

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

INGRYD MERCHIORATTO

**CARACTERIZAÇÃO DE PESTIVÍRUS BOVINOS E AVALIAÇÃO DE VACINAS
COMERCIAIS**

**Uruguiana
2019**

INGRYD MERCHIORATTO

**CARACTERIZAÇÃO DE PESTIVÍRUS BOVINOS E AVALIAÇÃO DE VACINAS
COMERCIAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Strictu Sensu* em Ciência Animal da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Mário Celso Sperotto Brum

Uruguaiana
2019

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos
pelo (a) autor (a) através do Módulo de Biblioteca do
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais).

M553c Merchioratto, Ingrid
Caracterização de pestivírus bovinos e avaliação de
vacinas comerciais / Ingrid Merchioratto.
61 p.
Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Pampa,
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL, 2019.
"Orientação: Mário Celso Sperotto Brum".
1. Virologia. 2. Caracterização. 3. Doenças
Reprodutivas. 4. Vacinas comerciais. 5. Resposta
sorológica. I. Título.

INGRYD MERCHIORATTO

**CARACTERIZAÇÃO DE PESTIVÍRUS BOVINOS E AVALIAÇÃO DE VACINAS
COMERCIAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Strictu Sensu* em Ciência Animal da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de Concentração: Sanidade Animal

Dissertação defendida e aprovada em 20 de fevereiro de 2019.
Banca Examinadora:

Prof. Dr. Mário Celso Sperotto Brum
Orientador - UNIPAMPA

Profa. Dra. Carolina Kist Traesel
UNIPAMPA

Prof. Dr. Mathias Martins
UNOESC

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por permitir traçar meu caminho e chegar até aqui, e principalmente ser minha fonte de força e energia inesgotável;

Aos meu pais, Nabor (in memoriam) e Aparecida pela educação, e orientação sobre os valores da vida e sempre servirem de exemplo; por nunca terem faltado com paciência, confiança, amor, amparo e por serem a minha base;

À minha irmã Kássia, por ser meu exemplo, por se fazer presente mesmo estando longe fisicamente e me incentivar principalmente nos estudos;

Ao meu companheiro Isac, por ser paciente e proporcionar conforto e apoio principalmente nessa etapa importante de conclusão da dissertação;

Aos amigos que se fizeram presente durante o período do mestrando tornando os dias mais confortáveis;

A todos que fizeram parte da equipe do laboratório de virologia da UNIPAMPA, pela convivência, aprendizado e amizade;

Ao meu orientador Prof^o Mário, por acima de tudo ser uma pessoa incrível o qual tenho como exemplo, pelos aprendizados ao longo dessa trajetória, amizade, disponibilidade e paciência;

À minha coorientadora Prof^a Nina, pelos ensinamentos, convivência e amizade;

Ao Setor de Virologia da UFSM, equipe do laboratório e principalmente ao Prof^o Eduardo Furtado Flores e Prof^o Rudi Weiblen pela parceria;

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da UNIPAMPA campus Uruguaiana pela oportunidade;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por fornecer bolsa de mestrado;

Muito Obrigada!

“O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada.

Caminhando e semeando, no fim terás o que colher.”

Cora Coralina

RESUMO

Os pestivírus de bovinos são importantes patógenos que produzem perdas produtivas e reprodutivas em diversas regiões do mundo. O gênero *Pestivirus*, pertence à família *Flaviviridae*, e abriga três espécies virais que infectam bovinos sendo: vírus da diarreia viral bovina 1 (BVDV-1) - *Pestivirus A*, BVDV-2 - *Pestivirus B* e os vírus *HoBi-like* (HoBiPeV) - *Pestivirus H*. Essas espécies são identificadas com base na comparação da região 5' não-traduzida do genoma (5'UTR) por ser uma região conservada, permitindo ainda a segregação em subgenótipos. O genoma RNA do vírus contribui para a ocorrência de regiões variáveis, o que pode ser comprovado pela sua ampla variabilidade genética e antigênica. Atualmente, o BVDV-1 está alocado em 21 subgenótipos (1a-u), BVDV-2 em quatro (2a-d) e são sugeridos quatro subgenótipos para o HoBiPeV (3a-d). As variabilidades são um agravante para o diagnóstico, produção de vacinas e estratégias de controle. Em um primeiro estudo, descreve-se a caracterização genética e antigênica de pestivírus isolados de soro fetal bovino e de animais com sinais clínicos. Desses, foram isoladas doze amostras, sendo 83,3% (10/12) identificadas como BVDV-1, das quais quatro foram classificadas como BVDV-1a e seis como BVDV-1b; e 16,7% (2/12) compatíveis com BVDV-2, sendo um foi classificado como BVDV-2b e um isolado não foi possível determinar o subgenótipo. A caracterização antigênica realizada com um painel de anticorpos monoclonais confirmou variabilidade antigênica entre os isolados e divergência com cepas padrão. Estes resultados demonstram que existe diversidade genética e grande variabilidade antigênica entre os isolados que circulam nos rebanhos. O segundo estudo, avaliou a imunogenicidade de quatro vacinas comerciais uruguaias para alfa herpesvírus bovinos 1, 5 e pestivírus bovinos, testadas em ovinos. Foram utilizados 38 ovinos, alocados em quatro grupos (G1, G2, G3 e G4), onde cada grupo recebeu uma vacina. A avaliação das vacinas demonstrou uma resposta sorológica variável, onde somente a vacina G4 induziu níveis de anticorpos neutralizantes para BoHV-1, 5, BVDV-1 e 2 sugestivos de proteção. A vacina G3 estimulou resposta somente para os alfa herpesvírus, enquanto que a G1 e G2 induziram a produção de anticorpos neutralizantes em níveis baixos ou indetectáveis. Assim, os resultados desse estudo demonstram que as vacinas uruguaias testadas apresentam moderada a nenhuma eficiência na indução de anticorpos neutralizantes. Em resumo, o presente estudo apresenta um panorama de amostras de pestivírus circulantes e a imunogenicidade de vacinas comerciais uruguaias.

Palavras-chaves: BVDV, variabilidade antigênica, resposta sorológica, anticorpos

ABSTRACT

Bovine pestiviruses are important pathogens for cattle industry that produce productive and reproductive losses in several regions of the world. The genus *Pestivirus* belongs to the *Flaviviridae* family, and has three viral species that infect cattle: bovine viral diarrhea virus 1 (BVDV-1) - *Pestivirus A*, BVDV-2 - *Pestivirus B* and *HoBi-like* viruses (HoBiPeV) - *Pestivirus H*. These species are segregated into species and subgenotypes by comparing the conserved 5' untranslated region (5'UTR) of the genome. The virus RNA genome contributes to the occurrence of diversity, which can be demonstrated by the wide genetic and antigenic variability. Currently, BVDV-1 is allocated in 21 subgenotypes (1a-u), BVDV-2 has four (2a-d) and four subgenotypes are suggested for HoBiPeV (3a-d). Variability is a constraint for diagnosis, vaccine production, and control strategies. In a first study, is described the genetic and antigenic characterization of pestiviruses isolated from fetal bovine serum and infected animals. Of these, twelve samples were isolated, 10 out 12 were identified as BVDV-1 (four BVDV-1a and six BVDV-1b); and 2 out 12 compatibles with BVDV-2 (one BVDV-2b and one BVDV-2 undetermined subgenotype). The antigenic characterization performed with a panel of monoclonal antibodies confirmed antigenic variability in the isolates and divergence with laboratorial strains. These results demonstrate that there is genetic diversity and great antigenic variability among the isolates circulating in the herds. The second study evaluated the immunogenicity, in sheep, of four Uruguayan commercial vaccines for bovine alphaherpesvirus 1, 5 and bovine pestiviruses. Vaccine evaluation demonstrated a variable serological response in which only the G4 vaccine induced considerable levels of neutralizing antibodies to BoHV-1, 5, BVDV-1 and 2. The G3 vaccine stimulated response only to alphaherpesviruses, while G1 and G2 induced the production of neutralizing antibodies at low or undetectable levels. Thus, the results of this study demonstrate that these Uruguayan vaccines tested have little or no efficiency in the induction of neutralizing antibodies. In summary, the present study presents an overview of circulating pestivirus samples and the immunogenicity of Uruguayan commercial vaccines.

Keywords: BVDV, variability, serological response, antibodies

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BDV - Vírus da Doença da Fronteira

BoHV - Alfaherpesvírus bovino

BVDV - Vírus da diarreia viral bovina

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

cDNA - Ácido desoxirribonucleico complementar

CEUA - Comitê de Estudo e Uso de Animais

CP - Citopático

CSFV - Vírus da Peste Suína Clássica

DM - Doença das mucosas

DMEM - *Dulbecco Minimum Essential Medium*

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

GMT - Títulos médios geométricos

Gn - Grupo vacinal

HoBiPeV - pestivírus *HoBi-Like*

IFA - Imunofluorescência

IPX - Imunoperoxidase

Kb - Kilobases

MAb - *Monoclonal antibodies*

MDBK - *Madin-Darby bovine kidney*

MEGA - *Molecular Evolutionary Genetics Analysis*

NCP - Não citopático

°C - Grau *Celsius*

ORF - *Open reading frame*

PCR - Reação em cadeia da polimerase

PI - Persistentemente infectado

PV - *Pos vaccination*

PV - Pós vacinação

RNA - Ácido ribonucléico

SN - Soro Neutralização

SV - Setor de Virologia

TCID₅₀ - *50% Tissue Culture Infective Dose*

UFSM - Universidade Federal de Santa Maria

UNIPAMPA - Universidade Federal do Pampa

UTR - *Untranslated region*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	BREVE REVISÃO DE DIARREIA VIRAL BOVINA	17
2.1	Definição e importância da infecção.....	17
2.2	Característica do agente.....	17
2.3	Epidemiologia.....	19
2.4	Patogenia.....	20
2.5	Sinais clínicos.....	21
2.6	Diagnóstico.....	22
2.7	Controle e profilaxia.....	23
3	OBJETIVOS	25
3.1	Objetivos específicos.....	25
4	CAPÍTULO 1. Caracterização genética e antigênica de pestivírus isolados em bovinos	26
4.1	Resumo.....	27
4.2	Abstract.....	27
4.3	Introdução.....	28
4.4	Material e Métodos.....	29
4.5	Resultados.....	31
4.6	Discussão.....	32
4.7	Conclusão.....	34
4.8	Referências bibliográficas.....	35
5	CAPÍTULO 2. Imunogenicidade de vacinas comerciais uruguaias para alfaherpesvírus bovino 1, 5 e pestivírus bovinos	41
5.1	Resumo.....	42
5.2	Abstract.....	42
5.3	Introdução.....	43
5.4	Material e Métodos.....	45
5.5	Resultados.....	46
5.6	Discussão.....	47
5.7	Conclusão.....	50
5.8	Referências bibliográficas.....	52

6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	56
7	REFERÊNCIAS.....	58

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

TABELA 1	Perfil da reatividade sorológica dos isolados frente a um painel de MAbs específicos para glicoproteína de pestivirus bovinos.....	39
----------	--	----

CAPÍTULO 2

TABELA 1	Reatividade sorológica para alfa herpesvírus bovino (BoHV) 1 e 5 (dia 40PV) e vírus da diarreia viral bovina (BVDV) 1, 2 e HoBiPeV (dia 60PV) de ovinos imunizados com quatro vacinas comerciais uruguaias.....	54
----------	---	----

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Representação esquemática do genoma do BVDV e suas 12 proteínas...	18
CAPÍTULO 1		
FIGURA 1	Análise filogenética construída pelo método de Neighbor-Joining, <i>Kimura 2 parameter</i> , com base na região 5'UTR de 12 sequências de nucleotídeos de isolados de pestivírus bovinos (♦; 411 posições). Somente valores de bootstrap (1000 réplicas) acima de 50% estão demonstrados.....	40
CAPÍTULO 2		
FIGURA 1	Resposta sorológica de ovinos imunizados com quatro diferentes vacinas comerciais para o herpesvírus bovino 1 (BoHV-1, cepa Cooper) e vírus da diarreia viral bovina 1 (BVDV-1, cepa Singer) de origem uruguaia, entre os dias 0 e 90 pós vacinação.....	55

1. INTRODUÇÃO

A diarreia viral bovina (BVD) é uma importante doença para a bovinocultura, sendo uma das enfermidades responsáveis por perdas produtivas, reprodutivas e acarretar em prejuízos econômicos (FLORES et al., 2005; HOUE, 1995). A infecção por pestivírus bovinos possui distribuição mundial, sendo que em países onde a bovinocultura possui relevância econômica as perdas são mais impactantes (FLORES et al., 2005). No Brasil, está presente desde o final da década de 1960 e, desde então, é descrito rotineiramente em diversos Estados (BOTTON et al., 1998b; DIAS et al., 2010; FLORES et al., 2005; MONTEIRO et al., 2018a).

Esse vírus pertence à família *Flaviviridae*, e está classificado no gênero *Pestivirus*, sendo três espécies que infectam bovinos: vírus da diarreia viral bovina 1 (BVDV-1) ou *Pestivirus A*, BVDV-2 ou *Pestivirus B* e pestivírus HoBi-like ou *Pestivirus H* (HoBiPeV), juntamente com outros vírus de suínos, ovinos e alguns isolados de animais selvagens (ICTV, 2018). O vírion é composto por um genoma RNA, com uma única fase de leitura (ORF) e duas regiões não codificadas nas extremidades, denominadas *untranslated region* (UTR) 5' e 3' (DONIS, 1995). A região UTR 5' por ser altamente conservada é comumente utilizada na detecção e caracterização de variações no genoma, e também, na comparação entre sequências, sendo um dos critérios mais seguros para a diferenciação, permitindo agrupar os isolados de acordo com seus respectivos genótipos e subgenótipos (PELLERIN et al., 1994; RIDPATH; BOLIN; DUBOVI, 1994).

