN com as amostras da colheita do dia 28, apenas cinco

Tabela 10. Média geométrica dos títulos de anticorpos (GMT) obtidos na virusneutralização para o BoHV-1, nas colheitas realizadas nos dias -21, 0, 28, 56, induzidos pela vacinação e revacinação de grupos de caprinos com uma das formulações de vacinas disponíveis no mercado nacional

Grupos	1ª colheita		2ª colheita		3ª colheita		4ª Colheita	
	Títulos individuais	GMT	Títulos individuais*	GMT	Títulos individuais	GMT	Títulos individuais	GMT
V1Cp	<2, 2(5), 4(2), 8(2)	3	<2, 2(3), 4(5), 8	3	2, 8(2), 16(2), 23, 32(3), 64	17	11, 45, 64(3), 128, 181, 256(2), 362	97
V2Cp	2(3), 4(4), 8(2)	4	<2, 2(5), 4(2), 8	3	2, 8, 16(5), 32, 64	15	45(3), 64, 128(3), 256, 362	101
V3Cp	<2(2), 2(3), 4(3), 8	3	<2, 2(6), 4(2)	2	16(2), 23, 32(4), 45, 64	30	32, 45(4), 64, 128, 256(2)	74
V4Cp	<2(2), 2(3), 4(3), 16	4	<2(2), 2(4), 4(2), 8	3	16, 32, 64(2), 91, 128(3), 256	78	362, 512(3), 724, 1024(4)	697
V5Cp	<2(3), 2(2), 4(4), 8	4	<2(2), 2(5), 4(3)	3	16(3), 23, 32(4), 64(2)	29	45(2), 64, 91(2), 128(3) 181, 256,	100
V6Cp	<2, 2(4), 4(5), 8	3	<2(2), 2(6), 4(3)	3	2, 3, 8, 11(2), 16(3), 32(2), 64	13	4, 11, 16, 23, 32, 45, 64, 91(2), 181, 256	41
Controle	2(3), 4(6), 8	3	2(4), 4(5), 8	3	2(5), 4(5)	3	2(6), 4(3), 8	3

*Títulos desenvolvidos pelos caprinos do grupo (número de reagentes com o mesmo título)

Tabela 11. Análise estatística dos dados obtidos na virusneutralização para o BoHV-1 nas colheitas dos dias 28 e 56, com média dos títulos de anticorpos (GMT) induzidos pela vacinação e revacinação, seguida pelo desvio padrão de cada grupo de caprinos que recebeu uma das formulações comerciais disponíveis no mercado nacional

Colheitas	Grupos Vacinais					
	GMT ± Desvio Padrão *					
	V1Cp	V2Cp	V3Cp	V4Cp	V5Cp	V6Cp
3 ^a	23,3 ± 17,99 ^{aA}	20,1 ± 17,17 ^{aA}	32,44 ± 14,93 ^{abA}	100,8 ± 71,62 ^{bA}	32,7 ± 17,93 ^{abA}	19,18 ± 17,84 ^{aA}
4 ^a	138,9 ± 122,1 ^{aB}	133,4 ± 109,3 ^{aB}	101,8 ± 91,82 ^{aB}	746,4 ± 278,7 ^{bB}	115,7 ± 65,23 ^{aB}	74,0 ± 79,18 ^{aB}

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si significativamente pelo teste de Kruskal-Wallis com comparação múltipla de Dunn, com probabilidade de 5%.

animais responderam imunologicamente às vacinas, sendo um animal do grupo V2Cp (57), um do grupo V6Cp (10) e três do grupo V5Cp (45). Na colheita do dia 56, não houve animal reagente nos grupos V1Cp, V2Cp e V6Cp; apenas dois animais responderam no grupo V3Cp (14), outros dois responderam no grupo V4Cp (11) e seis no V5Cp (80) (Tabela 12). O percentual de animais que apresentaram titulação mínima de 16, aos 56 dias do experimento, foi de 66,7% para os grupos V3Cp e V4Cp, e 100% para o grupo V5Cp.

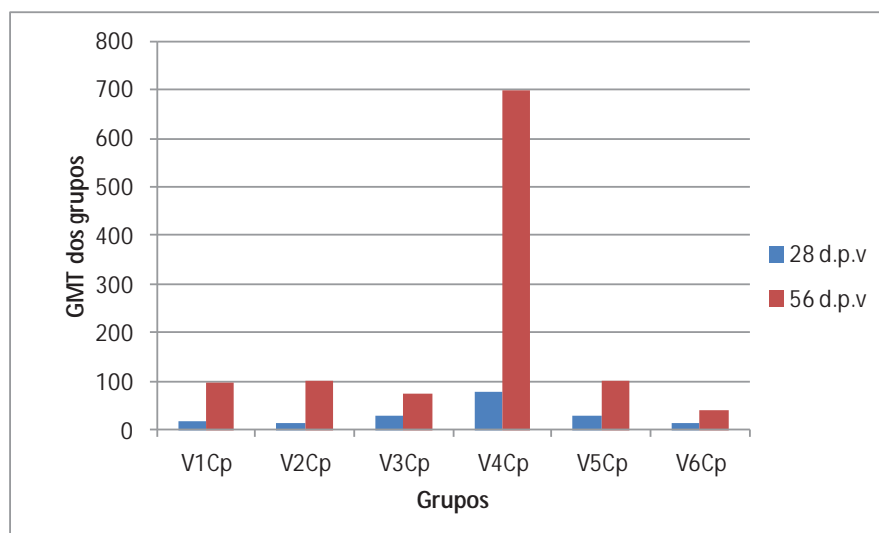


Figura 4. Comparação das médias geométricas dos títulos de anticorpos anti-BoHV-1, para cada grupo de caprinos inoculados com diferentes formulações de vacinas disponíveis no mercado nacional, nos diferentes dias de colheita.

Em relação ao BVDV-2, mais animais soroconverteram após a vacinação, e na colheita do dia 28 um caprino de cada grupo V1Cp, V3Cp e V6Cp foram reagentes, assim como cinco dos grupos V4Cp e V5Cp, e oito do grupo V6Cp, todavia nenhum animal foi responsivo no grupo V2Cp. As GMT dos grupos V1Cp, V3Cp, V4Cp, V5Cp e V6Cp foram iguais, com valor 10, sendo zero para o V2Cp. Na colheita do dia 56, cinco animais responderam à indução vacinal nos grupos V1Cp (10), V3Cp (13) e

Tabela 12. Média geométrica dos títulos de anticorpos (GMT) obtidos na virusneutralização para o BVDV-1, nas colheitas realizadas nos dias 28 e 56, induzidos pela vacinação e revacinação de grupos de caprinos com uma das formulações disponíveis no mercado nacional

Vacinas	Animais analisados	3ª colheita		4ª colheita	
		Títulos individuais*	GMT	Títulos individuais	GMT
V1Cp	10	<10(9)	0	<10(10)	0
V2Cp	9	<10(8), 57	57	<10(10)	0
V3Cp	9	<10(9)	0	<10(7), 10, 20	14
V4Cp	9	<10(9)	0	<10(3), 10(5), 20	11
V5Cp	10	<10(7), 20, 40, 113	45	20(2), 40(2), 80(2), 160(2), 320(2)	80
V6Cp	11	<10(10), 10	10	<10 (10)	0
Controle	10	<10(10)	0	<10(10)	0

*Títulos desenvolvidos pelos caprinos do grupo (número de reagentes com o mesmo título)

V4Cp (13), no V2Cp nenhum animal respondeu, no V5Cp (36) todos os animais foram responsivos e apenas dois animais responderam no V6Cp (14). Os dados estão apresentados na tabela 13. O percentual do grupo de animais com titulação mínima de 10, na quarta colheita, foi 50% para V1Cp, 0% para o V2Cp, 55,6% para o V3Cp e o V4Cp, 100% para o V5Cp e 18,2% para o V6Cp.

Tabela 13. Média geométrica dos títulos de anticorpos (GMT) obtidos na virusneutralização para o BVDV-2, nas colheitas realizadas nos dias 28 e 56, induzidos pela vacinação e revacinação de grupos de caprinos com seis vacinas disponíveis no mercado nacional

Vacinas	Animais analisados	3ª colheita		4ª colheita	
		Títulos individuais*	GMT	Títulos individuais	GMT
V1Cp	10	<10(9), 10	10	<10(5), 10(5)	10
V2Cp	9	<10(10)	0	<10(9)	0
V3Cp	9	<10(8), 10	10	<10(4), 10(3), 20(2)	13
V4Cp	9	<10(4), 10(5)	10	<10(4), 10(3), 20(2)	13
V5Cp	10	<10(5), 10(5)	10	10(2), 20, 40(4), 50, 80, 160	36
V6Cp	11	<10(10), 10	10	<10(9), 10, 20	14
Controle	10	<10(10)	0	<10(10)	0

*Títulos desenvolvidos pelos caprinos do grupo (número de reagentes com o mesmo título)

Os animais do grupo controle permaneceram negativos contra o BVDV-1 e o BVDV-2 durante todo o experimento.

5.2.3 Vacinação de cobaias

Primeira etapa:

Nesta primeira etapa, foi utilizada apenas uma vacina, buscando encontrar a dose que melhor induzisse resposta imune nessa espécie animal. Dos 60 animais vacinados, apenas três pertencentes ao grupo G2 não responderam à vacinação com o BoHV-1 na primeira colheita, e um animal do grupo G4 já não apresentava mais anticorpos na segunda colheita. No entanto, muitos animais morreram no decorrer do experimento. Alguns sucumbiram durante ou logo após a colheita de sangue, porém outros morreram com o passar do tempo. Há suspeitas de que a vacina pode ter causado certa fragilidade a esses animais, pois quanto maior a dosagem administrada, maior o número de animais mortos. Outro fato constatado foi que dos animais do grupo controle somente um morreu durante a colheita do sangue, tendo os outros permanecido vivos até o final do experimento.

