

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

Paulo Henrique Hümmelgen Silva

SOBRE A NECESSIDADE DE INCLUSÃO DE PESTIVÍRUS *HOBILIKE* EM VACINAS RESPIRATÓRIAS E REPRODUTIVAS PARA BOVINOS

Santa Maria, RS
2021

Paulo Henrique Hümmelgen Silva

**SOBRE A NECESSIDADE DE INCLUSÃO DE PESTIVÍRUS *HOB*-LIKE EM
VACINAS RESPIRATÓRIAS E REPRODUTIVAS PARA BOVINOS**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Área de concentração em Sanidade e Reprodução Animal) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Medicina Veterinária**.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Furtado Flores

Santa Maria, RS
2021

Hümmelgen Silva, Paulo Henrique
SOBRE A NECESSIDADE DE INCLUSÃO DE PESTIVÍRUS HOBI
LIKE EM VACINAS RESPIRATÓRIAS E REPRODUTIVAS PARA BOVINOS
/ Paulo Henrique Hümmelgen Silva.- 2021.
57 p.; 30 cm

Orientador: Eduardo Furtado Flores
Coorientador: Rudi Weiblen
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós
Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2021

1. BVDV 2. pestivírus 3. diversidade antigênica 4.
diagnóstico 5. vacinas I. Furtado Flores, Eduardo II.
Weiblen, Rudi III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, PAULO HENRIQUE HÜMMELGEN SILVA, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Paulo Henrique Hümmelgen Silva

**SOBRE A NECESSIDADE DE INCLUSÃO DE PESTIVÍRUS *HOB*-LIKE EM
VACINAS RESPIRATÓRIAS E REPRODUTIVAS PARA BOVINOS**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Área de concentração em Sanidade e Reprodução Animal) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Medicina Veterinária**.

Aprovado em 09 de abril de 2021

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

Deniz Anziliero, Dr (IMED)

Mário Celso S. Brum, Dr (Unipampa)

Santa Maria, RS
2021

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Janice e Manoel, pelos ensinamentos, pelo amor incondicional e por todo apoio dado, mesmo estando longe.

Aos professores Eduardo Furtado Flores e Rudi Weiblen, por concederem-me a oportunidade de fazer parte da equipe do Setor de Virologia, pelas importantes lições e por toda receptividade e paciência ao orientar.

Aos colegas e ex-colegas do Setor de Virologia, pelo companheirismo de todos os dias e por todo conhecimento e experiências que dividimos.

À Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), por albergar a estrutura necessária ao desenvolvimento da pesquisa científica e por todas as contribuições à comunidade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (PPGMV) da universidade, por fornecer o devido auxílio à condução de todas as atividades acadêmicas.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal a Nível Superior (CAPES), pelo financiamento e apoio ao desenvolvimento dos projetos de pesquisa.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, me auxiliaram na realização deste projeto e contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional.

*“In the infinite, the same events
repeat themselves in eternal flux,
the thousandfold vault of heaven
powerfully mingles with itself,
and joy of life streams from all things,
out of the smallest and largest star.
And all urgency, all conflict,
is eternal rest in God the Lord.” –*

Johann Wolfgang von Goethe (tradução de
Gary Bachlund, 1947).