Com base no efeito da multiplicação em cultivo celular o BVDV pode ser dividido em dois biótipos, citopáticos (CP) e não citopáticos (NCP) (DONIS, 1995). As cepas NCP estão relacionadas com diversas manifestações clínicas, sendo mais predominantes nos isolados a campo (FLORES et al., 2005). Os biótipos CP originam-se de mutações ou recombinações dos NCP e estão quase que exclusivamente associadas à Doença das Mucosas (SCHWEIZER; PETERHANS, 2014). A citopatologia está relacionado à capacidade do vírus expressar a proteína não-estrutural NS3/p80 (MEYERS et al., 1991), sendo essa considerada marcador molecular para BVDV CP (SCHWEIZER; PETERHANS, 2014).

O BVDV possui uma alta variabilidade genética e antigênica, permitindo sua classificação em mais de um genótipo, BVDV-1, BVDV-2 (RIDPATH; BOLIN; DUBOVI, 1994) e HoBiPeV (BAUERMANN et al., 2013; ICTV, 2018). Ainda, por apresentar um genoma de fita simples, esses vírus acabam exibindo altas taxas de mutação, podendo levar o surgimento de novas linhagens de vírus (BAUERMANN et al., 2013a; RIDPATH; BOLIN; DUBOVI, 1994; SCHIRRMIEIER et al., 2004b; VILCEK et al., 2005). A variabilidade

antigênica ocorre devido a região hipervariável na glicoproteína gp53/E2 (DONIS, 1995), sendo essa encontrada em maior abundância no envelope do vírus. Essa proteína é uma das responsáveis pela estimulação de anticorpos neutralizantes, e portanto, a variabilidade antigênica é uma estratégia do vírus para escapar dos mecanismos de defesa do hospedeiro (DONIS, 1995). Atualmente, cada genótipo do BVDV é dividido em subgenótipos, onde o BVDV-1 é subdividido em 21 grupos (BVDV-1a-u), o BVDV-2 em quatro subgrupos (BVDV-2a-d) e o HoBiPeV também em quatro subgrupos (3a-d) (GIAMMARIOLI et al., 2015; GIANGASPERO; HARASAWA, 2011; YEŞILBAĞ; ALPAY; BECHER, 2017). Ambos os genótipos apresentam baixa reatividade sorológica cruzada entre si, acarretando em importantes implicações tanto no diagnóstico quanto na eficácia das vacinas (RIDPATH, 2003).

As diversidades genética e antigênica entre os isolados de pestivírus refletem diretamente na confiabilidade do diagnóstico e eficácia das vacinas comerciais disponíveis atualmente no mercado, uma vez que se tem baixa sorologia cruzada entre os genótipos do BVDV (RIDPATH; BOLIN; DUBOVI, 1994). Ainda ressaltando que, a maioria das vacinas são produzidas com cepas europeias e americanas, sendo essas diferentes daquelas utilizadas no Brasil, além de que nenhuma vacina contém cepas de HoBiPeV que, segundo estudos, também circula nos rebanhos brasileiros (BOTTON et al., 1998b; MONTEIRO et al., 2018).

O BVDV apresenta diversos estudos com finalidade de caracterização genética e antigênica (BECHER et al., 2003; BIANCHI, 2011; BOTTON et al., 1998a; CANAL et al., 1998; SILVEIRA et al., 2015), porém devido a sua alta variabilidade antigênica (DONIS, 1995) e estarem sujeitos à mutações ou recombinações (BAUERMAN et al., 2013; RIDPATH; BOLIN; DUBOVI, 1994; SCHIRRMIEIER et al., 2004a; VILCEK et al., 2005) é importante a contínua caracterização de isolados, afim de monitorar e mapear o perfil dos BVDV circulante. Considerando os estudos que demonstram que as vacinas brasileiras induzem baixos níveis de anticorpos neutralizantes (ANZILIERO et al., 2015; VOGEL et al., 2002) torna-se ainda mais importante que sejam realizados monitoramentos constantes, auxiliando na adequação e atualização das técnicas de diagnóstico e formulação de vacinas (RIDPATH, 2003).

2. BREVE REVISÃO SOBRE DIARREIA VIRAL BOVINA

2.1 Definição e Importância da infecção

A diarreia viral bovina é uma infecção causada por *Pestivirus* bovino (BVDV) descrita inicialmente em 1946 por pesquisadores da Universidade de Cornell (BOTTON et al., 1998b). Os primeiros relatos ocorreram em bovinos na América do Norte, associado com doença entérica, caracterizada por surtos de diarreia e lesões erosivas no trato digestivo (BAKER, 1995). Atualmente sabe-se que além da manifestação gastroentérica, os animais podem apresentar patologias cutâneas, doença respiratória em bezerros, síndrome hemorrágica e problemas reprodutivos, estas englobam desde reabsorção embrionária, aborto, natimorto, mumificação, produção de animal persistentemente infectado (PI) e até animais imunotolerantes (FLORES et al., 2005). Os bovinos são considerados os hospedeiros naturais, contudo o BVDV infecta, de forma natural, tanto animais domésticos quanto silvestres (HOUE, 1995).

O BVDV é considerado um dos principais patógenos em bovinos, principalmente quando cursa com problemas reprodutivos, onde as consequências são perdas econômicas consideráveis para a bovinocultura (FLORES et al., 2005). Por ser um patógeno que apresenta ampla distribuição, as perdas econômicas são uma realidade mundial (HOUE, 1995; WEBER et al., 2015).

2.2 Características do Agente

O vírus da diarreia viral bovina pertence à família *Flaviviridae* (ICTV, 2018). Essa família é dividida em quatro gêneros, e dentre esses o *Pestivirus* agrupa três espécies que infectam bovinos: vírus da diarreia viral bovina 1 (BVDV-1) ou *Pestivirus A*, BVDV-2 ou *Pestivirus B* e pestivirus HoBi-like ou *Pestivirus H* (HoBiPeV), juntamente com outras espécies como os vírus da Peste Suína Clássica (CSFV), Doença da Fronteira (BDV), *Pestivirus* não caracterizados e *Pestivirus* atípico (ICTV, 2018).

O BVDV é composto por um genoma de RNA fita simples, polaridade positiva com aproximadamente 12,3kb (DONIS, 1995; SCHWEIZER; PETERHANS, 2014). Possui uma ORF (única fase de leitura) e duas regiões não codificadas nas extremidades, denominadas UTR 5' e 3' (DONIS, 1995). O capsídeo é icosaédrico e o envelope originário de membranas celulares

que possui glicoproteínas de origem viral. O vírion possui tamanho aproximado de 40-60 nm de diâmetro (RIDPATH; BOLIN; DUBOVI, 1994). Esses vírus são sensíveis à ação de detergentes e solventes orgânicos. O genoma do BVDV codifica 12 polipeptídios, classificados em estrutural e não-estrutural (Figura 1). As proteínas estruturais são C, E0, E1 e E2; e as não-estruturais são Npro, NS2-3, NS2, NS3, NS4A, NS4A, NS5A e NS5B (DONIS, 1995). As proteínas estruturais estão localizadas no envelope, com exceção da p14/C que está localizada no capsídeo (DONIS, 1995).

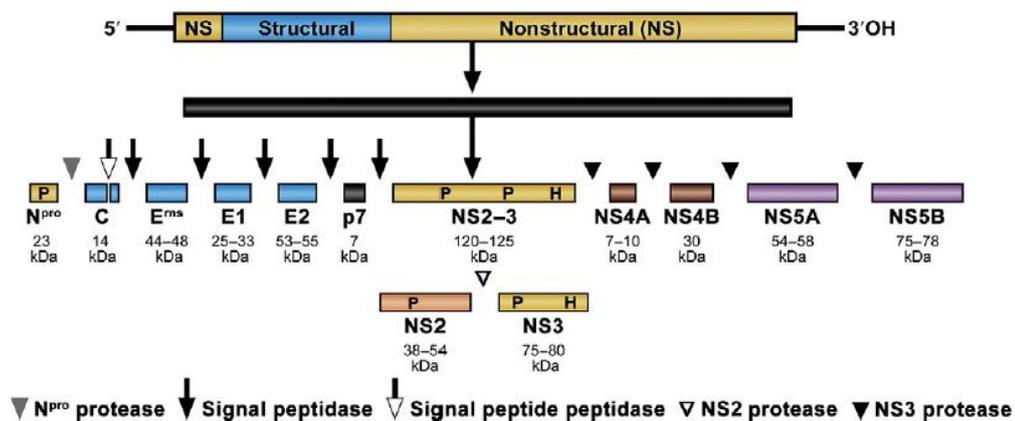


Figura 1-Representação esquemática do genoma do BVDV e suas 12 proteínas. *Fonte: Norbert Tautz et al. The Molecular Biology of Pestiviruses Advances in Virus Research, Volume 93. 2015.*

A região UTR 5' é altamente conservada entre os pestivírus e utilizada de forma segura para comparação de análise filogenética (BAUERMANN et al., 2013; RIDPATH; BOLIN; DUBOVI, 1994). A comparação das sequências que codificam as proteínas Npro e E2 também são utilizadas para caracterização e comparação dos isolados de pestivírus (DONIS, 1995; RIDPATH; BOLIN; DUBOVI, 1994). A glicoproteína gp53/E2 apresenta região hipervariável, a qual confere grande variabilidade antigênica ao BVDV (DONIS, 1995). Essa glicoproteína é a mais abundante encontrada no envelope do vírus, e é responsável pela indução de anticorpos neutralizantes. Portanto, a variabilidade dessa glicoproteína faz parte das estratégias do vírus para escapar dos mecanismos de defesa do hospedeiro (DONIS, 1995).

Assim sendo, o BVDV é dividido em dois genótipos, sendo BVDV-1 e BVDV-2 (RIDPATH, 2003). Atualmente, esses genótipos já foram subdivididos, onde o BVDV-1 é alocado em 21 subgenótipo (BVDV- 1a-u), e o BVDV-2 subdividido em pelo menos quatro (BVDV- 2a-d) (GIAMMARIOLI et al., 2015; GIANGASPERO et al., 2008; YEŞILBAĞ; ALPAY; BECHER, 2017). O HoBiPeV também é dividido em subgenótipos sendo quatro variantes (3a-d) (GIAMMARIOLI et al., 2015). A reatividade sorológica cruzada entre os três

genótipos é baixa gerando importantes implicações no diagnóstico e também na eficácia das vacinas (RIDPATH, 2003; RIDPATH; BOLIN; DUBOVI, 1994).

O BVDV pode ser classificado em dois biótipos com base no efeito da sua replicação em células de cultivo, sendo amostras citopáticas (CP) e não citopáticas (NCP) (SILVA et al., 2007). A citopatologia em cultivo celular está correlacionado com a capacidade do vírus expressar a proteína não-estrutural NS3/p80 (MEYERS et al., 1991). Segundo estudos realizados por Botton et al., (1998a) a correlação direta entre citopatologia e expressão da NS3/p80 foi reafirmada por análises das proteínas virais analisadas por *Western-immunoblot*. Assim, como os biótipos NCP expressam somente proteína precursora NS23, a NS3 é considerada um marcador molecular para BVDV CP (FLORES et al., 2005).

O biótipo NCP representa a maioria dos isolados de campo, sendo responsáveis também pelas infecções persistentes. Em contrapartida, os CP representam a minoria dos isolados, não promovem infecções persistentes e são isolados quase que exclusivamente de animais com DM (SCHWEIZER; PETERHANS, 2014). Os CP são gerados em animais PI a partir de mutações, recombinações, rearranjos ou deleções que ocorrem no vírus NCP original, levando à expressão da proteína NS3 (MEYERS et al., 1991).

2.3 *Epidemiologia*

O BVDV encontra-se difundido mundialmente, de forma que, virtualmente todos os países que possuem bovinos, seja de importância econômica ou não, já relataram sua presença (FLORES et al., 2005). Países livres de Febre Aftosa enfrentam o BVDV como o principal agente impactante da bovinocultura e buscam programas de controle e/ou erradicação para a infecção (FLORES et al., 2005). No Brasil há relatos desde o final da década de 60 (FLORES et al., 2005). Desde então, estudos tem sido realizados comprovando rebanhos positivos em diversos Estados como Pernambuco, Sergipe, Bahia, Goiás, Mato Grosso do Sul, Paraná, Rio Grande do Sul, Minas Gerais e São Paulo (DIAS et al., 2010). No Rio Grande do Sul, o BVDV foi isolado pela primeira vez no ano de 1974 por Vidor (BOTTON et al., 1998a). Os índices de prevalência variam entre 18 à 80% de sorologia positiva dependendo da característica do rebanho e do manejo (FLORES et al., 2005).

A transmissão do vírus pode ocorrer tanto de forma horizontal quanto vertical (FLORES et al., 2005). Na transmissão horizontal, o vírus é disseminado tanto na via direta entre os animais (inalação/ingestão das partículas ou pela via sexual) como também pela indireta, sendo essas por meio de secreções (nasais, oculares, saliva e sêmen), excreções e fômites infectados

(SCHWEIZER; PETERHANS, 2014). A forma vertical ocorre pela forma direta, da vaca para o feto, sendo a de maior relevância a infecção do feto via transplacentária (HOUE, 1995), podendo ocorrer também via amamentação do recém-nascido (FINO et al., 2012).

A perpetuação do vírus no rebanho ocorre principalmente pelo animal persistentemente infectado (PI), porém animais com infecção aguda também podem transmitir o agente (RIDPATH; BAUERMANN; FLORES, 2017). Essa importância é evidenciada pois o animal PI, ao longo de sua vida, excreta o vírus continuamente, mantendo e disseminando o BVDV entre os animais (ARENHART et al., 2009; BAKER, 1995; RIDPATH; BAUERMANN; FLORES, 2017). Já o animal infectado temporariamente irá transmitir o vírus somente na fase aguda da infecção, por menos tempo e geralmente em títulos menores (HOUE, 1995).

2.4 *Patogenia*

A replicação do vírus ocorre inicialmente no sítio primário da infecção, sendo assim, na infecção oronasal, a replicação ocorre no epitélio do trato respiratório superior, orofaringe e tecido linfóide regional (BAKER, 1995). A partir desse sítio ocorre disseminação via sistêmica (BROWNLIE, 1990). A severidade e as consequências da infecção aguda dependem de alguns fatores, dentre esses estão a imunidade do animal e seu *status* reprodutivo, a amostra viral e presença ou ausência de infecções secundárias (RIDPATH; BAUERMANN; FLORES, 2017). A infecção pode acometer qualquer categoria de animal, desde bezerras até animais adultos (RIDPATH; BAUERMANN; FLORES, 2017). Considerando a epidemiologia e suas consequências clínico-patológicas, a infecção é dividida em duas categorias, sendo infecção aguda de animais não prenhes e infecção aguda de fêmeas prenhes (BAKER, 1995; RIDPATH; BAUERMANN; FLORES, 2017).