Na primeira e segunda colheitas, para cada grupo as GMT foram 11 e 18 para o G1; 10 e 25 para o G2; 25 e 36 para o G3; 30 e 29 para o G4; 30 e 13 para o G5; e 52 e 45 para o G6. Como pode ser observado, as GMT entre os grupos G1 e G2, e entre G3, G4 e G5, da primeira colheita, têm valores muito próximos entre si, tendo o G6 como destaque pelo maior GMT induzido pela vacinação. Na segunda colheita, o número de animais por grupo estava muito reduzido, porém foi possível observar que o G6 foi o grupo que também obteve maior GMT. No G7, grupo controle, os animais permaneceram não reagentes durante todo o experimento. Os dados estão apresentados na tabela 14 e na figura 5.

Para o BVDV-1, na primeira colheita, das 58 cobaias apenas 18 apresentaram anticorpos detectáveis na VN. As GMT dos animais positivos foram baixas em todos os grupos, com valor 3 para os grupos G1, G2, G3, G4 e G6, e 4 para G5. Na segunda colheita, também 18 animais responderam, sendo os valores de 4, 3, 6, 11, 11 e 21 das GMT para os grupos de G1 a G6, respectivamente. O grupo G6 foi o que apresentou maior GMT. Os dados estão apresentados na tabela 15 e figura 4.

Tabela 14. Média geométrica dos títulos de anticorpos (GMT) obtidos na virusneutralização para o BoHV-1, nas colheitas realizadas nos dias 28 e 56, induzidos pela vacinação e revacinação de grupos de cobaias com frações de uma vacina disponível no mercado nacional

Grupo (volume)	1ª colheita			2ª colheita		
	Reagentes	Títulos individuais*	GMT	Reagentes	Títulos individuais	GMT
G1 (0,320 mL)	10/10	6(2), 8(2), 11(3), 16(2), 32	11	8/8	<4, 8, 16(2), 23(2), 32, 128	24
G2 (0,640 mL)	7/10	<4(3), 4(2), 8, 16(2), 23(2)	9	3/3	16(2), 64	25
G3 (1,6 mL)	8/8	8, 16(2), 23, 32(3), 91	25	6/6	8, 16(2), 64, 91, 181	36
G4 (2,0 mL)	10/10	8, 23(3), 32(3), 45, 64(2)	30	3/4	<4, 23, 32(2)	29
G5 (2,5 mL)	10/10	8, 11, 32(6), 64, 91	30	3/3	8, 11, 23	13
G6 (3,2 mL)	10/10	11, 23, 32(3), 64(3), 128, 512	52	4/4	4, 32, 64, 512	45
Controle	0/5	<4(5)	0	0/4	<4(5)	0

*Títulos desenvolvidos pelas cobaias do grupo (número de reagentes com o mesmo título)

Tabela 15. Média geométrica dos títulos de anticorpos (GMT) obtidos na virusneutralização para o BVDV-1, nas colheitas realizadas nos dias 28 e 56, induzidos pela vacinação e revacinação de grupos de cobaias com frações de uma vacina disponível no mercado nacional

Grupo (volume)	1ª colheita			2ª colheita		
	Reagentes	Títulos individuais	GMT	Reagentes	Títulos individuais	GMT
G1 (0,32 mL)	3/10	<4(7), 4 (3)	4	3/8	<4(5), 4(2), 11	6
G2 (0,64 mL)	2/10	<4(8), 4(2)	4	3/3	4(3)	4
G3 (1,6 mL)	3/8	<4(5), 4(3)	4	5/6	<4, 4(3), 6, 16	6
G4 (2,0 mL)	3/10	<4(7), 4(3)	4	¼	<4(3), 11	11
G5 (2,5 mL)	3/10	<4(7), 4(3)	4	2/3	<4, 4, 32	11
G6 (3,2 mL)	4/10	<4(6), 4(4)	4	4/4	11, 23(2), 32	21
Controle	0/5	<4(5)	0	0/4	<4	0

*Títulos desenvolvidos pelas cobaias do grupo (número de reagentes com o mesmo título)

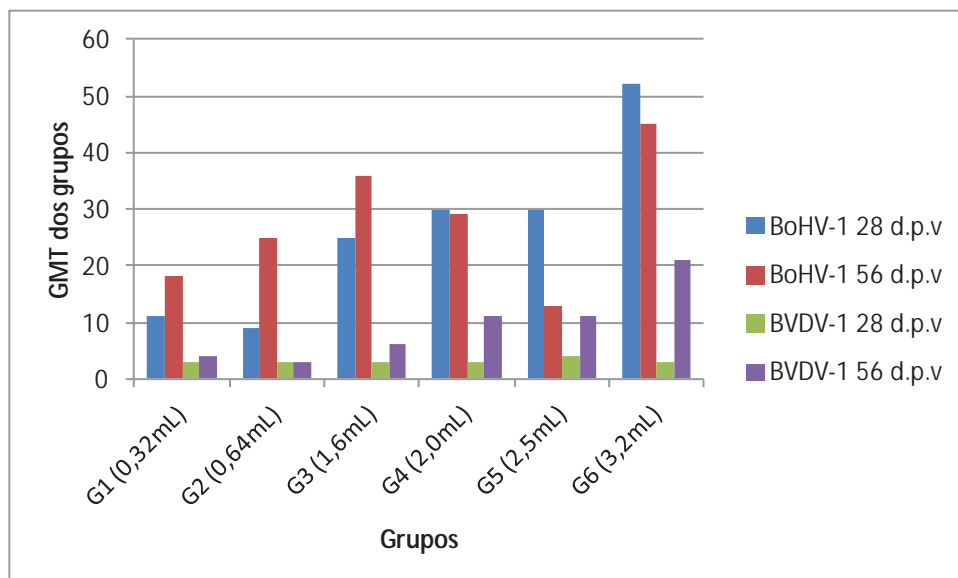


Figura 5. Comparação da média geométrica dos títulos de anticorpos anti-BoHV-1 e anti-BVDV-1, para os grupos de cobaias inoculados com diferentes doses de uma vacina comercial nacional, 28 e 56 dias após a imunização

Em relação ao BVDV-2, dos animais vacinados, tanto na primeira quanto na segunda colheita, nenhum deles apresentou anticorpos detectáveis na reação de VN.

Segunda Etapa

Na primeira etapa não foi possível aplicar um método estatístico, pois muitos animais foram a óbito. Como os animais do grupo seis apresentaram uma maior GMT contra o BoHV-1 e o BVDV-1, tanto na primeira quanto na segunda colheita, ficou estabelecida a dosagem de vacina desse grupo (3,2mL) para a realização da segunda etapa do experimento.

Como na primeira etapa morreram muitos animais, na segunda fase foram utilizadas oito cobaias a mais, ou seja, 78. Para o V1Co, V3Co e V6Co foram utilizados 11 animais por grupo, V2Co com 13, V4Co com 14, e V5Co com 12 animais; cinco cobaias permaneceram no grupo controle, não sendo vacinadas. Os

animais receberam a dose de 3,2mL de uma das seis vacinas disponíveis no mercado nacional, conforme o grupo. As cobaias do V1Co e V6Co não resistiram à vacinação, e todos os animais desses grupos morreram.

No caso do BoHV-1, todos os animais vacinados com as outras quatro vacinas (V2Co, V3Co, V4Co e V5Co) responderam imunologicamente nas duas colheitas. As GMT na primeira colheita, entre V2Co (77) e V3Co (70), não diferiram muito entre si, assim como entre os grupos V4Co (124) e V5Co (117), sendo a GMT dessas duas últimas maiores que as primeiras. Na segunda colheita, as GMT também foram próximas para os grupos V2Co (176) e V3Co (175), porém os animais do grupo V4Co (353) apresentaram títulos superiores aos do V5Co (223). Os animais do grupo controle não foram vacinados e permaneceram negativos durante todo experimento. Os dados estão apresentados na tabela 16 e na figura 6.

Pode-se observar que na primeira colheita não houve diferença estatística significativa ($P < 0,05$). Todavia, na segunda colheita essa diferença ocorreu entre V3Co e V4Co (Tabela 17).

Tabela 16. Média geométrica dos títulos de anticorpos (GMT) obtidos na virusneutralização para o BoHV-1, nas colheitas realizadas nos dias 28 e 56, induzidos pela vacinação e revacinação de grupos de cobaias com uma das vacinas disponíveis no mercado nacional

Vacinas	1ª colheita			2ª colheita		
	Reagentes	Títulos individuais*	GMT	Reagentes	Títulos individuais	GMT
V2Co	13/13	16(2), 32, 45, 64, 91(3), 128(2), 181, 256(2)	77	12/12	45, 64(2), 128, 181, 256(5), 362, 512	176
V3Co	11/11	32(2), 45(3), 64(2), 128(3), 256	70	11/11	91(3), 128(3), 181, 256, 363(2), 512	176
V4Co	14/14	32, 45, 64, 91(2), 128(6), 181, 256(2)	110	13/13	181(2), 256(4), 362(2), 512(4), 1024	352
V5Co	12/12	23, 32(2), 128(3), 181(2), 256(4)	118	10/10	128(2), 181(4), 256(2), 512(2)	223
Controle	0/5	<4(5)	0	0/4	<4(4)	0

*Títulos desenvolvidos pelas cobaias do grupo (número de reagentes com o mesmo título)

Tabela 17. Análise estatística dos dados obtidos na virusneutralização para o BoHV-1 nas duas colheitas realizadas no experimento, com média dos títulos de anticorpos (GMT) induzidos pela vacinação e revacinação, seguida pelo desvio padrão para cada grupo de cobaias que recebeu vacina comercial disponível no mercado nacional

Colheitas	Grupos Vacinais			
	GMT* \pm Desvio padrão			
	V2Co	V3Co	V4Co	V5Co
1 ^a	107,7 \pm 81,14 ^{aA}	87,91 \pm 67,82 ^{aA}	127,4 \pm 67,09 ^{aA}	154,8 \pm 91,46 ^{aA}
2 ^a	219,7 \pm 135,2 ^{abB}	211,8 \pm 142,5 ^{abB}	398,6 \pm 227,5 ^{bbB}	251,6 \pm 143,8 ^{abA}

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si significativamente pelo teste de Kruskal-Wallis com comparação múltipla de Dunn, com probabilidade de 5%.