RESUMO

SOBRE A NECESSIDADE DE INCLUSÃO DE PESTIVÍRUS *HOBILIKE* EM VACINAS RESPIRATÓRIAS E REPRODUTIVAS PARA BOVINOS

AUTOR: Paulo Henrique Hümmelgen Silva

ORIENTADOR: Eduardo Furtado Flores

Os pestivírus Hobi-like (HoBiPeV) constituem um novo grupo de pestivírus bovino, geneticamente e antígenicamente relacionados ao vírus da diarreia viral bovina 1 (BVDV-1) e BVDV-2. Dados recentes mostram que os HoBiPeV são endêmicos na população bovina brasileira, e as vacinas reprodutivas/respiratórias de bovinos contêm apenas cepas de BVDV-1 e BVDV-2. O presente estudo investigou a resposta de anticorpos neutralizantes contra estes pestivírus induzida por duas vacinas comerciais (VA – vacina atenuada; VI – vacina inativada) e por três vacinas experimentais replicativas (VAC1 – monovalente, BVDV1-; VAC2 – bivalente, BVDV-1+BVDV-2 e VAC3 – trivalente, BVDV-1+BVDV-2+HoBiPeV). Bovinos de raças de corte, soronegativos, foram imunizados uma vez (vacinas replicativas) ou duas vezes (para VI) e amostras de soro foram testadas por vírus-neutralização (VN) 30 dias após a vacinação (dpv) (vacinas replicativas) ou 30 dias após a segunda dose (VI). Considerou-se o título ≥ 60 indicador de proteção à doença clínica. Aos 30 dpv, a VA induziu títulos protetores ao BVDV-2 em 7/7 animais (GMT=289,8), e ao BVDV-1 e HoBiPeV em 5/7 animais (GMTs=97,5 e 80 respectivamente). A VI induziu títulos neutralizantes protetores frente ao BVDV-1 em 1/7 animal (GM=16,4), a BVDV-2 em 2/7 animais (GMT=53,8) e a HoBiPeV em nenhum dos animais (GMT=12,2). Quando o pool de soro dos grupos vacinados foi testado frente a isolados de pestivírus, a VA induziu títulos protetores contra 3/7 BVDV-1, 9/10 (BVDV-2) e 1/8 (HoBiPeV); a VI induziu títulos protetores contra 1/7 (BVDV-1), 1/10 (BVDV-2) e nenhum (0/8) HoBiPeV. A vacina experimental VAC1 induziu título protetor ao BVDV-1 em 9/9 animais (GMT=320), e em nenhum animal frente a BVDV-2 e HoBiPeV (GMT<10). A VAC2 induziu títulos protetores a BVDV-1 e BVDV-2 em 9/9 animais (GMTs=160 e 640, respectivamente), e contra HoBiPeV em 7/9 animais (GMT=108,5). Por fim, a vacina trivalente (VAC3) induziu títulos protetores similares a BVDV-1 (GMT=234,3,) BVDV-2 (GMT=294,9) e HoBiPeV (GMT=201,1) na totalidade dos animais. Quando o pool de amostras das vacinas foi testado frente aos isolados, VAC1 induziu títulos protetores contra 4/7 isolados de BVDV-1 mas contra nenhum BVDV-2 ou HoBiPeV; VAC2 induziu títulos protetores frente à 4/7 BVDV-1; 10/10 BVDV-2 e 2/8 HoBiPeV. Já a VAC3 conferiu títulos protetores contra todos os isolados de BVDV-1, BVDV-2 e HoBiPeV testados. Estes resultados indicam que vacinas contendo apenas BVDV-1 e BVDV-2 – especialmente aquelas com vírus inativado - podem não induzir resposta sorológica compatível com proteção frente à isolados de HoBiPeV. Dessa forma, a necessidade de incluir isolados de HoBiPeV em formulações vacinais no Brasil deve ser considerada.

PALAVRAS-CHAVE: BVDV, pestivírus, diversidade antigênica, diagnóstico, vacinas.