Em animais não prenhes, a infecção do BVDV resultará em uma viremia seguida de produção de anticorpos (HOUE, 1995), podendo cursar com sinais clínicos ou subclínicos em animais imunocompetentes (BAKER, 1995). A incubação do vírus varia entre três a sete dias, podendo ser detectado no sangue a partir do 4º dia pós-infecção, e persistir por até 15 dias em alguns animais. A infecção é autolimitante, apresentando alta morbidade e baixa ou nula mortalidade (RIDPATH; BAUERMANN; FLORES, 2017).

A infecção de fêmeas prenhes tem uma apresentação clínica semelhante a de animais não gestantes, o detalhe é a capacidade do vírus em transpassar a barreira placentária e, conseqüentemente, infectar o embrião ou feto (BAKER, 1995). As consequências dessa infecção transplacentária vão depender da idade da gestação, podendo haver desde reabsorção

embrionária, abortos, mumificação fetal, natimortos, bezerros fracos e inviáveis ou até animais livres da infecção sendo apenas soropositivos (MCCLURKIN et al., 1984; RIDPATH; BAUERMANN; FLORES, 2017). Os dois biótipos do BVDV, citopático e não citopático, apresentam potencial para a infecção do concepto (BAKER, 1995), entretanto, a infecção pelo BVDV NCP entre os 40-120 dias de gestação pode resultar na produção de um animal persistentemente infectado (PI) (BAKER, 1995; MCCLURKIN et al., 1984). A infecção nesse período gestacional estabelece uma imunotolerância do feto ao vírus (DIAS et al., 2017; HOUE, 1995), o organismo não consegue eliminar o vírus, tornando o animal portador do vírus e assim persistentemente infectado (RIDPATH; BAUERMANN; FLORES, 2017). No caso de ocorrer a infecção no terço final da gestação, a partir de 120 dias, o feto pode desenvolver resposta imunológica por ser imunocompetente, e assim erradicar o agente, sendo um animal saudável e soropositivo para o vírus (RIDPATH; BAUERMANN; FLORES, 2017).

2.5 *Sinais Clínicos*

A infecção por BVDV pode ocorrer de formas subclínicas, clínicas e até uma forma altamente fatal como a Doença das Mucosas (DM) (BAKER, 1995). Em via de regra, após a incubação viral, os animais apresentam um quadro de hipertermia transitória e leucopenia (RIDPATH; BAUERMANN; FLORES, 2017). Clinicamente, os animais com infecção aguda podem apresentar diminuição na produção de leite, manifestações respiratórias, digestivas e reprodutivas e síndrome hemorrágica (BAKER, 1995; HOUE, 1995). A síndrome hemorrágica é caracterizada por trombocitopenia, variáveis índices de morbidades e mortalidade elevada com lesões similares à doença das mucosas (DM) (RIDPATH; BAUERMANN; FLORES, 2017). Ainda, animais PI podem desenvolver uma forma severa e fatal, a DM, caracterizada por febre, diarreia, inapetência, desidratação e morte dentro de poucos dias. Essa forma ocorre quando o PI é superinfectado com o biótipo CP, que normalmente provem do próprio vírus NCP como resultado de mutação (BAKER, 1995; RIDPATH; BAUERMANN; FLORES, 2017).

Ainda, é descrito a capacidade de imunossupressão desse vírus, favorecendo infecções secundárias, podendo ser observado casos de enfermidades respiratórias e entéricas por outros patógenos virais e bacterianos (BROWNLIE, 1990). Apesar da similaridade, a síndrome hemorrágica e a DM são eventos distintos, onde a DM necessita da presença dos dois biótipos (NCP e CP) para que ocorra, enquanto que a síndrome ocorre normalmente na presença do biótipo NCP. Outro ponto que difere ambos eventos é a taxa de mortalidade e morbidade, onde

a DM apresenta baixa taxa de morbidade porém 100% de mortalidade (FLORES et al., 2005; RIDPATH; BAUERMANN; FLORES, 2017).

Em suma, a infecção por BVDV pode ter diferentes apresentações clínico patológicas, entretanto é importante ressaltar a produção do animal PI, sendo os principais disseminadores do vírus, e as perdas reprodutivas que acarretam em grandes perdas econômicas (HOUE, 1995; WEBER et al., 2015).

2.6 Diagnóstico

O diagnóstico é realizado normalmente quando há suspeita da circulação do vírus na propriedade ou quando há sinais clínicos compatíveis com a infecção, ou seja, no rebanho há animais que apresentam doenças respiratórias, entéricas, ulcerações no trato digestivo ou perdas reprodutivas (FLORES et al., 2005; RIDPATH; BAUERMANN; FLORES, 2017).

Em infecção por BVDV, o teste padrão para essa enfermidade é o isolamento viral em cultivo celular seguido por identificação por imunofluorescência (IFA) ou imunoperoxidase (IPX) (FLORES; SCHUCH, 2007). Outras técnicas para detecção do antígeno podem ser realizadas, como ELISA e PCR. Para a realização dessas técnicas, pode-se utilizar sangue coletado com EDTA, fragmentos de tecidos e biópsia de pele. É importante ressaltar que para detecção viral é necessário que os animais estejam no período agudo da infecção, no caso de infecções transientes, ou sejam animais PI. Em infecções transientes, caso o período agudo da infecção tenha passado, recomenda-se o uso de técnicas sorológicas para detecção de anticorpos (FLORES et al., 2005; RIDPATH; BAUERMANN; FLORES, 2017).

A sorologia é comumente realizada pelo teste de soroneutralização (SN) ou ELISA, sendo desaconselhável a realização em animais com menos de 6 meses ou que ainda não foram desmamados, devido à imunidade passiva (RIDPATH; BAUERMANN; FLORES, 2017). Os animais soropositivos demonstram que em algum momento foram sensibilizados, seja por infecção natural ou vacinação (FLORES; SCHUCH, 2007). Ainda, pode-se avaliar o animal duas vezes, coletando as amostras com intervalo de 15-20 dias entre elas e, havendo um aumento significativo de anticorpos em relação a primeira coleta, indica infecção recente (FLORES; SCHUCH, 2007; RIDPATH; BAUERMANN; FLORES, 2017). Considerando propriedades que não vacinam seu rebanho, a sorologia é extremamente importante, de forma que o *status* soropositivo indica infecção pelo agente e, portanto, a sua circulação na propriedade (FLORES et al., 2005).

A detecção do animal PI pode ser realizada por isolamento viral ou técnicas que detectam antígenos. O isolamento viral em células de cultivo seguido de imunofluorescência (IFA) também é o teste padrão (RIDPATH; BAUERMANN; FLORES, 2017), ressaltando que esses animais são portadores do vírus e, portanto excretam continuamente (MCCLURKIN et al., 1984). Assim, permite que o isolamento viral seja feito em qualquer período da sua vida (FLORES; SCHUCH, 2007). O diagnóstico de animais PI é comumente realizado por biópsia de pele (coletado da orelha) detectando o antígeno por IPX ou ELISA (RIDPATH; BAUERMANN; FLORES, 2017). Considerando a patogenia do PI, ou seja, imunotolerantes ao vírus e, conseqüentemente, desenvolvem resposta imunológica ao agente (BAKER, 1995; MCCLURKIN et al., 1984), ao realizar a sorologia, deve-se suspeitar de animais PI aqueles que são soronegativos.

Um importante fator que deve ser levado em consideração no momento do diagnóstico é a variabilidade genética e antigênica que o vírus apresenta (RIDPATH; BAUERMANN; FLORES, 2017). Ainda, o surgimento de cepas antigenicamente distintas, são obstáculos para a eficácia do diagnóstico. Assim sendo, reafirma-se a importância de contínuos estudos de caracterização de isolados de campo (DEZEN et al., 2013; MONTEIRO et al., 2018).

2.7 Controle e Profilaxia

A infecção pelo BVDV pode acarretar em diferentes quadros clínicos-patológicos (HOUE, 1995). O estabelecimento de estratégias para a identificação e eliminação do PI é o ponto central em qualquer programa de controle da infecção (FINO et al., 2012; RIDPATH; BAUERMANN; FLORES, 2017). Associado com a eliminação do PI e medidas de biossegurança pode-se utilizar as vacinas (FLORES; SCHUCH, 2007), isso vai depender do histórico do rebanho, do risco de introdução da infecção e de fatores epidemiológicos (RIDPATH; BAUERMANN; FLORES, 2017).

Em rebanhos que não há ingresso frequente de animais, ou seja, rebanho fechado oferece baixo risco da introdução do agente, sendo recomendado então um controle sem o uso de vacinas (FLORES; SCHUCH, 2007). Nesses rebanhos onde não há histórico da infecção, o controle sem a vacinação objetiva manter o *status* do rebanho soronegativo (RIDPATH; BAUERMANN; FLORES, 2017). Para manter o rebanho livre do agente, medidas de biossegurança devem ser implementadas nessas propriedades, como o teste para o vírus de todos os animais que ingressarem no local (FLORES et al., 2005). Em situações em que se suspeita de animais positivos ou com sinais clínicos suspeitos, esses devem ser identificados e

retirados do rebanho (RIDPATH; BAUERMANN; FLORES, 2017). O controle com o uso de vacina é indicado em propriedades que apresentam alta rotatividade de animais, rebanhos com históricos de doença clínica ou reprodutiva e sorologia positiva (FLORES; SCHUCH, 2007). Ressaltando que, com o uso de vacina no rebanho, se perde o indicador sorológico da presença da infecção (FLORES et al., 2005).

As vacinas devem induzir a proteção dos animais da forma clínica, e também devem impedir a infecção transplacentária do feto (BOLIN, 1995). Atualmente, existem dois tipos de vacinas comerciais, atenuadas e inativadas (RIDPATH; BAUERMANN; FLORES, 2017). No Brasil as vacinas comercializadas são inativadas, com exceção de uma com vírus atenuado recentemente lançada, e são associadas a outros agentes virais como herpesvírus bovino tipo 1, parainfluenza bovina e vírus sincicial respiratório bovino (RIDPATH; BAUERMANN; FLORES, 2017).

A utilização de vacinas inativadas deve ser realizada com duas aplicações com intervalos de 20 - 40 dias, porém existem algumas especificações dependendo da categoria do animal (FLORES; SCHUCH, 2007). Em bezerros, de acordo com o protocolo de vacinação, se forem vacinados entre 4 - 6 meses de idade, devem ser revacinados 30 a 40 dias posteriormente. Porém, devido a possibilidade de ainda possuir anticorpos maternos, recomenda-se a revacinação entre 8 - 12 meses, e assim a cada 6 ou 12 meses deve ser feito a manutenção revacinando-os (FLORES; SCHUCH, 2007). Nas fêmeas que irão participar do manejo reprodutivo, indica-se a revacinação em torno de 2 - 3 semanas antes da temporada de monta (BOLIN, 1995b; RIDPATH; BAUERMANN; FLORES, 2017).

O uso da vacina, apesar de ser uma estratégia, é também um ponto crítico quando questiona-se o grau de proteção conferido ao animal (DEZEN et al., 2013). Espera-se que a vacina induza ao animal, uma produção de anticorpos neutralizantes para os antígenos nela contida, referente ao perfil genético e antigênico apresentado por essas cepas utilizadas (BOLIN, 1995; CANAL et al., 1998). Devido à baixa reatividade sorológica cruzada e alta variabilidade que o vírus apresenta, é possível a ocorrência da infecção e manifestações clínicas patológicas em animais vacinados (DEZEN et al., 2013; FLORES et al., 2000). Assim sendo, além do comprometimento do diagnóstico, também tem sido frequente falhas na proteção vacinal e impactando a proteção fetal (BOLIN, 1995; DEZEN et al., 2013; FLORES et al., 2000).

3. OBJETIVOS

Caracterizar genética e antigenicamente pestivírus isolados de bovinos e avaliar a resposta sorológica de vacinas comerciais para alphaherpesvírus bovino e vírus da diarreia viral bovina de origem uruguaia.

3.1 *Objetivos específicos*

- Avaliar a variabilidade da região 5'UTR de isolados do BVDV;
- Analisar filogeneticamente os isolados em comparação com amostras já isoladas;
- Determinar a variabilidade antigênica por anticorpos monoclonais e sorologia cruzada;
- Avaliar anticorpos neutralizantes de animais imunizados com vacinas comerciais uruguaias;

4. CAPÍTULO 1

Caracterização genética e antigênica de pestivírus isolados de bovinos

Ingryd Merchioratto¹, Carolina Kist Traesel², Mário Celso Sperotto Brum²

Running title: Variabilidade de pestivírus bovinos

Artigo a ser submetido ao periódico Brazilian Journal of Microbiology, 2019.

¹Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Pampa, Campus Uruguaiana, Brasil.

²Docente, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Pampa, Campus Uruguaiana, Brasil. *Autor para correspondência: Laboratório de Virologia, Curso de Medicina Veterinária, BR472, km 585, Caixa Postal 118, Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana, RS, Brasil, CEP 97.508-000. e-mail: mariobrum@unipampa.edu.br ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-1643-1126>

Resumo

A identificação da diversidade dos pestivírus bovinos circulantes é fundamental para a avaliação contínua das técnicas de diagnóstico e composição das vacinas. Neste artigo, foi realizada a caracterização genética e antigênica de doze pestivírus de bovinos isolados na região oeste do Rio Grande do Sul, Brasil. As amostras utilizadas foram isoladas a partir de soro fetal bovino ou de animais com apresentação clínica sugestivas de infecção viral. A caracterização genética foi realizada pelo sequenciamento e análise filogenética da região 5'UTR e permitiu a identificação de amostras classificadas como vírus da diarreia viral bovina (BVDV-1a, BVDV-1b e BVDV-2), não sendo identificado nenhum *Hobi-like* pestivírus (HoBiPeV). A reatividade dos isolados com um painel de anticorpos monoclonais para as proteínas do envelope demonstrou alta variabilidade antigênica entre os vírus. Assim sendo, confirma-se a presença ativa da infecção de pestivírus bovinos em rebanhos da fronteira oeste do RS, com alta variabilidade genética e antigênica. Isto demonstra a importância da contínua caracterização dos pestivírus que circulam nos rebanhos para manter atualizadas as medidas de diagnóstico e controle.