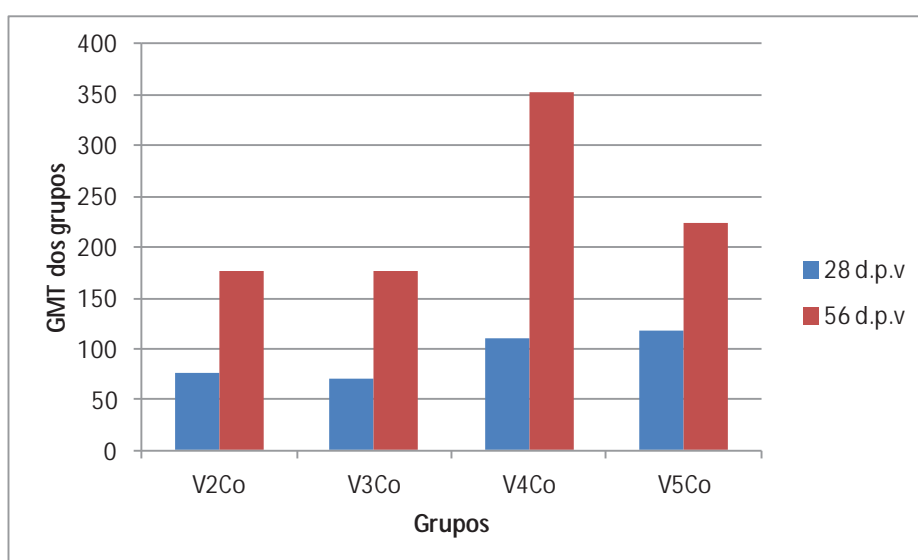


Figura 6. Comparação das médias geométricas dos títulos de anticorpos anti-BoHV-1, para cada grupo de cobaias, inoculados com diferentes formulações de vacinas comerciais disponíveis no mercado nacional, 28 e 56 dias após a imunização

Poucos animais responderam imunologicamente ao BVDV-1. Os grupos V2Co e V3Co não induziram anticorpos detectáveis nas cobaias, em nenhuma das duas colheitas. Apenas um animal do grupo V4Co e dois do V5Co foram reagentes ao teste de VN, com 10 e 14 de GMT, respectivamente, na primeira colheita. Na segunda colheita, a resposta continuou baixa, e somente dois animais do V4Co e cinco do V5Co responderam à vacinação, com 17 e 33 de GMT respectivamente

(Tabela 18). O percentual de animais que responderam à vacinação, nessa colheita, foi de 18,2% para o grupo V4Co e 50% para o grupo V5Co.

Tabela 18. Média geométrica dos títulos de anticorpos (GMT) obtidos na virusneutralização para o BVDV-1, nas colheitas realizadas nos dias 28 e 56 do experimento induzidos pela vacinação e revacinação de grupos de cobaias com uma das formulações disponíveis no mercado nacional

Vacinas	1ª colheita			2ª colheita		
	Reagentes	Títulos individuais*	GMT	reagentes	Títulos individuais	GMT
V2Co	0/13	<4	<4	0/12	<4	<2
V3Co	0/11	<4	<4	0/11	<4	<2
V4Co	1/14	10	10	2/13	<4(11), 14, 20	17
V5Co	2/12	10, 20	14	4/10	<4(5), 14, 57, 20(2), 113	33
Controle	0/5	<4(5)	0	0/5	<4(5)	0

*Títulos desenvolvidos pelas cobaias do grupo (número de reagentes com o mesmo título)

Em relação ao BVDV-2 não foram encontrados anticorpos com título mínimo de 4, na reação de VN com soro das cobaias, nas duas colheitas realizadas, para todas as vacinas testadas neste experimento.

6. DISCUSSÃO

Comparando as respostas dos bovinos e das cobaias inoculadas com as maiores doses dos vírus estudados, observa-se uma similaridade na resposta imune dos animais, porém as cobaias responderam com títulos bem inferiores aos dos bovinos. Em bovinos, das estirpes virais inoculadas, a maior taxa de anticorpos observada foi depois de transcorridos 30 dias do experimento. Isso também foi observado nas cobaias inoculadas com a maior dose de suspensão viral, exceto para o grupo que recebeu o BVDV-2, em que houve maior produção de anticorpos aos 60 dias do experimento. A estirpe do BoHV-1 foi a que induziu as maiores taxas de anticorpos, seguida pela estirpe do BVDV-1, e a que menos induziu produção de anticorpos foi a estirpe do BVDV-2, em ambas as espécies.

Como não foram encontrados trabalhos relatando infecção experimental em cobaias, os dados obtidos com a presente infecção experimental foram comparados à literatura relacionada com vacinação. Os dois grupos de cobaias infectadas com BoHV-1 apresentaram títulos bem superiores aos determinados por SILVA et al (2007a), quando vacinaram cobaias no dia 0 do experimento, fazendo reforço aos 28 dias e colhendo amostras sanguíneas no dia 56 do experimento. As cobaias foram separadas em grupos e receberam diversas frações da dose da vacina inativada recomendada para bovinos. Todos os grupos vacinados apresentaram títulos menores que dois até 40, aos 28 dias da revacinação, quando comparados as GMT anti-BoHV-1 no dia 60 da presente pesquisa, que foi 155, para a menor dose de vírus inoculada ($0,625\text{mL} \times 10^{6,5} \text{ DICT}_{50}$). O grupo que recebeu a dose de 1,6mL da vacina inativada no trabalho de SILVA et al (2007a) apresentou GMT 40, sendo 128 o maior título individual. Na pesquisa em apreço, a menor dose inoculada de suspensão viral induziu anticorpos com 116 de GMT aos 15 dias pós-infecção, e de 155 aos 60 dias.

Comparando as GMT anti-BVDV-1 das cobaias da presente pesquisa de infecção experimental com as vacinadas por SILVA et al. (2007a), observa-se que os animais que receberam a dose de 1,6mL da vacina inativada apresentaram GMT 9 sendo 64 o maior título individual. Na presente pesquisa, a menor dose de vírus utilizada ($0,625\text{mL} \times 10^{5,8} \text{ DICT}_{50}$) para a infecção induziu GMT 25, aos 60 dias pós-infecção, e 113 como o maior título individual de anticorpos. Com a dose de $2,5\text{mL} \times 10^{5,8} \text{ DICT}_{50}$ um animal apresentou GMT 1280.

Todavia, os bovinos responderam com títulos bem superiores aos das cobaias, pois aos 30 dias pós-infecção apresentaram 2048 de GMT. No trabalho realizado por HENZEL et al. (2008) com inoculação da estirpe SV-56/90 do BoHV-1.2 no trato genital de bezerras, o maior título individual obtido foi 32, depois de 28 dias. Após tratamento com dexametasona, o maior título obtido foi 128, ambos os valores bem inferiores ao encontrado na presente pesquisa.

LIMA et al. (2005) compararam a resposta de bovinos imunizados com vacinas atenuadas de BVDV-1 e BVDV-2, com a de três formulações comerciais produzidas com vírus inativados. Os animais inoculados com vacinas contendo vírus

atenuado, mesmo sem receber reforço vacinal apresentaram resposta humoral superior àquela de animais vacinados com vírus inativado. Em relação ao BVDV-1, os pesquisadores encontraram 1612 de GMT, valor muito próximo aos 1076 de GMT encontrado na presente pesquisa com a infecção experimental; para o BVDV-2 houve uma grande diferença, sendo de 905 a GMT detectada na infecção experimental e 151 em animais imunizados com vacina atenuada.

Trabalho realizado por ARENHART et al. (2008) utilizando duas doses de vacina atenuada com o BVDV-1 e o BVDV-2 encontrou os maiores títulos de anticorpos aos 78 dias da primovacinação. Para o BVDV-1 os títulos ficaram entre 640 e 5120, e para o BVDV-2 entre 20 e 1280, valores maiores do que o obtido na presente infecção experimental. Este fato é explicado pela concentração de vírus utilizada na fabricação dessa vacina poder ser maior do que a dose viral utilizada na suspensão viral inoculada na infecção experimental.

BRUM et al. (2002) inocularam quatro bezerros com idade entre seis e oito meses de idade com 10mL de suspensão viral de BVDV-2 na concentração de 10^7 DICT₅₀, sendo metade da dose aplicada por via intranasal e a outra metade por via intravenosa. Nesse caso, os resultados obtidos foram concordantes com o presente experimento, pois nenhum bovino soroconverteu aos sete dias após a infecção, porém se tornaram reagentes na VN aos 15 dias pós-infecção. Na pesquisa citada anteriormente, os títulos variaram de 16 a 32, valores próximos à média geométrica de 23 que os bovinos infectados com BVDV-2, no presente experimento, apresentaram aos 15 dias pós-infecção.

Ao comparar os resultados da presente pesquisa com dados descritos na literatura pode-se observar que as vacinas atenuadas promovem uma elevada produção de anticorpos, assim como na infecção experimental verificada na presente pesquisa, todavia as vacinas inativadas estimulam a produção de menores títulos de anticorpos do que as vacinas atenuadas ou a infecção experimental.

O CFR (2011) estabelece tanto para o BVDV quanto para o BoHV-1, que dos animais vacinados, 80% dos animais devem apresentar titulação mínima 8 para serem considerados protegidos contra essa enfermidade. Pesquisas realizadas por

POSPIL et al. (1996), mostraram que títulos neutralizantes maiores ou iguais a 16 têm sido apontados como os mínimos necessários para proteger os animais frente a uma exposição ao BoHV-1 (POSPISIL et al., 1996).

Estendendo essas informações para a presente pesquisa, as vacinas disponíveis no mercado utilizadas nos grupos V1Bo, que induziram em 88,89% dos animais títulos maiores ou iguais a 16, e nos grupos V5Bo e V6Bo, mesmo perfil sorológico em 100% dos bovinos, têm capacidade de proteger os animais frente à infecção; contudo, as demais vacinas não se enquadraram nessa situação, sendo, portanto, ineficientes.

Trabalho realizado por SILVA et al. (2007b), utilizando uma vacina nacional e cinco vacinas produzidas em outros países, todas inativadas, mostrou que para o BoHV-1, o título máximo obtido nos bovinos pela vacina nacional foi 32 e nas duas vacinas estrangeiras foi 256. Na presente pesquisa, as vacinas nacionais induziram título individual máximo de 181 nos exames de VN com os grupos V3Bo e V5Bo.