ABSTRACT

ABOUT THE NECESSITY OF INCLUDING *HOBI-LIKE* PESTIVIRUSES IN BOVINE RESPIRATORY AND REPRODUCTIVE VACCINES

AUTHOR: Paulo Henrique Hümmelgen Silva

ADVISER: Eduardo Furtado Flores

HoBi-like pestiviruses (HoBiPeV) constitute a novel group of bovine pestiviruses, genetically and antigenically related to bovine viral diarrhea virus 1 (BVDV-1) and BVDV-2. Recent data shows that HoBiPeV are endemic among Brazilian cattle, yet bovine reproductive/respiratory vaccines contain only BVDV-1 and BVDV-2 strains. The present study investigated the neutralizing antibody response against these pestiviruses induced by two commercial vaccines (VA – attenuated; VI – inactivated) and by three experimental, replicative, vaccine formulations (VAC1 – monovalent, BVDV-1; VAC2 – bivalent, BVDV-1 + BVDV-2 and VAC3 – trivalent, BVDV-1 + BVDV-2 and HoBiPeV). Seronegative beef calves were immunized once (replicative vaccines) or twice (inactivated vaccine) and serum samples were tested by virus-neutralization (VN) 30 days after vaccination (dpv) (replicative vaccines) or 30 days after the second dose (VI). We considered a threshold VN titer of ≥ 60 indicative of protection against clinical disease. At 30 dpv, VA induced protective titers against BVDV-2 in 7/7 animals (GMT=289.8) and against BVDV-1 and HoBiPeV in 5/7 animals (GMTs=97.5 and 80, respectively). VI induced protective titers against BVDV-1 in 1/7 animal (GMT=16.4), 2/7 animals against BVDV-2 (GMT=53.8) and in none of the calves against HoBiPeV (GMT=12.2). When a pool of sera of each vaccine group was tested against individual Brazilian isolates, VA induced protective titers against 3/7 BVDV-1 isolates, to 9/10 (BVDV-2) and 1/8 (HoBiPeV); VI induced protective titers against 1/7 (BVDV-1), 1/10 (BVDV-2) and none (0/8) HoBiPeV isolates. The experimental vaccine VAC1 induced protective titers against BVDV-1 in 9/9 animals (GMT=320) but in no animal against BVDV-2 or HoBiPeV (GMT<10). VAC2 induced protective titers to BVDV-1 and BVDV-2 in 9/9 animals (GMTs = 160 and 640, respectively), and against HoBiPeV in 7/9 animals (GMT=108.5). Finally, VAC3 induced protective titers in all animals against BVDV-1 (GMT=234.3), BVDV-2 (294.9) and HoBiPeV (201.1). Testing the pool of sera against pestivirus isolates, VAC1 induced titers ≥ 60 against 4/7 BVDV-1 but to none BVDV-2/HoBiPeV isolate; VAC2 induced protective titers against 4/7 BVDV-1; 10/10 BVDV-2 and 2/8 HoBiPeV; VAC3 induced protective titers against all BVDV-1, BVDV-2 and HoBiPeV isolates. These results indicate that vaccines composed by BVDV-1+BVDV-2 – especially those containing inactivated virus - may not induce serological response against a variety of HoBiPeV isolates. Thus, the need of inclusion of HoBiPeV in vaccine formulations should be considered.

KEYWORDS: BVDV, pestivirus, antigenic diversity, diagnosis, vaccines.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Organização das proteínas estruturais dos pestivírus (A); Em amarelo, estão representados os heterodímeros E1-E2 associados ao envelope; Em verde, está representado o capsídeo, formado pela proteína C. Organização do genoma dos pestivírus (B).....16

CAPÍTULO I

- Fig 1. Títulos de anticorpos neutralizantes no *pool* de soro de animais imunizados com vacinas comerciais (1A: Vacina atenuada [VA]; 1B: Vacina inativada [VI]) frente às cepas/isolados de BVDV-1. A linha pontilhada indica título de 60, mínimo para conferir proteção à doença clínica (Howard et al., 1989).....45

- Fig 2. Títulos de anticorpos neutralizantes no *pool* de soro de animais imunizados com vacinas experimentais (2A [VAC1]: Vacina monovalente [IBSP.4 – BVDV-1]; 2B [VAC2]: Vacina bivalente [IBSP.4 – BVDV-1 + SV323/04 – BVDV-2]; 2C [VAC3]: Vacina trivalente [IBSP.4 – BVDV-1 + SV323/04 – BVDV-2 + SV757/15 - HoBiPeV]) frente às cepas/isolados de BVDV-2. A linha pontilhada indica título de 60, mínimo para conferir proteção à doença clínica (Howard et al., 1989).....46