Palavras-chaves: BVDV, variabilidade, filogenia, anticorpos monoclonais.

Abstract

The identification of the bovine pestiviruses diversity present in the field is fundamental for the continuous evaluation of the techniques of diagnosis and vaccines composition. In this article we performed the genetic and antigenic characterization of twelve bovine pestiviruses isolated in the western region of Rio Grande do Sul, Brazil. The viruses were isolated from fetal bovine

serum or animals with clinical presentation suggestive of viral infection. Genetic characterization was performed by sequencing and phylogenetic analysis of the 5'UTR region and allowed the identification of samples classified as bovine viral diarrhea virus (BVDV-1a, BVDV-1b, BVDV-2). None HoBiPeV were identified. The reactivity of the isolates with a panel of monoclonal antibodies raised against envelope proteins demonstrated high antigenic variability among viruses. Thus, the active presence of bovine pestivirus infection, with high genetic and antigenic variability, in cattle on the western border of RS was confirmed. In summary, it was demonstrated the importance of continuous characterization of the pestiviruses circulating in the herds to keep the diagnostic and control measures up to date.

Keyword: BVDV, variability, phylogeny, monoclonal antibodies

Introdução

Os pestívirus bovinos são vírus associados com manifestações clínicas respiratórias, digestórias, hemorrágicas e perdas reprodutivas^{1,2}. A infecção por estes vírus possui distribuição mundial, sendo relacionada com importantes prejuízos econômicos e é alvo de programas de controle^{3,4}. No Brasil, o primeiro relato da presença deste agente foi no final da década de 1960 e desde então é sistematicamente identificado em diversas apresentações clínicas e epidemiológicas^{3,5-9}.

O grupo de pestívirus bovinos é formado pelos vírus da diarréia viral bovina 1 e 2 (BVDV-1 e -2) e os *Hobi-like Pestivirus* (HoBiPeV), que são três espécies distintas e pertencentes ao gênero *Pestivirus*, da família *Flaviviridae*¹⁰. O BVDV-1, BVDV-2 e HoBiPeV foram recentemente classificados como *Pestivirus A*, *B* e *H*, respectivamente¹⁰. Estes vírus são

envelopados e possuem genoma RNA fita simples, polaridade positiva, 12,3 Kb de comprimento, com uma única *open reading frame* (ORF) que contém duas regiões não traduzidas nas extremidades 5' e 3' (5' e 3'UTR, respectivamente)¹¹. A região 5'UTR é altamente conservada, e em associação com a N^{PRO} e E2, é usada para análise filogenética e classificação dos isolados em espécies e subtipos¹¹. Atualmente, o genótipo BVDV-1 é dividido em 21 subgenótipos (BVDV-1a - u), o BVDV-2 em quatro subgrupos (BVDV-2a - d) e existe indicativos de pelos menos quatro subgenótipos do HoBiPeV (HoBiPev-3a - d)¹²⁻¹⁴.

A glicoproteína E2 é a proteína mais abundante do envelope viral e apresenta uma região hipervariável responsável pela variabilidade antigênica observada entre os vírus. Esta característica faz com que os diferentes isolados possuam baixa reatividade sorológica cruzada, sendo rotineiramente comprovada em diversos estudos^{15,16}. A consequência da variabilidade genética e antigênica, associado com a possibilidade de surgimento de novas espécies, gera necessidade da avaliação permanente das amostras de pestivírus bovinos circulantes no campo, bem com atualização das técnicas de diagnóstico e das formulações vacinais^{3,8}. Dessa forma, este estudo avalia doze pestivírus de bovinos isolados na região oeste do Rio Grande do Sul, Brasil, com o intuito de investigar sua variabilidade genética e antigênica.

Material e Métodos

Células e Vírus: Todos os procedimentos de amplificação das cepas e amostras de pestivírus bovinos isolados foram realizados em células de linhagem de rim bovino (MDBK - *Madin-Darby bovine kidney*) livres de pestivírus. As células foram cultivadas em meio essencial mínimo (DMEM - *Dulbecco Minimum Essencial Medium*) (Vitrocell, Campinas, São Paulo, Brasil), suplementadas com 10% soro equino, antibiótico (gentamicina 50 µg/mL),

antifúngico (anfotericina B 1 µg/mL) e mantidas em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ à 37 °C.

Amostras de pestivírus bovino: Foram utilizados 12 pestivírus bovinos não-citopatogênicos pertencentes ao estoque do laboratório de virologia da UNIPAMPA. Dez vírus foram isolados de soro fetal bovino coletado entre os anos de 2011 e 2013 em frigoríficos no oeste do Rio Grande do Sul. As amostras LV14/15 e LV84/11 foram isoladas do sangue de um bezerro com crescimento retardado e de um animal com emagrecimento crônico, respectivamente. As amostras foram isoladas em cultivo celular, identificadas por imunofluorescência indireta e armazenadas em -80 °C.

Extração do RNA e RT-PCR: Células MDBK foram infectadas com os isolados, individualmente, em placas de 24 poços de polietileno. Após 72 horas, os sobrenadantes foram coletados e submetidos à extração de RNA com o auxílio de *TRIzol® Reagent* (Life Technologies, Carlsbad, CA) de acordo com instruções do fabricante. A síntese do cDNA foi realizado com o *kit GoScript Reverse Transcription Random Primers* (Promega, Madison, Wisconsin, EUA) e este utilizado como *template* para a amplificação da região 5'UTR pela reação em cadeia da polimerase (PCR). Para a PCR foi utilizado o set de *primers* HCV90-368 (Forw-CATGCCCATAGTAGGAC e Rev-CCATGTGCCATGTACAG)¹⁷. As condições de amplificação foram: 94 °C - 5 min, seguido de 35 ciclos de 94 °C – 30s, 50 °C – 30s, 72 °C – 30s e extensão final a 72 °C (7 min).

Sequenciamento e análise filogenética: Os produtos da PCR foram purificados com o *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen, Hilden, Alemanha) e enviados para ACTGene Análises Moleculares Ltda (Alvorada, Rio Grande do Sul, Brasil) para o sequenciamento. As sequências foram avaliadas, utilizando *forward* e *reverse* de cada isolado, e editadas utilizando o programa *BioEdit Sequence Alignment Editor Software suite*, versão 7.0.5.3

(<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>)¹⁸ para obtenção da sequência consenso. Estas foram submetidas ao *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)¹⁹ para comparação com sequências disponíveis no *GenBank* e classificação dos isolados quanto aos três genótipos dos pestivírus de bovinos, com base na região 5'UTR. O alinhamento das 12 sequências consenso e 35 sequências padrão foi realizado utilizando-se o programa *Clustal W*²⁰ contido no BioEdit. A análise filogenética dos isolados e cepas padrão foi realizada utilizando o programa *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA) versão X²¹ pelo método de *Neighbor-Joining*, modelo X, com valores de *bootstrap* calculados usando 1000 réplicas. Os números de acesso das sequências referência utilizadas na reconstrução filogenética estão na Figura 1.

Reatividade com anticorpos monoclonais: A variabilidade antigênica dos isolados foi determinada pela reatividade com 13 MAbs (anticorpos monoclonais) para as glicoproteínas E0, E1, E2, identificadas como as mais imunogênicas do BVDV^{22,23}. Para isso, células MDBK infectadas com cada isolado foram tripsinizadas, ressuspensas e depositadas em lâminas *multispot*, e após a adesão das células, estas foram fixadas com acetona. A reatividade de cada MAb em reconhecer os isolados foi realizada pela técnica de IFA (imunofluorescência indireta)²⁴. Os MAbs foram utilizados como anticorpos primários, e como anticorpo secundário um anti-IgG conjugado com fluoresceína da Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA). Como controle positivo e negativo utilizou-se as cepas padrão (BVDV-1 Singer, BVDV-2 VS253 e HoBiPeV SV757/15) e células não infectadas, respectivamente.

Resultados

A caracterização genética e antigênica demonstrou que os doze isolados são classificados no gênero *Pestivirus*, espécie vírus da diarreia viral bovina (BVDV) e que possuem ampla

variabilidade antigênica (Figura 1 e Tabela 1). A análise filogenética identificou dez amostras como BVDV-1 (83,3%) e dois vírus como BVDV-2 (16,7%). Entre os vírus classificados como BVDV-1, quatro pertencem ao subgenótipo BVDV-1a (4/12 – 33,3%) e seis são BVDV-1b (6/12 – 50%). Quanto às amostras compatíveis com BVDV-2, o isolado 17.02 foi agrupado ao subgenótipo 2b, enquanto que o 15.5 não foi possível classificar quanto ao seu genótipo (Figura 1).

A reatividade dos MAb's com os isolados permitiu confirmar a ampla variabilidade antigênica entre os BVDV's (Tabela 1). Nenhum MAb utilizado reconheceu 100% dos isolados. O nível de reatividade dos isolados com os MAb's variou entre 30,7 e 84,6%, reafirmando a ampla variabilidade entre os isolados. A variabilidade pode ser observada entre os isolados e as cepas padrão, bem como entre os diferentes genótipos.

Discussão

Os vírus isolados de soro fetal bovino e de animais com sinais clínicos foram classificados como pestivírus bovinos (BVDV-1 e BVDV-2) e confirmaram a existência da variabilidade genética e antigênica. Entre as amostras analisadas observa-se predominância da presença do BVDV-1 (10/12) em relação ao BVDV-2 (2/12). Apesar do número limitado de vírus avaliados, os achados são compatíveis com estudos que avaliaram a distribuição dos pestivírus bovinos de forma mais ampla e demonstram maior circulação do BVDV-1^{4,8,25}. Os subgenótipos BVDV-1a (4/10) e BVDV-1b (6/10) foram os dois identificados no presente estudo e refletem o que já foi demonstrado em outras regiões do país^{4,8,26}. A representatividade de genótipos de pestivírus bovinos circulantes em uma determinada região pode ser determinada quando são analisadas pelo menos 50 amostras de vírus⁴. O reduzido número de amostras avaliadas não pode ser considerado como representativo da região do oeste do Rio

Grande do Sul, porém sugerem a predominância destes dois genótipos e demonstram existência da infecção ativa de animais.

No presente estudo, foi possível determinar que o isolado 15.5 (SV817/12) pertence à espécie BVDV-2, sem que houvesse a classificação em subgenótipo. A dificuldade na determinação do subgenótipo também aconteceu com isolados do subgenótipo BVDV-2 em outros estudos^{8,9,4,8,26}. Para alguns isolados, somente a análise da região 5'UTR pode não ser suficiente para determinar o subgenótipo. Nestas situações, é necessário o sequenciamento de outras regiões do genoma, como as regiões N^{pro} e E2^{8,9,11,17}. Entre as amostras analisadas não identificado nenhum HoBiPeV, que compõem uma nova espécie de pestivírus bovino emergente e representam a menor parcela (< 20%) entre os três genótipos identificados no Brasil^{4,8,26}.

A análise do perfil antigênico realizado com os MAb's permitiu confirmar a variabilidade entre os isolados. As glicoproteínas do envelope E1 e E2 são responsáveis pela ligação do vírus aos receptores celulares, associadas com virulência, imunogênicas e induzem a produção de anticorpos neutralizantes. A variabilidade observada nestas proteínas interfere com a reatividade sorológica entre diferentes amostras virais, sendo associada com baixa reatividade e possíveis falhas vacinais^{27,28}. Portanto, o constante monitoramento das amostras circulantes no campo, associado com a atualização das amostras vacinais, são algumas das alternativas necessárias para garantir a eficácia vacinal e programas de controle^{29,30}.

A utilização de um único anticorpo monoclonal em testes de identificação e/ou no diagnóstico de pestivírus bovinos não é aconselhável, pois existe a possibilidade de resultado falso-negativo. Para estes casos, é aconselhável usar um *pool* de anticorpos monoclonais ou então anticorpos específicos para as regiões conservadas, como o caso da proteína não estrutural NS2/3, ou então anticorpos policlonais^{24,31}. Ainda, esta diversidade de origem genética também

possui reflexos no diagnóstico por PCR. Para esta situação, deve-se optar por um *set* de primer com capacidade de detectar o maior número de variantes em pequenas concentrações de material genético^{9,32}.

A presença de mais de um subtipo viral infectando um mesmo rebanho é uma possibilidade bastante reconhecida^{25,27}. A explicação para esse fenômeno são as constantes mutações e recombinações características dos pestivírus^{33,34} ou então pela introdução na propriedade de animais portando diferentes genótipos³. A diversidade genética é acompanhada da variabilidade antigênica das amostras. Em termos práticos, a diversidade genética e antigênica contribui para falhas vacinais, onde a sorologia cruzada entre amostras de genótipos distintos não é eficiente^{31,35}. Esta situação reforça que programas de controle e prevenção da infecção de pestivírus bovino devam seguir o princípio de identificação e remoção dos animais persistentemente infectados e utilizando vacinas eficazes.

Os pestivírus de bovinos são conhecidos pelas perdas produtivas e principalmente reprodutivas que geram prejuízos econômicos^{2,3}. Ao menos 1,3% (10/754) de amostras de soro fetal bovino analisadas estavam infectadas com o vírus. Não foi possível determinar a consequência desta infecção para o feto, no entanto, existe a possibilidade da ocorrência de má formação fetal, aborto ou nascimento de animais persistentes infectados². Outro aspecto importante é a utilização do soro fetal bovino contaminado na indústria de biológicos, inclusive vacinas. Também não pode ser descartada a possibilidade do vírus ser disseminado para outros países^{9,34}.