A imunização de caprinos com as vacinas comerciais também induziu anticorpos contra o BoHV-1. Na primeira colheita, o percentual de animais com titulação maior ou igual a 16 foi máximo nas vacinas utilizadas nos grupos V3Cp, V4Cp e V5Cp. Com a dose reforço, todas as vacinas atingiram pelo menos os 80% de animais com titulação mínima 16, que seria a menor titulação que confere proteção em bovinos contra essa enfermidade, exceto o grupo V6Cp, que teve percentual de 72,7%. Isso é um indicativo que as vacinas contendo BoHV-1 inativado são capazes de estimular o sistema imune dos caprinos. Apesar de serem reagentes no início do experimento pôde-se observar um aumento considerável no título de anticorpos. Além disso, a titulação dos soros obtidos após o reforço vacinal mostrou que os caprinos tiveram resposta imune maior que os bovinos.

A primeira etapa da vacinação em cobaias mostrou que conforme aumenta a fração de vacina aplicada no animal aumenta também o título de anticorpos induzidos para o BoHV-1. Logo na primeira colheita, ou seja, 28 dias após a primeira vacinação, foi obtido 52 de GMT no exame de VN do grupo de animais que recebeu a fração de 3,2 mL de uma vacina inativada. O trabalho de SILVA et al. (2007a)

relata GMT de 6,56, 7,46 e 40,31 para as doses de 0,32 mL, 0,64 mL e 1,6 mL de uma formulação experimental inativada, 28 dias após a revacinação. Para as mesmas doses e dia de colheita do sangue, as GMT obtidas na presente pesquisa foram 18, 25 e 36. Essa resposta diferente pode ser devida à quantidade de vírus contida nas formulações vacinais ou até o tipo de adjuvante utilizado em cada vacina, entre outros fatores.

Na segunda etapa do experimento de vacinação de cobaias, no qual foram testadas seis vacinas disponíveis no mercado nacional, observou-se que a dose de 3,2mL induziu anticorpos para o BoHV-1 com títulos maiores do que àqueles detectados nos bovinos. Os animais do V1Co e V6Co não resistiram a vacinação e todos os animais desse grupo morreram. A diferença dessas duas vacinas em relação às demais é a presença de 4,8mg/mL de selenato de sódio em suas formulações. Portanto, foi possível supor que o selênio nessa quantidade resultou na morte, das cobaias, por intoxicação. Assim, todas as vacinas induziram anticorpos com titulação mínima de 16 em 100% das cobaias em todos os grupos.

Levando em consideração o regulamento do CFR (2011) para fabricação de vacinas contra o BoHV-1 juntamente com os trabalhos realizados por POSPIL et al. (1996), pode ser considerado satisfatória a vacina que induzir em 80% dos animais título de anticorpos maior ou igual a 16. Então, para os bovinos do presente experimento, apenas as vacinas V1, V5 e V6 seriam satisfatórias; no entanto, para os caprinos, as seis vacinas testadas seriam aprovadas e para cobaias a V2, a V3, a V4 e a V5 estariam dentro desse critério, ressaltando que não foi possível testar a V1 e a V6 em cobaias devido à alta concentração de selênio na formulação vacinal.

Analisando as vacinas, para o BoHV-1, nas três espécies houve diferença estatística significativa ($P < 0,05$) pelo teste de comparação de Mann-Whitney entre os períodos de colheita para a mesma vacina, ou seja, os resultados obtidos para cada vacina na primeira e segunda colheita mostram o efeito “booster” positivo do reforço vacinal. Essa diferença somente não apareceu nos grupos V6Bo e V5Co.

Com relação a vacinação dos bovinos, para o BVDV-1, apenas a V5 com GMT 194 seria efetiva. O maior título individual obtido para esse vírus foi 640. As demais

vacinas apresentaram percentual bem abaixo do considerado satisfatório. SILVA et al. (2007a), utilizando uma vacina experimental inativada para o BVDV-1 obtiveram 38 de GMT, com 128 de titulação máxima individual e com 80% de animais com 10 de título mínimo. No trabalho realizado por FULTON et al. (1995), duas vacinas inativadas induziram 161 e 32 de GMT, também para o BVDV-1. Na pesquisa de LIMA et al. (2005), avaliando três vacinas inativadas com a estirpe do BVDV-1, obtiveram 14,3, 25,1 e 40 de GMT aos 60 dias do experimento, para cada vacina, ressaltando que os animais foram revacinados depois de 30 dias.

Quando analisada a indução da produção de anticorpos contra o BVDV-2, nos bovinos, nenhuma vacina atingiu as especificações do CFR (2011). A vacina utilizada no V5Bo apresentou melhores resultados, mas mesmo assim não pode ser considerada satisfatória, pois o percentual de animais com títulos maiores que 8 foi de 71,4%.

Para os caprinos, apenas a V5 seria satisfatória para o BVDV-1 e o BVDV-2, uma vez que o percentual de animais com titulação mínima de 8 estava acima dos 80%. Comparando aos bovinos, a vacina para o BVDV-2 foi mais eficiente nos caprinos, pois nos bovinos nenhuma delas se enquadrava nas especificações do CFR (2011).

Em cobaias, as vacinas para o BVDV-1 não induziram boa resposta imune. Na primeira etapa, a maior GMT (21) foi obtida com a maior dose (3,2mL). No trabalho de SILVA et al (2007a), a maior GMT foi obtida com a dose de 1,6mL, e a dose de 0,64mL gerou GMT 8, valor muito próximo à GMT obtida com o dobro dessa dose.

Na segunda etapa, a maior GMT obtida foi do grupo V5Co (33), sendo o maior título individual encontrado de 1024 no grupo V4Co. No trabalho de JORDÃO et al (2011) dez cobaias imunizadas com vacina comercial contendo a estirpe NADL, na dosagem de 3,0 mL, responderam com GMT de 11, e o título individual máximo foi de 32. Portanto, as GMT encontradas em ambas as pesquisas, apresentaram valores próximos, porém na presente pesquisa, o título de anticorpos individual detectado foi superior.

As vacinas para o BVDV-2 não induziram a produção de anticorpos nas cobaias, assim como não foram detectados anticorpos na infecção experimental. Outro fato é que as vacinas compostas de antígenos inativados do BVDV-2 também não apresentaram bom estímulo da resposta imune, tanto nos bovinos quanto nos caprinos. Todavia, em bovinos três vacinas (V3Bo, V4Bo e V5Bo) induziram a produção de anticorpos, porém com percentual do grupo inferior aos 80%, ou seja, valor classificado como insatisfatório pelo CFR (2011). Para os caprinos, cinco vacinas induziram produção de anticorpos, porém somente o grupo V5Cp atingiu e até ultrapassou o percentual, alcançando 100% dos animais título maior ou igual a 8.

Nesta pesquisa ficou notável que as vacinas comercializadas no mercado nacional precisam ser melhoradas, pois a maioria não está dentro de parâmetro aceitável que estabeleça proteção ao animal, há a necessidade de incluir os dois genótipos do BVDV nas formulações vacinais e utilizar estirpes isoladas no Brasil, pois apesar dos anticorpos conferirem proteção contra a espécie heteróloga, a proteção é mais eficiente para a espécie homóloga.

Trabalho realizado por PARREÑO et al. (2010) demonstrou que tanto em bovinos quanto em cobaias, a concentração viral é um fator muito importante na composição de uma vacina. Segundo esses autores, vacinas com concentração maior que 10^6 induzem a produção de anticorpos em níveis satisfatórios contra o BoHV-1, tanto em bovinos quanto em cobaias; no entanto, a concentração menor ou igual a 10^5 não foi capaz de induzir a produção de anticorpos nas referidas espécies.

2.6 CONCLUSÕES

- As infecções experimentais dos animais com o BoHV-1 e o BVDV-1 mostraram que os bovinos responderam com elevados títulos de anticorpos, que foram superiores aos títulos induzidos nas cobaias, porém com evoluções similares na cinética; diferente do BVDV-2 que não determinou o mesmo padrão de resposta imune.

- Por meio da infecção experimental realizada em bovinos com as estirpes do BVDV-1 e do BVDV-2 foi possível constatar reação cruzada no teste de VN pela detecção de anticorpos contra o genótipo heterólogo.
- As vacinações realizadas em bovinos promoveram efeito “*booster*” depois do reforço vacinal que induziu títulos de anticorpos compatíveis com proteção.
- O teste com as vacinas nos bovinos mostrou que a V5 foi a mais eficiente, pois induziu resposta imune com maiores títulos, tanto para o BoHV-1 quanto para o BVDV-1 e o BVDV-2.
- Das seis vacinas comerciais testadas na indução da imunidade em bovinos, todas foram satisfatórias para o BoHV-1, uma contra o BVDV-1 e nenhuma contra o BVDV-2.
- Modelo experimental com caprinos foi eficaz para avaliar vacinas contra o BoHV-1, o BVDV-1 e o BVDV-2.
- A viabilidade de modelo experimental com cobaias serviu para avaliar vacinas contra o BoHV-1 e o BVDV-1, mas não para o BVDV-2.

REFERÊNCIAS

ACKERMANN, M.; BELAK, S.; BITSCH, V.; EDWARDS, S.; MOUSSA, A.; ROCKBORN, G.; THIRY, E. Round table on infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis virus infection diagnosis and control. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 23, n. 1-4, p. 361-363, 1990a.

ACKERMANN, M.; ENGELS, M. Pro and contra IBR-eradication. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.113, p.293-302, 2006.

ACKERMANN, M.; MULLER, H. K.; BRUCHNER, L.; KIHLM, U. Eradication of infectious bovine rhinotracheitis in Switzerland: review and prospects. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 23, n. 1-4, p. 365-370, 1990b.

ACKERMANN, M.; MULLER, H. K.; BRUCHNER, L.; RIGGENBACH, C.; KIHLM, U. The control of infectious bovine rhinotracheitis (IBR) in Switzerland from 1978 to 1988. **Schweizer Archiv fur Tierheilkunde** Bern, v.131, p. 397-407, 1989.

ALEXANDRINO, B.; DIAS, F.C.; OLIVEIRA, M.C.; AFFONSO, I.B.; PEREIRA, G.T.; SAMARA, S.I. Herpesvírus bovino associado à diarreia viral bovina e à leucose enzoótica bovina. **ARS Veterinária**, Jaboticabal, v.27, n.3, p.168 -174, 2011.

ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F.; MÉDICI, K. C. Conseqüências da infecção pelo herpesvirus bovino tipo 1 sobre o sistema reprodutivo de bovinos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 19, n. 1, p. 86-93, 1998.

ALICE, F.J. Isolamento do vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) no Brasil. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v.38, n.4, p. 919-920, 1978.

ARCHAMBAULT, D.; BÉLIVEAU, C.; COUTURE, Y.; CARMAN, S. Clinical response and immunomodulation following experimental challenge of calves with type 2 noncytotoxic bovine viral diarrhea virus. **Veterinary Research**, Les Ulis, v.31, 215-227, 2000.

ARENHART, S.; SILVA, L.F.; HENZEL, A.; FERREIRA, R.; WEIBLEN, R.; FLORES, E.F. Proteção fetal contra o vírus da diarreia viral bovina (BVDV) em vacas prenhes previamente imunizadas com uma vacina experimental atenuada. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.35, n.1, p. 230-234, 2005.

BABIUK, L. A.; VAN DRUNEN LITTEL – VAN DEN HURK, S. K.; TIKOO, S. K. Immunology of bovine herpesvirus 1 infection. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 53, n. 1-2, p. 31-42, 1996.

BAKER, J. C. The clinical manifestations of Bovine Viral Diarrhea infection. **The Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 11, n. 3, p. 425-445, 1995.

BARBOSA, A. C. V. C.; BRITO, W. M. E. D.; ALFAIA, B. T. Soroprevalência e fatores de risco para a infecção pelo herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1) no Estado de Goiás, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 6, p. 1368-1373, 2005.

BARR, B. C.; ANDERSON, M. L. Infectious diseases causing bovine abortion and fetal loss. **The Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 9, n. 2, p. 343-368, 1993.

BATISTA, H. B. C. R. et al. Herpesvírus bovino (BoHV-1.1 e BoHV-1.2b) em forma infecciosa em encéfalos de bovinos submetidos ao diagnóstico de raiva no estado do Rio Grande do Sul. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 62, n. 5, p. 1023-1028, 2010.

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**, Amsterdam, v.47, n.3, p.159-169, 2000.

BIELEFELDT-OHMANN, H. The pathologies of Bovine Viral Diarrhea Vírus infection – a window on the pathogenesis. **The Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 11, n. 3, p. 447-475, 1995.

BOELAERT, F.; SPEYBROEC, N.; KRUIFK, A.; AERTS, M.; BURZYKOWSKY, T.; MOLENBERGHS, G.; BERKVENS, D. L. Risk factors for bovine herpesvirus-1 seropositivity. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 69, p. 285-295, 2005.

BOLIN, S. R. Control of bovine viral diarrhea infection by use of vaccination. **The Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 11, n. 3, p. 615-625, 1995.

BOLIN, S. R.; RIDPATH, J. F. The clinical significance of genetic variation among bovine viral diarrhea viruses. **Veterinary Medicine**, Lenexa, v. 91, n. 10, p. 958-961, 1996.

BOSCH, J. C.; KAASHOEK, M. J.; KROESE, A. H., VAN OIRSCHOT, J. T. An attenuated bovine herpesvirus-1 marker vaccine induces better protection than two inactivated marker vaccines. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 52, n. 3-4, p. 223-234, 1996.

BOSCH, J.C.; KAASHOEK, M.J.; VAN OIRSCHOT, J.T. Inactivated bovine herpesvirus marker vaccines are more efficacious in reducing virus excretion after reactivation than a live marker vaccine. **Vaccine**, Kidlington, v.15, p. 1512-1517, 1997.

BOSCH, J.C.; DE JONG, M.C.M.; FRANKEN, P.; FRANKENA, K.; HAGE, J.J.; KAASHOEK, M.J.; MARIS-VELDIHUIS, M.A.; NOORDHUIZEN, J.P.T.M.; VAN DER POEL, W.H.M.; VERHOEFF, J.; WEERBMEESTER, K.; ZIMMER, G.M.; VAN OIRSCHOT, J.T. An inactivated gD-subunit vaccine reduce the incidence of bovine herpesvirus 1 infections in the field. **Vaccine**, Kidlington, v.16, p.265-271, 1998.

BÖTTCHER, J.; GOTTSCHALK, E.; GREISER-WILKE, I.; MOENNIG, V.; BOMMELI, W.; LIESS, B. Diagnosis of bovine virus diarrhoea by two enzyme-linked immunosorbent assays. **Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties**, Paris, v. 12, n. 2, p. 461-469, 1993.

BOURNE, N.; BRAVO, F.J.; FRANCOTTE, M.; BERNSTEIN, D.I.; MYERS, M.G.; SLAOUI, M.; STANBERRY, L.R. Herpes simplex virus (HSV) type 2 glycoprotein D subunit vaccines and protection against genital HSV-1 or HSV-2 disease in guinea pigs. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v.187, p.542-549, 2003.

BROCK, K. V. The many faces of bovine viral diarrhoea virus. **The Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 20, n. 1, p. 1-3, 2004.

BROWNLIE, J. The pathogenesis of bovine viral diarrhoea virus infections. **Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties**, Paris, v. 9, p. 43-59, 1990.

BRUM, M. C. S.; SCHERER, C. F. C.; FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; BARROS, C. S. L.; LANGOHR, I. M. Enfermidade gastroentérica e respiratória em bezerros inoculados com amostras brasileiras do vírus da Diarreia Viral Bovina tipo 2 (BVDV-2). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 5, Santa Maria, 2002.

CAMPOS, M.; OHMANN, H.B.; HUTCHINGS, D., RAPIN, N., BABIUK, L.A.; LAWMAN, M.J. Role of interferon-gamma in inducing cytotoxicity of peripheral blood mononuclear leukocytes to bovine herpesvirus type 1 (BHV-1)- infected cells. **Cellular Immunology**, New York, v.120, p.259-269, 1989.

CAMPOS, M.; ROSSI, C.R. Cytotoxicity of bovine lymphocytes after treatment with lymphokines. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago v.47, p.1524-1528, 1986.

CHASE, C. C. L.; CHASE, S. K.; FAWCETT, L. Trends in the BVDV serological response in the Upper Midwest. **Biologicals**, London, v. 31, n. 2, p. 145-151, 2003.

CHILDS, T.X.; BAKER, J.A.; McENTEE, K.A. A cytopathogenic strain of virus diarrhoea virus. **Cornell Veterinarian**, Ithaca v.50, p.73-79, 1946.

CFR. Code federal regulation. Animal and Plant Health Inspection Service, USDA. Publicado em 1990. Disponível em: <http://frwebgate.access.gpo.gov/cgi-bin/multidb.cgi>. Acesso em 15 de novembro de 2011.

COLLET, M. S.; LARSON, R.; BELZER, S. K.; RETZEL, E. Proteins encoded by bovine viral diarrhoea virus: the genomic organization of a pestivirus. **Virology**, New York, v. 165, n. 1, p. 200-208, 1988.

COLLINS, J.K.; AYERS, V.K.; CARMAN, J. Evaluation of an antigen-capture ELISA for the detection of bovine herpesvirus type 1 shedding from feedlot cattle. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam,, v. 16, p. 101-7, 1988.

DA COSTA, X.J.; BOURNE, N.; STANBERRY, L.R., KNIPE, D.M. 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**, New York, v.232, n.1, p.1-12, 1997.

DARBYSHIRE, J.H.; DAWSON, P.S.; PATERSON, A.B.; LOOSMORE, R.M. The isolation of infectious bovine rhinotracheitis virus in the United Kingdom: a preliminary report. **Veterinary Record**, London, v.74, p.156–157, 1962.

D'ARCE, R. C. F.; ALMEIDA, R. S.; SILVA, T. C.; FRANCO, A. C.; SPILKI, F.; ROEHE, P. M.; ARNS, C. W. Restriction endonuclease and monoclonal antibody analysis of Brazilian isolates of bovine herpesviruses types 1 and 5. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 88, p. 315-324, 2002.

DEL FAVA, C. Rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR/IPV). **Boletim do Leite**, n. 25, 1996.

DEL FAVA, C. Índices reprodutivos e características de desempenho em bovinos de corte infectados e não infectados pelo Herpesvírus Bovino Tipo 1. **2001. 127 f. Tese (Doutorado em Clínica Médica Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.**

DEL FAVA, C.; ARCARO, J. R. P.; POZZI, C. R.; ARCARO JÚNIOR, I.; FAGUNDES, H.; PITUCO, E. M.; STEFANO, E.; OKUDA, L. H.; VASCONCELLOS, S. A. Manejo sanitário para o controle de doenças da reprodução em um sistema leiteiro de produção semi-intensivo. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 70, n. 1, p. 25-33, 2003.

DEL FAVA, C.; PITUCO, E. M.; D'ANGELINO, J. L. Herpesvírus bovino tipo 1 (HVB-1): revisão e situação atual no Brasil. **Revista Educacional Continuada- CRMV- SP/ Continuous Education Journal CRMV-SP**, São Paulo, v. 5, n. 3, p. 300-312, 2002.

DENG, R.; BROCK, K. V. 5' and 3' untranslated regions of pestivirus genome: primary and secondary structure analyses. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 21, n. 8, p.1949-1957, 1993.

DEREGT, D. Introduction and history. In: GOYAL, S. M.; RIDPATH, J. F. **Bovine viral diarrhea virus**. Iowa: Blackwell Publishing, 2005. cap. 1, p. 3-33.

DIAS, F.C.; ALEXANDRINO, B.; MEDEIROS, A.S.R. ; PEREIRA, G.T.; OLIVEIRA, M.C.; SAMARA, S.I. Comparação dos testes de virusneutralização contra os genótipos 1 e 2 do vírus da diarreia viral bovina (BVDV-1 e BVDV-2) em bovinos de rebanhos naturalmente infectados. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, p. 913-920, 2010a.