Conclusão

Os resultados permitem concluir que a infecção por pestivírus ocorre no rebanho da região oeste do Estado do Rio Grande do Sul. Existe tanto variabilidade genética quanto antigênica

entre os pestivírus isolados, sendo possível detectar duas espécies dos pestivírus de bovinos, não sendo nenhum compatível com HoBiPeV. Não foi possível classificar quanto ao seu subgenótipo um isolado classificado como BVDV-2. O número de amostras avaliadas é pequeno, porém corrobora com estudos mais amplos que analisam um maior número de amostra dos vírus circulantes. Além de reforçar a necessidade do monitoramento contínuo das amostras de campo auxiliando na adequação das vacinas comerciais e maior confiabilidade nos testes de diagnóstico.

Agradecimentos

I.M. Bolsista de mestrado da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). À Fundação de Apoio a Pesquisa do Rio Grande do Sul (ARD 10/0222-0) e à Pró-reitora de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação (PROPPI/UNIPAMPA) pelo suporte financeiro. Aos frigoríficos Frigoeste e Callegaro pela coleta das amostras de soro fetal bovino.

Declaração de Conflito de Interesse

Os autores declaram não possuir nenhum conflito de interesse.

Referências Bibliográficas

1. Baker JC. The clinical manifestations of bovine viral diarrhea infection. *The Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice*. 1995;11(3):425–445. doi:10.1016/S0749-0720(15)30460-6
2. Houe H. Epidemiology of bovine viral diarrhea virus. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 1995;11(3):521–547. doi:10.1016/S0749-0720(15)30465-5

3. Flores EF, Weiblen R, Vogel FSF, Roehle PM, Alfieri AA, Pituco EM. A infecção pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV) no Brasil: histórico, situação atual e perspectivas. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2005;25(3):125–134. doi:10.1590/S0100-736X2005000300002
4. Flores EF, Cargnelutti JF, Monteiro FL, Bauermann F V., Ridpath JF, Weiblen R. A genetic profile of bovine pestiviruses circulating in Brazil (1998–2018). *Animal Health Research Reviews*. 2018;19(02):134–141. doi:10.1017/S1466252318000130
5. Botton SA, Gil LHV, Silva AM da, et al. Caracterização preliminar de amostras do vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) isoladas no Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 1998;18(2):84–92. doi:10.1590/S0100-736X1998000200008
6. Dias FC, Alexandrino B, Medeiros ASR de, Pereira GT, Oliveira MC, Samara SI. 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*. 2010;40(4):913–920. doi:10.1590/S0103-84782010005000052
7. Vilcek S, Ridpath JF, Van Campen H, Cavender JL, Warg J. Characterization of a novel pestivirus originating from a pronghorn antelope. *Virus Research*. 2005;108(1–2):187–193. doi:10.1016/J.VIRUSRES.2004.09.010
8. Silveira S, Weber MN, Mósena ACS, et al. Genetic diversity of brazilian bovine pestiviruses detected between 1995 and 2014. *Transboundary and Emerging Diseases*. 2015;64(2):613–623. doi:10.1111/tbed.12427
9. Monteiro FL, Cargnelutti JF, Braunig P, et al. Detection and genetic identification of pestiviruses in Brazilian lots of fetal bovine serum collected from 2006 to 2014. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2018;38(3):387–392. doi:10.1590/1678-5150-pvb-5283
10. ICTV. Taxonomy: Family Flaviviridae. <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>. Published 2018. Acessado janeiro 14, 2019.
11. Pellerin C, Van Den Hurk J, Lecomte J, Tijssen P. Identification of a new group of bovine viral diarrhea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. *Virology*. 1994;203(2):260–268. doi:10.1006/VIRO.1994.1483
12. Giangaspero M, Harasawa R, Weber L, Belloli A. Genoepidemiological evaluation of bovine viral diarrhea virus 2 species based on secondary structures in the 5' untranslated region. *The Journal of Veterinary Medical Science*. 2008;70(6):571–580. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18628597>. Acessado janeiro 19, 2019.
13. Yeşilbağ K, Alpaya G, Becher P. Variability and global distribution of subgenotypes of bovine viral diarrhea virus. *Viruses*. 2017;9(6):128. doi:10.3390/v9060128
14. Giammarioli M, Ridpath JF, Rossi E, Bazzucchi M, Casciari C, De Mia GM. Genetic detection and characterization of emerging HoBi-like viruses in archival foetal bovine serum batches. *Biologicals*. 2015;43(4):220–224. doi:10.1016/j.biologicals.2015.05.009
15. Donis RO. Molecular biology of bovine viral diarrhea virus and its interactions with the host. *The Veterinary clinics of North America Food Animal Practice*. 1995;11(3):393–423. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8581855>. Acessado março 2, 2019.

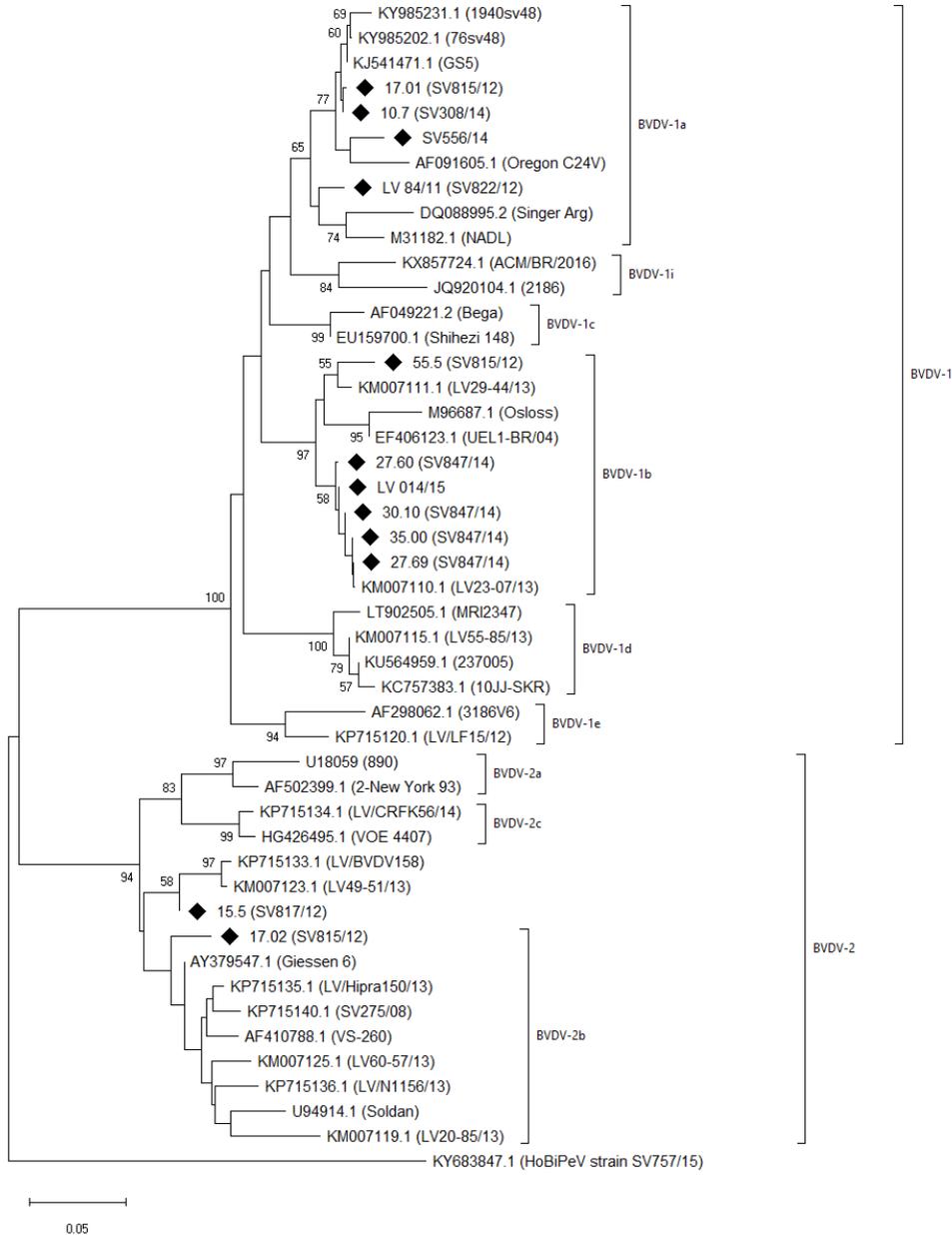
16. Ronecker S, Zimmer G, Herrler G, Greiser-Wilke I, Grummer B. Formation of bovine viral diarrhoea virus E1-E2 heterodimers is essential for virus entry and depends on charged residues in the transmembrane domains. *Journal of General Virology*. 2008;89(9):2114–2121. doi:10.1099/vir.0.2008/001792-0
17. Ridpath JF, Bolin SR, Dubovi EJ. Segregation of bovine viral diarrhoea virus into genotypes. *Virology*. 1994;205(1):66–74. doi:10.1006/viro.1994.1620
18. Hall TA. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 1999;41:95–98. <http://brownlab.mbio.ncsu.edu/jwb/papers/1999hall1.pdf>. Acessado fevereiro 11, 2019.
19. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*. 1997;25(17):3389–3402. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC146917/>.
20. Thompson J, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*. 1997;25(24):4876–4882. doi:10.1093/nar/25.24.4876
21. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*. 2011;28(10):2731–2739. doi:10.1093/molbev/msr121
22. Kreutz LC, Donis R, Gil LH V, et al. Production and characterization of monoclonal antibodies to Brazilian isolates of bovine viral diarrhoea virus. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2000;33(12). <https://pdfs.semanticscholar.org/f7be/40ab7899c6909d1b9375ae78622d9bcf33b3.pdf>. Acessado dezembro 14, 2018.
23. Corapi W V, Donis RO, Dubovi EJ. Characterization of a panel of monoclonal antibodies and their use in the study of the antigenic diversity of bovine viral diarrhoea virus. *American Journal of Veterinary Research*. 1990;51(9):1388–1394. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2168687>. Acessado janeiro 18, 2019.
24. Botton S a, Da-Silva a M, Brum MC, Weiblen R, Flores EF. Antigenic characterization of Brazilian bovine viral diarrhoea virus isolates by monoclonal antibodies and cross-neutralization. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 1998;31(11):1429–1438.
25. Weber MN, Silveira S, Machado G, et al. High frequency of bovine viral diarrhoea virus type 2 in Southern Brazil. *Virus Research*. 2014;191:117–124. doi:10.1016/J.VIRUSRES.2014.07.035
26. Bianchi E. Isolados brasileiros do vírus da diarréia. 2011:0–59.
27. Dezen S, Otonel RAA, Alfieri AF, Lunardi M, Alfieri AA. Perfil da infecção pelo vírus da diarréia viral bovina (BVDV) em um rebanho bovino leiteiro de alta produção e com programa de vacinação contra o BVDV. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2013;33(2):141–147. doi:10.1590/S0100-736X2013000200002

28. Otonel RAA, Alfieri AF, Dezen S, Lunardi M, Headley SA, Alfieri AA. The diversity of BVDV subgenotypes in a vaccinated dairy cattle herd in Brazil. *Tropical Animal Health and Production*. 2014;46(1):87–92. doi:10.1007/s11250-013-0451-y
29. Lima M De, Vogel FSF, Flores EF, Weiblen R. Anticorpos neutralizantes contra o vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV): comparação entre um imunógeno experimental atenuado e três vacinas comerciais inativadas. *Ciência Rural*. 2005;35(1):230–234. doi:10.1590/S0103-84782005000100039
30. Bolin SR. Control of bovine viral diarrhea infection by use of vaccination. *The Veterinary clinics of North America Food Animal Practice*. 1995;11(3):615–625. doi:10.1016/S0749-0720(15)30470-9
31. Bianchi E, Martins M, Weiblen R, Flores EF. Perfil genotípico e antigênico de amostras do vírus da diarréia viral bovina isoladas no Rio Grande do Sul (2000-2010). *Pesquisa Veterinaria Brasileira*. 2011;31(8):649–655. doi:10.1590/S0100-736X2011000800003
32. Giangaspero M, Harasawa R. Species characterization in the genus Pestivirus according to palindromic nucleotide substitutions in the 5'-untranslated region. *Journal of Virological Methods*. 2011;174(1–2):166–172. doi:10.1016/j.jviromet.2011.04.004
33. Ridpath JF. BVDV genotypes and biotypes: practical implications for diagnosis and control. *Biologicals*. 2003;31(2):127–131. doi:10.1016/S1045-1056(03)00028-9
34. Bauermann F V., Ridpath JF, Weiblen R, Flores EF. HoBi-like viruses: An emerging group of pestiviruses. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2013;25(1):6–15. doi:10.1177/1040638712473103
35. Fulton RW, Burge LJ. Bovine viral diarrhea virus types 1 and 2 antibody response in calves receiving modified live virus or inactivated vaccines. *Vaccine*. 2000;19(2–3):264–274. doi:10.1016/S0264-410X(00)00168-7

Tabela 1 - Perfil da reatividade sorológica dos isolados frente a um painel de MAbs específicos para glicoproteínas do envelope de pestivírus bovinos.

Isolados	Anticorpos monoclonais												
	3.D.8	6.F.11	19.F.9	F.11.4.8	20.G.7	31.C.4	18.D.4	7.1.8	6.D.11	10.F.9	32.B.3	2.D.5	6.C.5
17.01 (SV815/12)	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+
10.7 (SV308/14)	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-
SV 556/14	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+
LV 84/11 (SV822/12)	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+
55.5 (SV815/12)	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
27.60 (SV847/14)	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
LV 014/15	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-
30.10 (SV847/14)	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-
35.00 (SV847/14)	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-
27.69 (SV847/14)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-
15.5 (SV817/12)	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-
17.02 (SV815/12)	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+

Figura 1 – Análise filogenética construída pelo método de Neighbor-Joining, *Kimura 2 parameter*, com base na região 5'UTR de 12 sequências de nucleotídeos de isolados de pestivírus bovinos (◆; 411 posições). Somente valores de bootstrap (1000 réplicas) acima de 50% estão demonstrados



5. CAPÍTULO 2

Imunogenicidade de vacinas comerciais uruguaias para alfaherpesvírus bovino 1, 5 e pestívirus bovinos

Ingyrd Merchioratto¹, Alana de Almeida Aurélio², Janice Machado Villela¹, Nicole Vieira Stone², Isac Junior Roman¹, Carolina Kist Traesel³, Mário Celso Sperotto Brum³

Artigo a ser submetido ao periódico Ciência Rural, 2019.

¹Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Pampa, Campus Uruguaiana, Brasil.

²Bolsista Iniciação Científica, Laboratório de Virologia, Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Pampa, Campus Uruguaiana, Brasil.

³Docente, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Pampa, Campus Uruguaiana, Brasil. *Autor para correspondência: Laboratório de Virologia, Curso de Medicina Veterinária, BR472, km 585, Caixa Postal 118, Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana, RS, Brasil, CEP 97.508-000. e-mail: mariobrum@unipampa.edu.br ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-1643-1126>

Resumo

A resposta sorológica induzida por quatro vacinas comerciais uruguaias inativadas contra os alfa herpesvírus bovinos (BoHV-1 e -5) e pestivírus de bovinos (BVDV-1, BVDV-2 e HoBiPeV) foi avaliada em ovinos. Os animais foram imunizados duas vezes (dia 0 e dia 25) e o soro testado em diferentes intervalos (dias 0, 25, 40, 60 e 90) após a vacinação (PV). Dentre as quatro vacinas testadas, apenas uma (G4) apresentou títulos de anticorpos neutralizantes moderados para os BoHV-1 e -5, BVDV-1 e 2. A vacina G3 apresentou resposta somente para alfa herpesvírus bovinos. As vacinas G1 e G2 estimularam resposta somente em alguns animais vacinados. Para a vacina G4, observou-se que a resposta imunológica frente ao BoHV-1 e 5 foi semelhante e pelo menos 70% dos animais apresentaram níveis protetivos de anticorpos neutralizantes. Para os pestivírus bovinos, a vacina G4 estimulou resposta para o BVDV-2 mais elevada quando comparada com o BVDV-1, e quase que indetectável para HoBiPeV. O pico de anticorpos neutralizantes para o BoHV-1 foi observado no dia 40 PV e no dia 60 PV para o BVDV-1. Após isso, observou-se um decréscimo considerável na resposta de anticorpos neutralizantes. Os resultados demonstraram que vacinas comerciais uruguaias testadas não induziram resposta sorológica de magnitude e duração adequadas. Assim, ressalva-se a importância de rever periodicamente a formulação e composição das vacinas comerciais para alfa herpesvírus e pestivírus bovinos.

Palavras-chave: Sorologia, anticorpos neutralizantes, resposta vicinal, doenças reprodutivas.

Abstract

The serological response induced by four Uruguayan commercial inactivated vaccines against bovine alphaherpesvirus (BoHV-1 and -5) and bovine pestivirus (BVDV-1, BVDV-2 and HoBiPeV) was evaluated in sheep. The animals were immunized twice (day 0 and 25) and the

serum tested at different intervals (days 0, 25, 40, 60 and 90) pos-vaccination (PV). Among the four vaccines tested, only one (G4) had moderate neutralizing antibody titers for BoHV-1 and -5, BVDV-1 and 2. The G3 vaccine showed a neutralizing serological response only to bovine alphaherpesvirus. G1 and G2 vaccines produced a low and inconsistent response in only a few vaccinated animals. For the G4 vaccine, the immunological response to BoHV-1 and 5 was found to be similar and at least 70% of the animals had acceptable levels of neutralizing antibodies. For bovine pestiviruses, the G4 vaccine stimulated response to BVDV-2 higher when compared to BVDV-1 and baseline levels to HoBiPeV. The peak of neutralizing antibodies to BoHV-1 was observed on day 40 PV and day 60 PV for BVDV-1. Thereafter, a significant decrease in the neutralizing antibody response was observed. The results demonstrated that Uruguayan commercial vaccines tested did not induce a serological response of adequate magnitude and duration. Thus, it is important to periodically review the formulation and composition of the commercial vaccines for bovine alphaherpesvirus and pestivirus.

Keywords: Serology, neutralizing antibodies, vaccine response, reproductive disease

Introdução

A bovinocultura possui importância econômica em países do sul da América do Sul, especialmente para o Uruguai. O rebanho desta região é constituído por um número elevado de animais, diferentes raças, aptidões e formas de criação (GUARINO *et al.*, 2008; MAYA *et al.*, 2016). Os alfa herpesvírus bovino 1 e 5 (BoHV-1 e -5) e os pestivírus bovino (BVDVs) são agentes virais associados principalmente com perdas reprodutivas e respiratório (BAKER, 1995; SILVA *et al* 2007). Os BoHV-1 e BoHV-5 são duas espécies virais, classificados na família *Herpesviridae*, com similaridade genética e antigênica (DELHON *et al.*, 2003), caracterizada por reatividade sorológica heteróloga *in vitro* e *in vivo* (BRATANICH *et al.*,

1991; SILVA; BRUM; LORETO; *et al.*, 2007). Os pestívirus bovinos (BVDV 1, BVDV 2 e HoBiPeV) pertencem à família *Flaviridae*, com genoma RNA e caracterizados pela diversidade genética, antigênica e variável reatividade sorológica (BAUERMANN *et al.*, 2013). No início dos anos 2000, um pestívirus atípico foi identificado e denominado de Hobi-like vírus (SCHIRRMEIER *et al.*, 2004). Posteriormente, diversos outros vírus foram recuperados de amostras clínicas e concluiu-se que formavam um grupo emergente de pestívirus bovino, identificado como HoBiPev (BAUERMANN *et al.*, 2013).

Os BoHVs e os pestívirus bovinos estão disseminados no rebanho bovino uruguaio e produzem perdas significativas na produção de leite e carne (GUARINO *et al.*, 2008; MAYA *et al.*, 2016; SILVA; BRUM; WEIBLEN, R; *et al.*, 2007). As formas de controle e prevenção destes vírus tem como base a identificação da presença do agente na propriedade, eliminação dos reservatórios e adoção de medidas que reduzam a disseminação no rebanho. A vacinação é utilizada pelos produtores com o objetivo de proteção clínica, controle das perdas reprodutivas e para reduzir a circulação viral no rebanho (ACKERMANN; ENGELS, 2006; FULTON, 2015; NEWCOMER; CHAMORRO; WALZ, 2017).

A produção das vacinas para BoHV-1 e BoHV-5 e pestívirus bovinos não é padronizada, o que possibilita a elaboração de imunógenos com diferenças na composição de cepas e adjuvantes (SILVA; DIEL; CILENTO; *et al.*, 2007). A avaliação de vacinas comerciais já demonstrou diferenças de imunogenicidade, inclusive com a indicação de que algumas não induzem reposta imune adequada (ANZILIERO *et al.*, 2015; FULTON; BURGE, 2000; SILVA; DIEL; CILENTO; *et al.*, 2007; VOGEL; FLORES; WEIBLEN; KUNRATH, 2002). O presente trabalho teve como objetivo avaliar a resposta sorológica de quatro vacinas comerciais uruguaias frente aos vírus BoHV-1, BoHV-5, BVDV-1 e BVDV-2 e HoBiPeV, utilizando ovelhas como modelo experimental.

Material e Métodos

Imunização dos animais

A imunogenicidade de quatro vacinas comerciais uruguaias (G1, G2, G3 e G4) para a prevenção de doenças reprodutivas em bovinos foi avaliada. Para isso, foram utilizados 38 ovinos da raça Ideal, fêmeas, adultas, livres de anticorpos para alfa herpesvírus bovino 1 e 5 e para pestivírus bovinos. Os animais foram distribuídos de forma aleatória em quatro grupos e permaneceram em pastagens naturais. Todos os procedimentos de vacinação e coleta de soro seguiram as recomendações do Comitê de Estudo e Uso de Animais, Universidade Federal do Pampa (CEUA/UNIPAMPA, registro #008/2017). As ovelhas foram imunizadas de acordo com as recomendações dos fabricantes. O momento da primeira imunização foi considerado como sendo dia 0 e o reforço vacinal administrado no dia 25 pós-vacinação (PV). Nos dias 0, 25, 40, 60 e 90 PV coletou-se soro para a avaliação da resposta sorológica.

Vírus Neutralização

As amostras de soro foram inativadas em banho-maria à 56 °C por 30 minutos e posteriormente submetidas à técnica de vírus neutralização em microplacas de 96 cavidades. Brevemente, as amostras de soro coletadas em cada *time-point* foram diluídas e testadas frente a 100 – 200 doses infectantes para 50% do cultivo celular (TCID₅₀) da amostra BoHV-1 Cooper (1:2 até 1:256) e do BVDV 1 Singer (1:5 até 1:320), segundo descrito por Anziliero et al. (2015). Após isso, células da linhagem MDBK (*Madin Darby bovine kidney*), livres de pestivírus e mantidas com soro equino, foram adicionadas e as placas incubadas por 96 horas até a realização da leitura final. O título de anticorpos neutralizantes foi considerado como sendo a recíproca da maior diluição capaz de inibir a replicação do vírus evidenciada pela ausência da formação do efeito citopático. Os títulos médios de anticorpos foram transformados em título médios geométricos (GMT) (THRUSFIELD, Michael, 2004). A reatividade cruzada do soro das ovelhas vacinadas foi testada frente ao BoHV-5 (SV 507/99), BVDV-2 (VS253) e

HoBiPeV (SV757/15). Para isso foram selecionadas as amostras dos dias pós vacinação com os maiores níveis de anticorpos para o BoHV-1 e BVDV-1. As cepas virais utilizadas foram gentilmente cedidas pelo Setor de Virologia, Universidade Federal de Santa Maria (SV/UFSM).

Resultados

Os resultados da avaliação da imunogenicidade de quatro vacinas comerciais estão resumidos na Figura 1 e Tabela 1. A Figura 1 demonstra a curva da resposta imune observada para o BoHV-1 (cepa Cooper) e para o BVDV-1 (cepa Singer). A reatividade cruzada foi avaliada com as amostras de soro do dia 40 PV para o BoHV-5 (cepa SV 507/99) e do dia 60 PV para o BVDV-2 (VS 253) e HoBiPeV (SV 757/15), pois nestes dias foi detectado o nível máximo de neutralização para os BoHV-1 e BVDV-1, respectivamente (Tabela 1). Entre as quatro vacinas testadas, a G4 foi a mais imunogênica frente ao BoHV-1 e ao BVDV-1. A vacina G3 produziu resposta consistente somente para os alfaherpesvírus bovinos. As vacinas G1 e G2 estimularam resposta imune baixa, inconsistente e perceptível somente em alguns animais vacinados.

Para o BoHV-1, no dia 25 PV todos os animais vacinados com a vacina G4 possuíam anticorpos neutralizantes e estes níveis aumentaram após a administração da segunda dose. O mesmo padrão de resposta foi observado para a vacina G3, porém em níveis inferiores. O pico de anticorpos foi detectado no dia 40 PV e após isso se observou um decréscimo até a última avaliação no dia 90 PV. No dia 40 PV as vacinas G1 e G2 estimularam resposta em apenas 50% dos animais, porém os anticorpos reduziram a níveis mínimos nas outras duas avaliações (Figura 1). A avaliação sorológica frente ao BoHV-5 demonstrou um padrão de reatividade semelhante ao observado para o BoHV-1 (Tabela 1).

Quando avaliada a imunogenicidade das vacinas frente ao BVDV-1, novamente somente a vacina G4 produziu resposta sorológica detectável de forma consistente (Figura 1). Para a

vacina G4, no dia 25 PV, cinco animais possuíam anticorpos neutralizantes. Após a segunda dose, todos os animais desenvolveram uma resposta secundária que atingiu o nível máximo no dia 60 PV, e um decréscimo marcante nos níveis de anticorpos no dia 90 PV. As vacinas G1, G2 e G3 não produziram resposta imune consistente nos animais para o BVDV-1 e somente em cinco animais foi possível detectar a presença de anticorpos neutralizantes em títulos baixos (= 5) para o BVDV-2 e HoBiPeV. O soro dos animais vacinados com a vacina G4 e coletados no dia 60 PV demonstraram maior reatividade frente ao BVDV-2 (Tabela 1) e somente dois animais reagiram frente à amostra de HoBiPeV porém com baixos títulos (= 5).

Discussão

A avaliação sorológica dos animais imunizados com quatro vacinas comerciais uruguaias (G1, G2, G3 e G4) demonstraram ampla variação entre as respostas imunes induzidas. Todos os soros coletados foram testados para o BoHV-1 (cepa Cooper) e BVDV-1 (cepa Singer) (Figura 1). Para avaliar a neutralização cruzada frente aos vírus BoHV-5, BVDV-2 e HoBiPeV foi selecionado o dia pós-vacinação que os animais apresentaram os níveis mais elevados de anticorpos neutralizantes. A vacina G4 estimulou níveis de anticorpos neutralizantes para o BoHV-1, BoHV-5 e BVDV-1 e BVDV-2 em 100% dos animais vacinados e com maior intensidade em comparação com as outras três vacinas. A vacina G3 induziu anticorpos neutralizantes somente para BoHV-1 e BoHV-5. As vacinas G1 e G2 estimularam resposta sorológica fraca e inconsistente em poucos animais somente para os alfa herpesvírus bovinos. Estas duas vacinas estimularam anticorpos neutralizantes somente em alguns animais e em títulos mínimos (5) para os pestivírus bovinos testados. O comportamento das vacinas avaliadas é similar ao observado em outros estudos, que também detectaram níveis mais elevados de resposta imune para os alfa herpesvírus bovino, quando comparado com os pestivírus bovinos (ANZILIERO *et al*, 2015; SILVA *et al*, 2007; VOGEL *et al* 2002).

A variação observada entre os imunógenos pode estar associada com a falta de parâmetros objetivos para produção de vacina, deficiência no controle da qualidade e/ou uso de adjuvantes ineficientes (SILVA; DIEL; CILENTO; *et al.*, 2007). Outro fator que afeta negativamente a imunogenicidade é a conservação inadequada. As vacinas foram adquiridas de revendedores locais, mantidas sob refrigeração (2 a 8 °C) até o momento da administração, porém não se pode excluir problemas de conservação anteriores a aquisição. Com relação ao modelo experimental utilizado, ovinos podem não refletir o comportamento exato que a vacina teria em bovinos. No entanto, os ovinos tem sido usados para esta finalidade e os resultados refletem um padrão aproximado da resposta que ocorrerá em bovinos, inclusive em relação a testes de proteção vacinal (VOGEL *et al.*, 2001). Outro ponto a ser considerado é que após o dia 60 PV houve uma marcada redução dos níveis de anticorpos neutralizantes (Figura 1). Desta forma, o declínio na resposta imune observado sugere a necessidade de redução do intervalo de aplicação do reforço.