DIAS, F. C. ; MEDICI, K. C. ; ALEXANDRINO, B. ; MEDEIROS, A. S. R. ; ALFIERI, A. A. ; SAMARA, S. I. Ocorrência de animais persistentemente infectados pelo vírus da diarreia viral bovina em rebanhos bovinos nos Estados de Minas Gerais e São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 30, p. 933-939, 2010b.

DIAS, F. C. ; SAMARA, S.I. Aspectos relevantes da infecção pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV). **O Biológico**, São Paulo, v. 72, p. 1-9, 2010.

DONATE, J.; MAZZUCHELLI, F. Actualización en diarrea vírica bovina. **Medicina Veterinária**, Barcelona, v. 12, n. 9, p. 486-500, 1995.

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

DONKERSGOED J. V.; BABUIK, L. A. Diagnosing and managing the respiratory form of infectious bovine rhinotracheitis. **Veterinary Medicine**, Chicago, v. 86, n. 1-4, p. 86-94, 1991.

DUBOVI, E. J. Bovine viral diarrhoea virus. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE HERPESVIRUS BOVINO E VIRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA, 1998, Santa Maria. **Anais...**, Santa Maria, p. 1-19.

DUBOVI, E. J. Vaccination programs for first calf heifers using combination of killed and modified live vaccines. In: **Bovine viral diarrhoea virus in the Americas Symposium**, 2004, Davis, CA. **Proceedings...** Davis : University of California, 2004. p. 84.

DUBOVI, E. J. Genetic diversity and BVD virus. **Comparative Immunology Microbiology Infectious Disease**, Oxford, v. 15, n. 3, p. 155-162, 1992

EDWARDS, S.; WHITE, H.; NIXON, P. A study of the predominant genotypes of bovid herpesvirus 1 found in the U.K. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 22, n. 1, p. 213-223, 1990.

ELLIS, J. A.; MARTIN, K.; NORMAN, G. R.; HAINES, D. M. Comparison of detection methods for bovine viral diarrhoea virus in bovine abortions and neonatal death. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 7, n. 4, p. 433-436, 1995.

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

FENNER F. **Veterinary virology**. 1st ed. Londres: Academic Press, 1987.

FENNER, F. J.; GIBBS, E. P. J.; MURPHY, F. A. Herpesviridae. In: _____. **Veterinary virology**. 2 ed. New York: Academic Press, p. 335-368, 1993.

FENNER, F. J.; McAUSLAN, B. R.; MIMS, C. A.; SAMBROOK, J.; WHITE, D. O. Herpesviridae. In: _____. **The biology of animal viruses**. 2.ed. New York: academic Press, p. 41-146, 1974.

FIGUEIREDO, H. C. P.; VIEIRA, P. R.; LAGE, A. P.; LEITE, R. C. Prevalência de anticorpos contra o vírus da diarreia bovina a vírus em Minas Gerais - Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 21, n. 4, p. 11-15, 1997.

FLORES, E.F. **Virologia veterinária**. Santa Maria,: UFSM, 888p, 2007. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.25, n.3, p.125-134, 2005.

FLORES, E. F. Problemas reprodutivos em bovinos causados pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 21, n. 3, p. 57-61, 1997.

FLORES, E.F.; GIL, L.H.G.V.; BOTTON, S.A.; WEIBLEN, R.; RIDPATH, J.F.; KREUTZ, L.C.; PILATI, C.; DRIEMEYER, D.; MOOJEN, V.; WENDELSTEIN, A.C. Clinical, pathological and antigenic aspects of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) type 2 isolates identified in Brazil. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam,, v.77, n.1-2, p.175- 183, 2000.

FLORES, E. F.; RIDPATH, J. F.; WEIBLEN, R.; VOGEL, F. S. F.; GIL, L. H. V. G. Phylogenetic analysis of Brazilian bovine viral diarrhoea virus type 2 (BVDV-2) isolates: Evidence for a subgenotype within BVDV-2. **Virus Research**, Amsterdam, v. 87, p. 51-60, 2002.

FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; VOGEL, F.S.F.; ROEHE, P.M.; ALFIERI, A.A.; PITUCO, E.M. A infecção pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV) no Brasil – histórico, situação atual e perspectivas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.25, n. 3., p.125-134, 2005.

FRANCO AC.; ROEHE PM. **Herpesviridae**. FLORES EF. Eds. **Virologia Veterinária**. Editora ufsm, , 436-88, 2007.

FRAY, M. D.; PATON, D. J.; ALENIUS, S. The effects of bovine viral diarrhoea virus on cattle reproduction in relation to disease control. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 60, n. 61, p. 615-627, 2000.

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**, Kidlington, v.19. n.2-3, p.264-274, 2001.

FULTON, R.W.; CONFER, A.W.; BURGE, L.J.; PERINO, L.J.; D'OFFAY, J.M.; PAYTON, M.E.; MOCK, R.E. Antibody responses by cattle after vaccination with commercial viral vaccines containing bovine herpesvirus-1, bovine viral diarrhoea virus, and bovine respiratory syncytial virus immunogens and subsequent revaccination at day 140. **Vaccine**, Kidlington, v.13, n.8, p725-733, 1995.

FULTON, R. W; SALIKI, J.T.; BURGE, L.J.; d'OFFAY, J.M.; BOLIN, S.R.; MAES, R.K.; BAKER, J.C.; FREY, M.L. Neutralizing antibodies to type 1 and 2 bovine viral diarrhoea viruses: detection by inhibition of viral cytopathology and infectivity by immunoperoxidase assay. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v.4, n.3, p.380-383, 1997.

GALVÃO, C.; DORIA, J. D.; ALICE, F. J. Anticorpos neutralizantes para o vírus da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina em bovinos do Brasil. **Instituto Biológico da Bahia**, Salvador, v. 1, n. 6, p. 15-25, 1963.

GASTRUCCI, G., FRIGERI, F.; SALVATORI, D.; FERRARI, M.; SARDONINI, Q.; CASSAI, E.; Lo DICO, M.; ROTOLA, A.; ANGELINI, R. Vaccination of calves against bovine herpesvirus-1: assessment of the protective value of eight vaccines. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, Oxford, v.25, p. 29-41, 2002.

GIBBS, E.P.; RWEYEMAMU, M.M. Bovine herpesviruses. Part II. Bovine herpesviruses 2 and 3. **Vet Bull**, v.47, p.411- 425, 1977.

GILLESPIE J. H.; BAKER J. A.; McENTEE K. A. A cytopathogenic strain of bovine viral diarrhoea virus. **Cornell Veterinarian**, Ithaca, v. 5, p. 73-79, 1960.

GLEW, E.J.; CARR, B.V.; BRACKENBURY, L.S.; HOPE, J.C.; CHARLESTON, B.; HOWARD, C.J. Differential effects of bovine viral diarrhoea virus on monocytes and dendritic cells. **Journal of General Virology**, London, v.84, n.3, p.1771-1780, 2003. doi: 10.1099/vir.0.18964-0.

GOYAL, S. M.; RIDPATH, J. F. **Bovine viral diarrhoea virus**. Iowa: Blackwell Publishing, 2005.

GRÜNDER H.D.; REULEAUX I.R.; LIESS B. Feststellung der virusbedingten Rhinotracheitis infectiosa des Rindes. I. Herkunft und Isolierung des Virus. **Deutsche Tierärztliche Wochenschrift**, Hannover, v. 67, p. 514-519, 1960.

GUNN, H.M. Role of fomites and files in the transmission of bovine viral diarrhea virus. **Veterinary Record**, London, v.132, p.584-585, 1993.

HENZEL, A.; DIEL, D.G.; ARENHART, S.; VOGEL, F.S.F.; WEIBLEN, R. FLORES, E.F. Aspectos virológicos e clínico-patológicos da infecção genital aguda e latente pelo herpesvírus bovino tipo 1.2 em bezerras infectadas experimentalmente. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.28, n.3, p.140-148, 2008.

HOLLAND, R. E.; BEZEK, D. M.; SPRECHER, D. J.; PATTERSON, J. S.; STEFICEK, B.A.; TRAPP, A. L. Investigation of an epizootic of bovine viral diarrhea virus infection in calves. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 202, n. 11, p. 1.849-1.854, 1993.

HOSHINO, Y.; DALAI, S.K.; WANG, K.; PESNICAK, L.; LAU, T.Y.; KNIPE, D.M.; COHEN, J.I.; STRAUS, S.E. 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**, Washington, v.79, n.1, p.410-418, 2005.

HOUE, H. Economic impact of BVDV infections in dairies. **Biologicals**, London, v.31, n.2, p. 137-143, 2003.

HOUE, H. Epidemiology of Bovine Viral Diarrhea virus. **The Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 11, n. 3, p. 521-547, 1995.

HOUE, H., PEDERSEN, K. M.; MEYLING, A. The effect of Bovine viral diarrhea virus infection and conception rate. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 15, n. 2, p. 117- 123, 1993.

HOWARD, C.J.; CLARKE, M.C.; SOPP, P.; BROWNLIE, J. Immunity to bovine virus diarrhea virus in calves: the role of different T-cell subpopulations analysed by specific depletion in vivo with monoclonal antibodies. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v.32, n3-4, p. 303-314, 1992.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2004 Rebanho bovino brasileiro ultrapassa 200 milhões e se mantém como o maior do mundo. Disponível em:

http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=499&id_pagina=1. Acesso em 23 de março de 2008.

JONES, L. et al. Comparison of neutralizing antibodies to type 1a, 1b and 2 bovine viral diarrhoea virus from experimentally infected and vaccinated cattle. **Bovine Practitioner**, Stillwater, v.35, n.2, p.137-140, 2001.

JORDÃO, R. S. **Resposta sorológica de cobaias imunizadas com vacinas inativadas, oleosa e aquosa, contendo isolado brasileiro do vírus da diarréia viral bovina (BVDV) em comparação com vacina comercial.** 2006. 62f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

JORDÃO, R.S.; RIBEIRO, C.P.; PITUCO, E.M.; OKUDA, L.H.; DEL FAVA, C.; STEFANO, E.; MARCHIORI FILHO, M., MEHNERT, D.U. Serological response of guinea pigs to oily and aqueous inactivated vaccines containing a Brazilian isolate of bovine viral diarrhoea virus (BVDV). **Research in Veterinary Science**, London, v.91, n.2, p. 311-315, 2011.