Os animais vacinados com G3 e G4 desenvolveram resposta sorológica em maior magnitude para os alfa herpesvírus bovinos quando comparado com pestivírus bovinos. Para as outras duas vacinas (G1 e G2) a resposta foi de baixa magnitude e em pouco animais, o que prejudica a realização de análise mais detalhada. Níveis de anticorpos neutralizantes ≥ 8 para os BoHVs são associados com proteção (ANZILIERO *et al.*, 2015). A vacina G4 produziu anticorpos neutralizantes para o BoHV-1 com títulos entre 4 e 16 (GMT 3,48) em 70% dos animais após a aplicação da primeira dose. Após o reforço, 100% dos animais soroconverteram com níveis entre 8 e 128 (GMT 32) no dia 40 PV, seguido de redução até GMT 11,3 no dia 90 PV. Para a vacina G3, somente foi possível detectar resposta nos dias 40 e 60 PV em 100% dos animais, porém com títulos variando entre 4 e 16. Avaliações prévias de vacinas comercializadas no Brasil, Argentina e Uruguai já demonstraram variações na imunogenicidade (ANZILIERO *et al.*, 2015; SILVA; WEIBLEN; FLORES, 2007; VOGEL; FLORES;

WEIBLEN; KUNRATH, 2002). Isto sugere a necessidade constante da avaliação periódica e revisão do processo de produção por parte dos laboratórios.

A resposta anti-BoHV-5 induzida pelas quatro vacinas seguiu padrão similar ao observado para o BoHV-1, porém com GMT inferior. O BoHV-5 e BoHV-1 são antigenicamente semelhantes e isto confere reatividade sorológica cruzada *in vitro* e *in vivo*, inclusive com proteção cruzada (ANZILIERO *et al.*, 2011; BRATANICH *et al.*, 1991; SILVA; BRUM; LORETO; *et al.*, 2007; TRAESEL *et al.*, 2015). Os BoHV-1 e BoHV-5 estão presentes no rebanho do Uruguai e pelo menos três vacinas (G1, G2 e G4) possuem ambos os vírus na sua composição. Assim como para o BoHV-1, a vacina G4 foi a que estimulou níveis mais elevados de anticorpos anti-BoHV-5.

Com relação à resposta frente aos pestivírus bovinos os resultados são mais desanimadores. Somente a vacina G4 induziu resposta imune detectável de forma consistente e de magnitude moderada para o BVDV-1 e BVDV-2. O nível máximo da resposta de anticorpos neutralizantes foi observado no dia 60 PV e posteriormente houve um declínio acentuado (dia 90 PV). Esta característica demonstra que houve estímulo imunogênico vacinal de pouca intensidade (Figura 1). A avaliação da reatividade cruzada no dia 60 PV demonstrou maior resposta anti-BVDV-2 quando comparado com o BVDV-1 e HoBiPeV. A reatividade para o HoBiPeV observada em dois animais pode ser considerada como sorologia cruzada, pelo fato da vacina G4 possuir somente cepas de BVDV-1 e BVDV-2. As vacinas G1, G2 e G3 estimularam anticorpos neutralizantes em poucos animais vacinados e com títulos mínimos. A baixa imunogenicidade das vacinas comerciais para o BVDV é um fato alarmante e já demonstrado anteriormente (ANZILIERO *et al.*, 2015; VOGEL *et al.*, 2001; VOGEL; FLORES; WEIBLEN; MAYER; *et al.*, 2002). A causa disto pode estar associada com a variabilidade dos imunógenos, concentração de antígeno e tipo de adjuvante presente na vacina (FULTON, 2015).

A proteção clínica para o BVDV está relacionada com títulos de anticorpos neutralizantes acima de 80 e 160 (FULTON; BURGE, 2000). Níveis de anticorpos neutralizantes iguais ou superiores a 80 foram observados somente em uma parcela de animais vacinados com G4 entre os dias 40 e 60 PV, frente ao BVDV-1 e BVDV-2 (Figura 1 e Tabela 1). Esses dados sugerem que somente uma porcentagem dos animais estaria protegida em casos de desafio ao vírus de campo. A associação da baixa imunogenicidade com a variabilidade antigênica marcada do pestivírus bovinos são situações que contribuem com falhas vacinais (NEWCOMER; CHAMORRO; WALZ, 2017; VOGEL *et al.*, 2001).

O controle das perdas reprodutivas e produtivas causadas pelos alfa herpesvírus e pestivírus bovinos é um objetivo de produtores e técnicos. A maior demanda por vacinas deve ser acompanhada pela introdução de programas periódicos para avaliar a imunogenicidade das cepas vacinais, detecção de variantes virais circulantes nos rebanhos e adequação dos adjuvantes utilizados (FULTON, 2015; NEWCOMER; CHAMORRO; WALZ, 2017). A utilização de vacinas replicativas (vivas) também é um aspecto que deve ser considerado, pois estimulam o sistema imune de forma mais ampla e prolongada quando comparada com as vacinas não replicativas (inativadas). No entanto, a utilização de vacinas replicativas deve ser mais criteriosa, pois podem produzir imunossupressão ou perdas gestacionais (FULTON; BURGE, 2000).

Conclusão

Os resultados permitem concluir que as vacinas comerciais uruguaias testadas produziram resposta sorológica variável. Somente uma vacina (G4) induziu títulos moderados de anticorpos neutralizantes para BoHV-1, BoHV-5, BVDV-1 e BVDV-2. A vacina G3 estimulou resposta somente para os alfa herpesvírus. As vacinas G1 e G2 estimularam anticorpos neutralizantes em níveis baixos ou indetectáveis. Nenhuma das quatro vacinas estimulou resposta para o HoBiPeV, considerado um pestivírus emergente na América do Sul. Toda a resposta imune

produzida nos animais vacinados foi de curta duração. Assim sendo, nenhuma vacina testada é indicada para a utilização em programas de controle em rebanhos. Ainda, existe a necessidade urgente da reavaliação da formulação e composição das vacinas comerciais, bem como a repetição destes testes de forma periódica e continuada.

Agradecimentos

I.M. bolsista de mestrado da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). A Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO) por disponibilizar os animais utilizados no estudo.

Declaração de Conflito de Interesse

Os autores não possuem conflitos de interesse.

Comitê de Ética

Todos os procedimentos de vacinação e coleta de soro seguiram as recomendações do Comitê de Estudo e Uso de Animais, Universidade Federal do Pampa (CEUA/UNIPAMPA, registro #008/2017).

Referências Bibliográficas

ACKERMANN, M.; ENGELS, M. Pro and contra IBR-eradication. **Veterinary Microbiology**, mar. 2006. v. 113, n. 3–4, p. 293–302. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378113505003780>>. Acesso em: 7 jan. 2019.

ANZILIERO, D. *et al.* A recombinant bovine herpesvirus 5 defective in thymidine kinase and glycoprotein E is immunogenic for calves and confers protection upon homologous challenge and BoHV-1 challenge. **Veterinary Microbiology**, 29 dez. 2011. v. 154, n. 1–2, p. 14–22. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037811351100174X?via%3Dihub>>. Acesso em: 29 jan. 2019.

ANZILIERO, D. *et al.* Resposta sorológica aos herpesvirus bovino tipos 1 e 5 e vírus da diarreia viral bovina induzida por vacinas comerciais. **Ciência Rural**, jan. 2015. v. 45, n. 1, p. 58–63. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782015000100058&lng=pt&tlng=pt>. Acesso em: 30 out. 2018.

BAUERMANN, F. V. *et al.* HoBi-like viruses: an emerging group of pestiviruses. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, 2013. v. 25, n. 1, p. 6–15.

BRATANICH, A. C. *et al.* Comparative Studies of BHV-1 variants by in vivo - in vitro tests. **Journal of Veterinary Medicine, Series B**, 12 jan. 1991. v. 38, n. 1–10, p. 41–48. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1439-0450.1991.tb00844.x>>. Acesso em: 10 jan. 2019.

DELHON, G. *et al.* Genome of bovine herpesvirus 5. **Journal of Virology**, out. 2003. v. 77, n. 19, p. 10339–47. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12970418>>. Acesso em: 30 jan. 2019.

FULTON, R. W. Impact of species and subgenotypes of bovine viral diarrhoea virus on control by vaccination. **Animal Health Research Reviews**, 8 jun. 2015. v. 16, n. 01, p. 40–54. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S1466252315000079/type/journal_article>. Acesso em: 8 jan. 2019.

_____; BURGE, L. J. Bovine viral diarrhoea virus types 1 and 2 antibody response in calves receiving modified live virus or inactivated vaccines. **Vaccine**, 2000. v. 19, n. 2–3, p. 264–274.

GUARINO, H. *et al.* Prevalence of serum antibodies to bovine herpesvirus-1 and bovine viral diarrhoea virus in beef cattle in Uruguay. **Preventive Veterinary Medicine**, 15 jun. 2008. v. 85, n. 1–2, p. 34–40. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167587708000032>>. Acesso em: 7 jan. 2019.

MAYA, L. *et al.* Molecular diversity of bovine viral diarrhoea virus in Uruguay. **Archives of Virology**, 23 mar. 2016. v. 161, n. 3, p. 529–535. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26597189>>. Acesso em: 8 jan. 2019.

NEWCOMER, B. W.; CHAMORRO, M. F.; WALZ, P. H. Vaccination of cattle against bovine viral diarrhoea virus. **Veterinary Microbiology**, jul. 2017. v. 206, p. 78–83. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28400145>>. Acesso em: 10 jan. 2019.

SCHIRRMEIER, H. *et al.* Genetic and antigenic characterization of an atypical pestivirus

isolate, a putative member of a novel pestivirus species. **Journal of General Virology**, 2004. v. 85, n. 12, p. 3647–3652.

SILVA, L. F.; DIEHL, D. G.; CILENTO, M. C.; *et al.* Cobaias como modelo para teste de vacinas inativadas contra o herpesvírus bovino tipo 1 e o vírus da diarreia viral bovina. **Ciência Rural**, ago. 2007. v. 37, n. 4, p. 1060–1065. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782007000400023&lng=pt&tlng=pt>. Acesso em: 30 out. 2018.

_____; WEIBLEN, R.; FLORES, E. F. Imunogenicidade de vacinas comerciais inativadas contra o herpesvírus bovino tipo 1. **Ciência Rural**, out. 2007. v. 37, n. 5, p. 1471–1474. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782007000500042&lng=pt&tlng=pt>. Acesso em: 8 jan. 2019.

SILVA, M. S.; BRUM, M. C. S.; WEIBLEN, R.; *et al.* Identificação e diferenciação de herpesvírus bovino tipos 1 e 5 isolados de amostras clínicas no Centro-Sul do Brasil, Argentina e Uruguai (1987-2006). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, out. 2007. v. 27, n. 10, p. 403–408. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2007001000003&lng=pt&tlng=pt>. Acesso em: 7 jan. 2019.

SILVA, M. S.; BRUM, M. C. S.; LORETO, E. L. S.; *et al.* Molecular and antigenic characterization of Brazilian bovine herpesvirus type 1 isolates recovered from the brain of cattle with neurological disease. **Virus Research**, nov. 2007. v. 129, n. 2, p. 191–199. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17822796>>. Acesso em: 2 mar. 2019.

THRUSFIELD, M. Testes de Diagnóstico. In: THRUSFIELD, M. (Org.). **Epidemiologia Veterinária**. 2ed. ed. São Paulo: [s.n.], 2004, p. 3324–346.

TRAESEL, C. K. *et al.* Sequence analysis of the 5' third of glycoprotein C gene of South American bovine herpesviruses 1 and 5. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, maio. 2015. v. 48, n. 5, p. 470–8. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25760029>>. Acesso em: 7 fev. 2019.

VOGEL, F. S. F. *et al.* Resposta sorológica e avaliação de proteção fetal em ovelhas prenhes vacinadas contra o vírus da diarreia viral bovina (BVDV). **Ciência Rural**, out. 2001. v. 31, n. 5, p. 831–838. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782001000500015&lng=pt&tlng=pt>. Acesso em: 17 dez. 2018.

_____; FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; MAYER, S. V.; *et al.* Magnitude, duração e especificidade da resposta sorológica em bovinos vacinados contra o vírus da diarreia viral bovina (BVDV). **Ciência Rural**, fev. 2002. v. 32, n. 1, p. 83–89. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782002000100015&lng=pt&tlng=pt>. Acesso em: 30 jan. 2019.

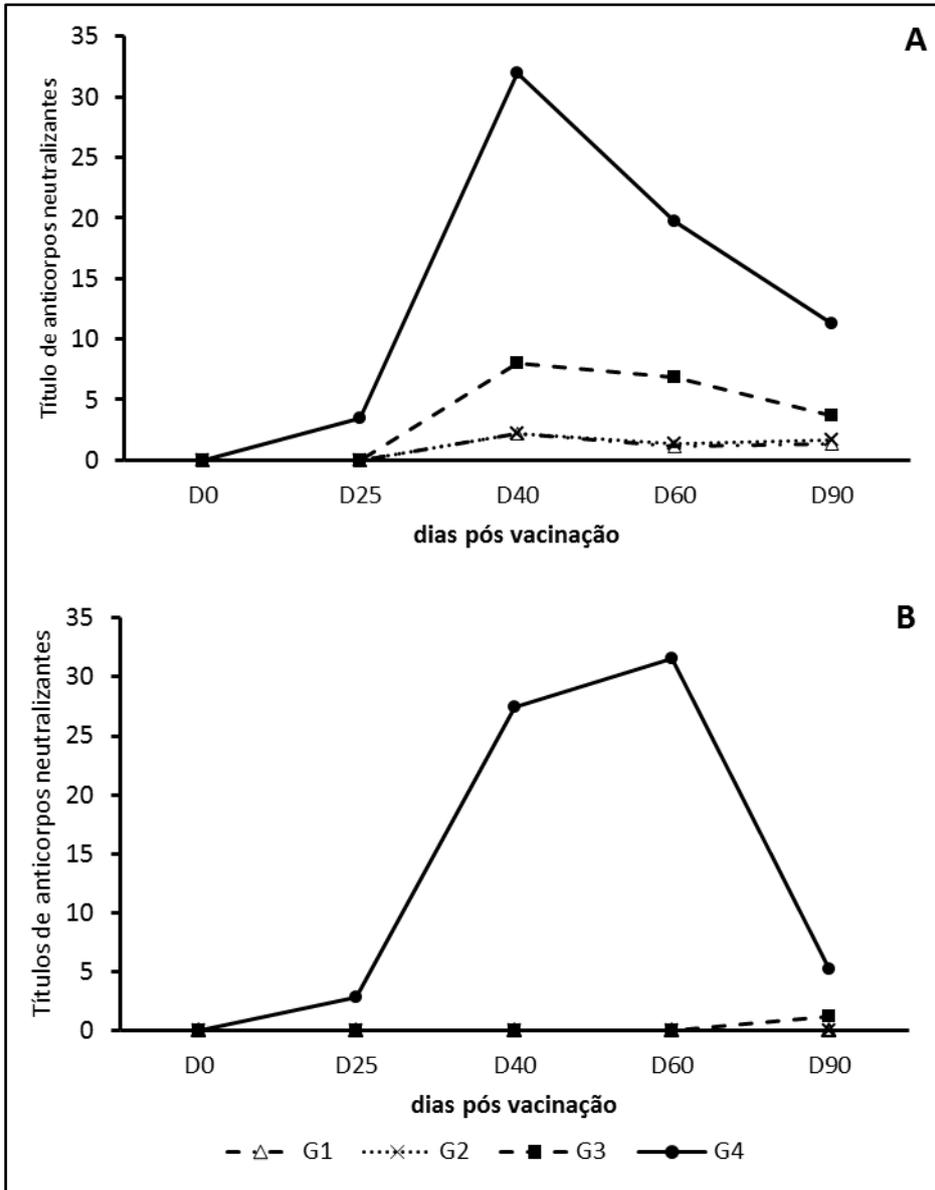
_____; FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; KUNRATH, C. F. Atividade neutralizante anti-herpesvírus bovino tipos 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5) no soro de bovinos imunizados com vacinas contra o BHV-1. **Ciência Rural**, out. 2002. v. 32, n. 5, p. 881–883. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782002000500022&lng=pt&tlng=pt>. Acesso em: 8 jan. 2019.

Tabela 1 – Reatividade sorológica para o alfaherpesvírus bovino (BoHV) 1 e 5 (40 DPV) e vírus da diarreia viral bovina (BVDV) 1, 2 e HoBiPev (60 DPV) de ovinos imunizados com quatro vacinas comerciais uruguaias.

<i>Sorologia cruzada anti-BoHV dia 40 PV</i>							
<i>Grupo</i>	<i>Imunizados</i>	<i>BoHV-1</i>		<i>BoHV-5</i>			
		<i>Reagentes</i>	<i>GMT</i>	<i>Reagentes</i>	<i>GMT</i>		
G1	8	4	2,2	1		1,3	
G2	10	5	2,1	7		3,7	
G3	9	9	8	5		2,7	
G4	10	10	32	10		9,2	

<i>Sorologia cruzada anti-BVDV dia 60 PV</i>							
<i>Grupo</i>	<i>Imunizados</i>	<i>BVDV 1</i>		<i>BVDV 2</i>		<i>HoBiPev</i>	
		<i>Reagentes</i>	<i>GMT</i>	<i>Reagentes</i>	<i>GMT</i>	<i>Reagentes</i>	<i>GMT</i>
G1	8	0	0	0	0	2	1,4
G2	10	0	0	1	1,2	0	0
G3	9	0	0	0	0	2	1,4
G4	10	10	31,6	10	120,2	2	1,4

Figura 1 – Resposta sorológica de ovinos imunizados com quatro diferentes vacinas comerciais para o herpesvírus bovino 1 (BoHV-1, cepa Cooper) (A) e vírus da diarreia viral bovina 1 (BVDV-1, cepa Singer) (B) de origem uruguaia, entre os dias 0 e 90 pós vacinação.



6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os pestivírus de bovinos são um dos agentes infecciosos responsáveis por produzir perdas produtivas e reprodutivas em bovinos e acarretam grandes prejuízos econômicos. Estes vírus são reconhecidos por apresentar grande variabilidade genética e antigênica. Assim, esta situação demonstra a importância de estudos periódicos para monitorar o cenário da infecção no rebanho bovino, como feito pelo presente estudo.

Os pestivírus são vírus com genoma RNA que são passíveis de mutações e recombinações, favorecendo o surgimento de novas variantes. A variabilidade antigênica é diretamente relacionada com a hipervariabilidade da glicoproteína E2. Esta proteína é encontrada em abundância no envelope viral e estimula a produção de anticorpos neutralizantes no hospedeiro. Assim, a variabilidade antigênica é uma estratégia do vírus para escapar dos mecanismos de defesa do hospedeiro. A realização do estudo da caracterização dos pestivírus isolados em bovinos possibilitou demonstrar que as variabilidades genéticas e antigênicas estão presentes nos vírus.

Atualmente a vacinação contra os pestivírus bovinos não é obrigatória, no Brasil dados indicam que $\leq 5\%$ do rebanho nacional é vacinado, enquanto que no Uruguai estima-se que cerca de 3% do rebanho é vacinado. Cabe ressaltar que estudos com vacinas comerciais que avaliaram a resposta sorológica de animais imunizados demonstram baixa eficiência, inclusive sugerindo falha de proteção em casos de exposição ao vírus. Ainda tem sido demonstrado a circulação de BVDV tipo 1 e 2, além do HoBiPeV, sendo esse considerado emergente em várias regiões do mundo. Embora os estudos comprovem a circulação das três espécies de pestivírus de bovinos em diversos países, as vacinas comercializadas apresentam em sua composição apenas as variantes BVDV-1 e BVDV-2. Considerando que esses vírus apresentam baixa reatividade cruzada, a maioria das vacinas utilizam cepas americanas e europeias, não sendo representativo dos vírus que circulam no rebanho, além do que os animais mesmo que vacinados não apresentarão resposta sorológica frente ao HoBiPeV. O estudo realizado avaliando a imunogenicidade de quatro vacinas comerciais uruguayas comprova a baixa imunogenicidade das vacinas testadas e sugerem possíveis falhas vacinais.

Assim sendo, o presente estudo juntamente dos estudos já realizados sobre caracterização e avaliação de vacinas comerciais exibem a importância de trabalhos contínuos de caracterização genética e antigênica. Estes têm como objetivo monitorar os vírus que circulam no rebanho, e assim adequar as técnicas de diagnóstico tornando-as mais eficientes e confiáveis. Além de auxiliar os laboratórios a reformular e atualizar as vacinas comerciais afim de oferecer

maior cobertura vacinal, melhorar a resposta sorológicas dos animais e atuar com maior eficiência no controle da infecção.

7. REFERÊNCIAS

- ANZILIERO, D. et al. Resposta sorológica aos herpesvirus bovino tipos 1 e 5 e vírus da diarreia viral bovina induzida por vacinas comerciais. **Ciência Rural**, v. 45, n. 1, p. 58–63, jan. 2015.
- ARENHART, S. et al. Excreção e transmissão do vírus da diarreia viral bovina por bezerros persistentemente infectados. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 9, p. 736–742, 2009.
- BAKER, J. C. The clinical manifestations of bovine viral diarrhea infection. **The Veterinary clinics of North America. Food animal practice**, v. 11, n. 3, p. 425–445, 1995.
- BAUERMAN, F. V. et al. HoBi-like viruses. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 25, n. 1, p. 6–15, 23 jan. 2013.
- BECHER, P. et al. Genetic and antigenic characterization of novel pestivirus genotypes: Implications for classification. **Virology**, v. 311, n. 1, p. 96–104, 2003.
- BIANCHI, E. Caracterização genética e antigênica de isolados brasileiros do vírus da diarreia. Dissertação de Mestrado- **Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária UFMS** p. 0–59, 2011.
- BOLIN, S. R. Control of bovine viral diarrhea infection by use of vaccination. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, v. 11, n. 3, p. 615–625, 1995.
- BOTTON, S. A. et al. Caracterização preliminar de amostras do vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) isoladas no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 18, n. 2, p. 84–92, abr. 1998a.
- BOTTON, S. A. et al. Antigenic characterization of Brazilian bovine viral diarrhea virus isolates by monoclonal antibodies and cross-neutralization. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, n. 11, p. 1429–1438, 1998b.
- BROWNLIE, J. The pathogenesis of bovine virus diarrhoea virus infections. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v. 9, n. 1, p. 43–59, 1990.
- CANAL, C. W. et al. Detection of antibodies to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and characterization of genomes of BVDV from Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 63, n. 2–4, p. 85–97, out. 1998.
- DEZEN, S. et al. Perfil da infecção pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV) em um rebanho bovino leiteiro de alta produção e com programa de vacinação contra o BVDV. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 2, p. 141–147, 2013.
- DIAS, F. C. et al. 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**, v. 40, n. 4, p. 913–920, 16 abr. 2010.
- DIAS, R. K. et al. Antigenic diversity of Brazilian isolates of HoBi-like pestiviruses. **Veterinary Microbiology**, v. 203, p. 221–228, 2017.
- DONIS, R. O. Molecular biology of bovine viral diarrhea virus and its interactions with the host. **The Veterinary clinics of North America. Food animal practice**, v. 11, n. 3, p. 393–423, nov. 1995.

FINO, T. C. M. et al. Diarréia bovina a vírus (bvd) - uma breve revisão. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 34, n. 2, p. 131–140, 2012.

FLORES, E. F. et al. Identificação do vírus da Diarréia Viral Bovina tipo 2 (BVDV-2) no sul do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, n. 2, p. 85–89, jun. 2000.

FLORES, E. F. et al. A infecção pelo vírus da diarréia viral bovina (BVDV) no Brasil: histórico, situação atual e perspectivas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, n. 3, p. 125–134, set. 2005.

FLORES, E. F.; SCHUCH, L. F. D. Diarreia viral bovina. In: **Doença de Ruminantes e Equídeos**. 3ed. ed. [s.l: s.n.]. p. 81–92.

GIAMMARIOLI, M. et al. Genetic detection and characterization of emerging HoBi-like viruses in archival foetal bovine serum batches. **Biologicals**, v. 43, n. 4, p. 220–224, 2015.

GIANGASPERO, M. et al. Genoepidemiological evaluation of bovine viral diarrhea virus 2 species based on secondary structures in the 5' untranslated region. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 70, n. 6, p. 571–80, jun. 2008.

GIANGASPERO, M.; HARASAWA, R. Species characterization in the genus Pestivirus according to palindromic nucleotide substitutions in the 5'-untranslated region. **Journal of Virological Methods**, v. 174, n. 1–2, p. 166–172, 2011.

HOUE, H. Epidemiology of bovine viral diarrhea virus. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 11, n. 3, p. 521–547, 1 nov. 1995.

ICTV. **Taxonomy: Family Flaviviridae.** Disponível em: <<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>>. Acesso em: 14 jan. 2019.

MCCLURKIN, A. W. et al. Production of cattle immunotolerant to bovine viral diarrhea virus. **Canadian journal of Comparative Medicine**, v. 48, n. 2, p. 156–61, 1984.

MEYERS, G. et al. Viral cytopathogenicity correlated with integration of ubiquitin-coding sequences. **Virology**, v. 180, n. 2, p. 602–616, 1991.

MONTEIRO, F. L. et al. Detection and genetic identification of pestiviruses in Brazilian lots of fetal bovine serum collected from 2006 to 2014. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 3, p. 387–392, mar. 2018.

PELLERIN, C. et al. Identification of a new group of bovine viral diarrhea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. **Virology**, v. 203, n. 2, p. 260–268, 1 set. 1994.

RIDPATH, J. F. BVDV genotypes and biotypes: practical implications for diagnosis and control. **Biologicals**, v. 31, n. 2, p. 127–131, 1 jun. 2003.

RIDPATH, J. F.; BAUERMAN, F. V.; FLORES, E. E. Flaviviridae. In: FLORES, E. F. (Ed.). **. Virologia Veterinária- Virologia Geral e Doenças Víricas**. 3ed. ed. Santa Maria: [s.n.]. p. 677–708.

RIDPATH, J. F.; BOLIN, S. R.; DUBOVI, E. J. Segregation of bovine viral diarrhea virus into genotypes. **Virology**, v. 205, n. 1, p. 66–74, 15 nov. 1994.

SCHIRMEIER, H. et al. Genetic and antigenic characterization of an atypical pestivirus

isolate, a putative member of a novel pestivirus species. **Journal of General Virology**, v. 85, n. 12, p. 3647–3652, 2004.

SCHWEIZER, M.; PETERHANS, E. Pestiviruses. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 2, n. 1, p. 141–163, 2014.

SILVA, M. S et al. Molecular and antigenic characterization of Brazilian bovine herpesvirus type 1 isolates recovered from the brain of cattle with neurological disease. **Virus Research**, v. 129, n. 2, p. 191–199, nov. 2007.

SILVEIRA, S. et al. Genetic diversity of brazilian bovine pestiviruses detected between 1995 and 2014. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 64, n. 2, p. 613–623, 2015.

VILCEK, S. et al. Characterization of a novel pestivirus originating from a pronghorn antelope. **Virus Research**, v. 108, n. 1–2, p. 187–193, 1 mar. 2005.

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

WEBER, M. N. et al. Homologous recombination in pestiviruses: Identification of three putative novel events between different subtypes/genogroups. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 30, p. 219–224, 2015.

YEŞILBAĞ, K.; ALPAY, G.; BECHER, P. Variability and global distribution of subgenotypes of bovine viral diarrhoea virus. **Viruses**, v. 9, n. 6, p. 128, 26 maio 2017.