KAHRS RF. Infectious bovine rhinotracheitis: A review and update. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 171, n.10, p.1055-64, 1977.

KAHRS, R. F.; SMITH, R. S. Infectious bovine rhinotracheitis, infectious pustular vulvovaginitis, and abortion in a New York Dairy. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 146, p. 217-220, 1965.

KELLING, C. L. Evolution of bovine viral diarrhoea virus vaccines. **The Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 20, n. 1, p. 115-129, 2004.

KENDRICK, J. W.; GILLESPIE, J. H.; McENTEE, K. Infectious pustular vulvovaginitis of cattle. **Cornell Veterinarian**, Ithaca, v. 48, n. 4, p. 458-495, 1958.

KIM, I.J.; HYUN, B.H.; SHIN, J.H.; LEE, K.K.; LEE, K.W.; CHO, K.O.; KANG, M.I. Identification of bovine viral diarrhoea virus type 2 in Korean native goat (*Capra hircus*). **Virus Research**, Amsterdam, v.121, n.1, p.103-106, 2006.

KNIAZEFF, A.J.; RIMER, V.; GAETA, L. Globulin in foetal bovine sera: significance in virology. **Nature**, London, v.214, p. 805-806, 1967.

KRAHL, M.; BRAGA, A. C.; OLIVEIRA, L. G.; NETO, J. A. S. P.; PRADO, J. A. P.; ROSA, J. C. A.; WUNDER JÚNIOR, E. Pesquisa de anticorpos para leptospirose, rinotraqueíte infecciosa bovina e diarréia viral bovina em soros bovinos de propriedades rurais do Rio Grande do Sul. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA**, 25., 1997, Gramado. *Anais...* Gramado: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 1997. p. 174.

KRAMPS, J. A.; MAANEN, C. V.; WETERING, G. V.; STIENSTRA, G.; QUAK, S.; BRINKHOF, J.; RONSHOLT, L.; NYLIN, B. A simple, rapid and reliable enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) specific antibodies in cattle serum, plasma and bulk milk. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 64, p. 135-144, 1999.

LAMBOT, M., HANON, E.; LECOMTE, C.; HAMERS, C.; LETESSON, J.J.; PASTORET, P.P. Bovine viral diarrhoea virus induces apoptosis in blood mononuclear cells by a mechanism largely dependent on monocytes. **Journal of General Virology**, London, v.75, n.7, p.1745-1749, 1998.

LAMONTAGNE, L.; LAFORTUNE, P.; FOURNEL, M. Modulation of the cellular immune responses to T-cell-independent antigens in lambs with induced bovine viral diarrhoea virus infection. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 50, p. 1604-1608, 1989.

LARSON, B. L. Diagnosing the cause of bovine abortions and other perinatal deaths. **Veterinary Medicine**, Lenexa, v. 91, n. 4-6, p. 478-486, 1996.

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

LIEBLER-TENORIO, E. M. Pathogenesis. In: GOYAL, S. M.; RIDPATH, J. F. **Bovine viral diarrhoea virus**. Iowa: Blackwell Publishing, 2005. cap. 7, p. 121-143.

LIMA, M.; FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; VOGEL, F.S.F.; ARENHART, S. Caracterização de amostras atenuadas do vírus da diarreia viral bovina (BVDV) tipos 1 e 2 para o uso em vacinas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.24, n.1, p. 35-42, 2004.

LIMA, M.; VOGEL, F. S. F.; FLORES, E. F.; WEIBLEN, R. Anticorpos neutralizantes contra o vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV): comparação entre um imunógeno experimental atenuado e três vacinas comerciais inativadas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 1, p. 230-234, 2005.

LINDBERG, A.; ALENIUS, S. Principles for eradication of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections in cattle populations. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.64, n. 1, p.197-222, 1999.

LOVATO, L. T.; WEIBLEM, R.; TOBIAS, F. L.; MORAES, M. P. Herpesvírus bovino tipo 1 (HVB-1): inquérito soro-epidemiológico no rebanho leiteiro do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 25, n. 3, p. 425-430, 1995.

LUBINSKI, J.M.; WANG, L, SOULIKA, A.M.; BURGER, R.; WETSEL, R.A.; KOLTEN H., COHEN, G.H., EISENBERG, R.J., LAMBRIS, J.D.; FRIEDMAN, H.M. Herpes simplex virus type 1 glycoprotein gC mediates immune evasion in vivo. **Journal of Virology**, Washington, v. 72, n.10, p.8253–8257, 1998.

MAINAR-JAIME, R. C.; BERZAL-HERRANZ, B.; ARIAS, P.; ROJO-VÁZQUEZ, F. A. Epidemiological pattern and risk factors associated with bovine viral-diarrhoea virus (BVDV) infection in a non-vaccinated dairy-cattle population from the Asturias region of Spain. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 52, p. 63-73, 2001.

MADIN, S. H.; YORK, C. J.; McKERCHER, D. G. Isolation of the infectious bovine rhinotracheitis virus. **Science**, Washington, v.124, p.721-722, 1956.

MARÉ, C.G.; VAN RENSBURG, S.J. The isolation of viruses associated with infertility in cattle: a preliminary report. **Journal of the South African Veterinary Medical Association**, Pretoria, v. 32, p. 201–210, 1961.

MARSI, S. A.; OLSON, W.; NGUYEN, P. T.; PRINS, S.; DEREGT, D. Rapid detection of bovine herpesvirus 1 in semen of infected bulls by a nested polymerase chain reaction. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, v. 60, n. 2, p. 100-107, 1996.

McVEY, D.S.; GALVIN, J.E.; OLSON, S.C. A review of the effectiveness of vaccine potency control testing. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v.33, n,5-6, p. 505-516, 2003.

MEYER G., LEMAIRE M., LYAKU J., PASTORET PP., THIRY E. Stablishmentof a rabbit model for bovine herpesvirus type 5 neurological acute infection. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.51, p. 27-40, 1996.

MILLER, J.M. The effects of IBR virus infection on reproductive function of cattle. Symposium on IBR virus. **Veterinary Medicine**, Lenexa, v.86, n.1, p.95-98, 1991.

MILLER, N.J. Infectious necrotic rhinotracheitis of cattle. **Journal of The American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 126, n. 939, p. 463-467, 1955.

MILLER, J. M.; VAN DER MATTEN, M. J. Effect of primary and recurrent infectious bovine rhinotracheitis vírus infection on the bovine ovary. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 46, n. 7, p. 1434-1437, 1985.

MOLNÁR, E.; CAMELO, A. S. A.; SILVA, E. B.; MOLNÁR, L. Prevalência da infecção pelo vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) em bubalinos e bovinos no estado do Pará, Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 25, n. 2, 2001.

MOREIRA, S. P. G. **Avaliação do desenvolvimento ponderal de bezerros em plantéis leiteiros infectados pelo herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1)**. 2004, 89f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

MUELLER, S.B.K.; IKUNO, A.A.; CAMPOS, M.T.G.R.; RIBEIRO, L.O.C. Isolamento e identificação do vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina de um rim de feto de bovino (IBR/IPV). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.45, n.3, p.187-190,1978.

MURPHY, F. A.; GIBBS, E. P.; HORZINEK, M. C.; STUDDERT, M. J. **Veterinary Virology**. São Diego: London Academic Press, 1999.

MUYLKENS, B.; THIRY, J.; KIRTEN, P.; SCHYNTS, F.; THIRY, E. Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. **Veterinary Research**, Les Ulis, v. 38, p. 181-209, 2007.

NANDI, S.; KUMAR, M.; MANOHAR, M.; CHAUHAN, R.S. Bovine herpes virus infection in cattle. **Animal Health Research Reviews**, Cambridge, v. 10, n. 1, p. 85-98, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org>>. DOI:10.1017/S1466252309990028.

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

OLAFSON; MacCALLUM, A.D.; FOX, F.H. An apparently new transmissible disease of cattle. **Cornell Veterinary**, Ithaca, v. 36, p. 205-213, 1946.

OIE. Organização Mundial de Saúde Animal. **Manual of standards for diagnostic tests and vaccines**, Paris. Disponível em: <http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_0013_2.htm>. Acesso em: 28 jun. 2009.

PANDEY, R. **Microbiologia veterinária: perspectivas clínicas e moleculares**. São Paulo: Rosa, p. 18-19, 1994

PARREÑO, V.; LÓPEZ, M.V.; RODRIGUEZ, D.; VENA, M.M.; IZUEL, M.; FILIPPI, J.; ROMERA, A.; FAVERIN, C.; BELLINZONI, R.; FERNANDEZ, F.; MARANGUNICH, L. Development and statistical validation of a guinea pig model for vaccine potency testing against bovine rhinotracheitis (IBR) virus. **Vaccine**, Kidlington, v.28, p.2539-2549, 2010.

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

PELLEGRIN, C.; VAN DER HURK, J.; LECOMTE, J.; TUSSEN, P. Identification of a new group of bovine viral diarrhoea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. **Virology**, New York, v. 203, p. 260-268, 1994.

PETERS, A. R.; THEVASAGAVAM, S. J.; WISEMAN, A.; SALT, J. S. 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**, Amsterdam, v. 66, n. 1-4, p. 63-77, 2004.

PETRINI, S.; RAMADORI, G.; CORRADI, A.; BORGHETTI, P.; LOMBARDI, G.; VILLA, R.; BOATTARELLI, E.; GUERCIO, A.; AMICI, A.; FERRARI, M. Evaluation of safety and efficacy of DNA vaccines against bovine herpesvirus -1 (BoHV-1) in calves. **Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases**, Oxford, v.34, n.1, p. 3-10, 2011.

PITUCO, E. M.; DEL FAVA, C. Situação do BVDV na América do Sul. In: **SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE HERPESVÍRUS BOVINO E VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA**, 1998, Santa Maria. *Anais ...* p. 49-57.

POSPISIL, Z.; KERJCI, J.; JINEK, P.; LÁNY, P.; ZENDULKOVÁ, D.; CÍHAL, P. Development of a disease control program based on the use of an inactivated vaccine against infectious bovine rhinotracheitis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.38, n.4, p.199-206, 1996.

POTGIETER, L. N. D. Bovine respiratory tract disease caused by bovine viral diarrhoea virus. **The Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 13, n. 3, p. 471-481, 1997.

POTGIETER, L. N. D. Immunology of bovine viral diarrhoea virus. **The Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 11, n. 3, p. 501-520, 1995.

PRITCHARD, W.R. The bovine viral diarrhoea-mucosal disease complex. **Adv. Vet. Sci. Comp. Med.**, v.41, p.1-47, 1963.

QUINN, P.J.; MARKER, B.K.; CARTER, M.E.; DONNELLY, W.J.; LEONARD, F.C. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005. p. 309-312.

RAVAZZOLO, A. P.; DAL PIZZOL, M.; MOOJEN, V. Evidência da presença de anticorpos para o vírus da rinotraqueíte infecciosa dos bovinos em alguns municípios do Estado do Rio Grande do Sul. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, Porto Alegre, v. 17, p. 89-95, 1989.

REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating 50 per cent end point. **American Journal of Hygiene**, Baltimore, v. 27, p. 493-497, 1938.

REVELL, S. G.; CHASEY, D.; DREW, T. W.; EDWARDS, S. Some observations on the semen of bulls persistently infected with bovine viral diarrhoea virus, **Veterinary Record**, London, v.123, n. 5, p.122-125, 1988.

RICHEY, E. **IBR in beef cattle** (Infectious bovine rhinotracheitis/red nose). VM-55. University of Florida, Institute of Food And Agricultural Sciences, 1994.

RIDPATH, J. F. Classification and molecular biology. In: GOYAL, S. M.; RIDPATH, J. F. **Bovine viral diarrhoea virus**. Iowa: Blackwell Publishing, 2005. cap. 3, p. 65-80.

RIDPATH, J.; FLORES, E.F. **Flaviviridae**. In: FLORES, E.F. (Org) *Virologia veterinária*. Santa Maria: UFSM, 2007. p.563-592.

RIDPATH, J. F.; NEILL, J. D.; FREY, M.; LANDGRAF, J. G. Phylogenetic, antigenic and clinical characterization of type 2 BVDV from North America. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 77, n. 1-2, p. 145-155, 2000.

ROCHA, M. A. Diagnóstico da rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 23, p. 535-539, 1999.

ROCHA, M. A.; GOUVEIA, A. M. G.; LOBATO, Z. I. P.; LEITE, R. C. Pesquisa de anticorpos para IBR em amostragem de demanda no Estado de Minas Gerais, 1990-1999. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 53, n. 6, p. 645-647, 2001.

ROIZMAN, B.; DESROSIERS, R. C.; FLECKENSTEIN, B. Family Herpesviridae. **Archives of Virology**, New York, v. 140, supl. 10, p. 114-127, 1995.

ROSS C. E.; DUBOVI E. J.; DONIS R. O. Herd problem of abortions and malformed calves attributed to bovine viral diarrhoea. **Journal of The American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 188, n. 6, p. 618-619, 1986.

SAMARA, S. I.; DIAS, F. C.; MOREIRA, S. P. G.; BUZINARO, M. G. Ocorrência da diarréia viral bovina nas regiões Sul do Estado de Minas Gerais e Nordeste do Estado de São Paulo. **Ars Veterinária**, Jaboticabal, v. 20, n. 1, p. 75-82, 2004.

SAMARA, S. I.; LIMA, E. G.; NASCIMENTO, A. A. Monitoração da Leucose Enzoótica Bovina no gado leiteiro da região de Pitangueiras/SP. **Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 34, n. 6, 349-351, 1997.

SANDVIK, T. Laboratory diagnostic investigations for bovine viral diarrhoea virus infections in cattle. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 64, n. 2-3, p. 123-134, 1999.

SCHWYZER, M.; ACKERMANN, M. Molecular virology of ruminant herpes viruses. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 53, p. 17-29, 1996.

SILVA, L.F. **Imunogenicidade de vacinas inativadas contra o herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e vírus da diarreia viral bovina (BVDV) em bovinos e cobaias**. 2006. 64f. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria.

SILVA, L.F.; DIEHL, D.G.; CILENTO, M.C.; WEIBLEN, R.; FLORES, E.F. Cobaias como modelo para teste de vacinas contra o herpesvírus bovino tipo 1 e o vírus da diarreia viral bovina. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.37, n.4, p. 1060-1065, 2007a.

SILVA, L.F.; WEIBLEN, R.; FLORES, E.F. Imunogenicidade de vacinas comerciais inativadas contra o herpesvírus bovino tipo 1. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.37, n.5, p. 1471-1474, 2007b.

SOLIS-CALDERON, J. J.; CORREA, V. M. S.; CORREA, J. C. S. Bovine viral diarrhoea virus in beef cattle herds of Yucatan, Mexico: Seroprevalence and risk factors. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 72, p. 253-262, 2005.

STRAUB, O. C. BHV1 infections: relevance and spread in Europe. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, Oxford, v. 14, n. 2, p. 175-186, 1991.

STUDDERTT, M.J., RADOSTITST O.M., SAVANT, M. An outbreak of infectious bovine rhinotracheitis in Ontario. **Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v.2, n.6, 1961.

TAKIUCHI, E.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Herpesvírus bovino tipo 1: tópicos sobre a infecção e métodos de diagnóstico. **Semina: Ciências Agrárias, Londrina**, v. 22, n. 2, p. 203-209, 2001.

THOMSON, R.G.; SAVAN, M. Studies on virus diarrhea and mucosal disease of cattle. **Can. J. Comp. Med.**, v.27, p.207-214, 1963.

THURMOND, M. C. Virus transmission. In: GOYAL, S. M.; RIDPATH, J. F. **Bovine viral diarrhea virus**. Iowa: Blackwell Publishing, 2005. cap. 5, p. 91-104.

TIKOO, S. K.; CAMPOS, M.; BABIUK, L. A. A bovine herpesvirus 1 (BHV-1): biology, pathogenesis and control. In: **MARAMOROSCH, K.; MURPHY, F.A.; SHANTKIN, A.J. Advances in virus research**. San Diego: Academic Press, v. 45, p. 191-223, 1995.

TREMBLAY, R. Transmission of bovine viral diarrhoea virus. **Veterinary Medicine**, Lenexa, v. 91, n. 9, p. 858-866, 1996.

VAN DRUNEN LITTEL – VAN DEN HURK, S. Rationale and perspectives on the success of vaccination against bovine herpesvirus-1. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 31, n. 113, p. 3-4, 2005.

VAN ENGELENBURG, F. A. C.; VAN SCHIE, F. W.; RIJSEWIJK, F. A. M.; VAN OIRSCHOT, J. T. Excretion of bovine herpesvirus 1 in semen is detected much longer by PCR than by virus isolation. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 33, n. 2, p. 308-312, 1995.

VAN OIRSCHOT, J. T.; BRUSCHKE, C. J. M.; VAN RIJN, P. A. Vaccination of cattle against bovine viral diarrhoea. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 64, n. 2/3, p.169-183, 1999.

VAN SCHAIK, G.; DIJKHUIZEN, A. A.; HUIRNE, R. B. M.; SCHUKKEN, Y. H.; NIELEN, M.; HAGE, J. J. Risk factors for existence of bovine herpesvirus 1 antibodies on nonvaccinating Dutch dairy farms. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 34, p. 125-136, 1998.

VAN SCHAIK, G.; SCHUKKEN, Y. H.; NIELEN, M.; DIJKHUIZEN, A. A.; BARKEMA, H. W.; DENEDICTUS, G. Probability of and risk factors for introduction of infectious diseases into Dutch SPF dairy farms: a cohort study. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 54, n 3, p. 279-289, 2002.

VIANA, K. S.; ZANINI, M. S. Perfil de produtores frente à vacinação contra doenças infecciosas abortivas em rebanhos bovinos do município de Alegre/ES. **Archives of veterinary science**, Curitiba, v. 14, n. 2, p. 103-108, 2009.

VIDOR, T.; HAEFEN, D. C.; LEITE, T. E.; COSWIG, L. T. Herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1). Sorologia de rebanhos com problemas reprodutivos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 25, n. 3, p. 421-424, 1995.

VILCEK, S.; NETTLETON, P.F.; HERRING, J.A. Rapid detection of bovine herpesvirus 1 (BHV 1) using the polymerase chain reaction. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 24, p. 53-64, 1994.

VILCEK, S.; PATON, D. J.; DURKOVIC, B.; STROJNY, L.; IBARA, G.; MOUSSA, A.; LOITSCH, A.; ROSSMANITH, W.; VEJA, S.; SCICLUNA, M. T.; PAIF, V. Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups. **Archives of Virology**, New York, v. 146, p. 99-115, 2001.

VOGEL, F. S. F.; FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; KUNRATH, C. F. 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**, Santa Maria, v. 32, n. 5, p. 881-883, 2002.

VONK NOORDEGRAAF, A.; LABROVIC, A.; FRANKENA, K.; PFEIFFER, D. U. NIELEN, M. Simulated hazards of losing infection-free status in a Dutch BHV1 model. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 62, n. 1, p. 51-58, 2004.

WEBSTER, R. G.; MANKTELOW, B. W. Some observations on bovine rhinotracheitis in New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, Wellington, v.7, p.143-8, 1959.

WHITE, M.B.; SNOWDON, W.A. The breeding record of cows inseminated with a batch of sêmen contaminated with infectious bovine rhinotracheitis virus. **Australian Veterinary Journal**, Brunswick, v.49, n.11, p.501-506, 1973.

WHITMORE, H. L.; ZEMJANIS, R.; OLSON, J. Effects of bovine viral diarrhea virus on conception in cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 178, n. 10, p. 1065-1067, 1981.

WIZIGMANN, G.; T. VIDOR. Pesquisa de anticorpos para influenza equina no Rio Grande do Sul. **Instituto de Pesquisa Veterinária Desidério Finamor**, Rio Grande do Sul, v.11, 1969.

WYLER, R.; ENGELS, M.; SCHWYZR, M. Infectious bovine rhinotracheitis/vulvovaginites (BHV-1). In: WITTMANN, G. Ed., **Herpesvirus diseases of cattle, horses and pigs**. Massachusetts: Keuwer Academic Publishers, 1989. p. 1-72.