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1 - (Quadro 1) Anticorpos neutralizantes contra BVDV-1, BVDV-2 e HoBiPeV induzidos pelas vacinas comerciais.....	43
Tabela 2 – (Quadro 2) Anticorpos neutralizantes contra BVDV-1, BVDV-2 e HoBiPeV induzidos pelas vacinas experimentais.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BVD	Diarreia Viral Bovina
BVDV	Vírus da Diarreia Viral Bovina
°C	Graus Celsius
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
cp	Biótipo citopático
DM	Doença das Mucosas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dpv	Dias pós vacinação
ecp	Efeito citopático
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
GMT	Título geométrico médio
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
IM	Via intramuscular
kb	Quilobase
µg	Micrograma
µL	Microlitro
MDBK	<i>Madin Darby bovine kidney</i>
MEM	Meio essencial mínimo
mg	Miligrama
mL	Mililitro
MLV	Vacina viva modificada
nm	Nanômetro
ncp	Biótipo não citopático
nsp	Proteína não estrutural
ORF	Fase de leitura aberta
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PI	Persistentemente infectado
RdRp	RNA polimerase dependente de RNA
RNA	Ácido ribonucleico

RT-PCR	Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase
SC	Via subcutânea
SFB	Soro fetal bovino
SN	Soroneutralização
sp	Proteína estrutural
TCID ₅₀	Dosagem para 50% de infecção de cultura de tecido
UFMS	Universidade Federal de Santa Maria
UI	Unidade internacional
UTR	Região não traduzível
UV	Ultravioleta
VA	Vacina atenuada
VAC1	Vacina experimental 1
VAC2	Vacina experimental 2
VAC3	Vacina experimental 3
VI	Vacina inativada
VN	Vírus-neutralização

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	13
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1.	PESTIVÍRUS	14
2.2.	DIARREIA VIRAL BOVINA E BVDV	16
2.2.1.	Classificação do agente	17
2.2.2.	Epidemiologia	19
2.2.3.	Patogenia e Manifestações Clínicas	20
2.2.4.	Diagnóstico	22
2.2.5.	Prevenção e Controle	24
2.2.6.	Vacinas e eficácia	25
3.	CAPÍTULO I	33
	ABSTRACT.....	34
	RESUMO	34
	INTRODUÇÃO.....	35
	MATERIAL E MÉTODOS	36
	RESULTADOS	37
	DISCUSSÃO.....	37
	CONCLUSÃO	39
	REFERÊNCIAS	39
4.	CONCLUSÃO.....	47
5.	REFERÊNCIAS	47
	ANEXO 1 – Vacinas comerciais para BVDV disponíveis no Brasil.....	56

1. INTRODUÇÃO

A diarreia viral bovina (*bovine viral diarrhea* – BVD) é uma doença de grande relevância à bovinocultura em virtude do impacto econômico significativo, visto o custo com a tomada de medidas de controle e prevenção, perdas produtivas relacionadas ao acometimento de bovinos com infecção aguda, predisposição a infecções secundárias, aumento da mortalidade e redução de desempenhos produtivo e reprodutivo dos animais (HOUE, 1999; LINDBERG et al., 2006; EVANS et al., 2018).

Em estudo publicado por Yarnall e colaboradores (2017), ao associar custos de perdas produtivas e medidas de controle para BVD em revisão sistemática de pesquisas anteriores, estimou-se que o impacto econômico da enfermidade varia de £0 a £552/animal/ano, com um impacto médio de £46.50/animal/ano (aproximadamente \$65/animal/ano).

O agente etiológico associado a essa enfermidade é o vírus da diarreia viral bovina (*Bovine viral diarrhea virus* – BVDV), membro da família *Flaviviridae* e do gênero *Pestivirus*, sendo classificado em três espécies: *Pestivirus A* (BVDV-1), *Pestivirus B* (BVDV-2) e *Pestivirus H* (BVDV-3, pestivírus atípicos dos bovinos ou HoBiPeV) (ICTV, 2020).

Medidas de controle e prevenção de BVD em regiões onde ocorre alta circulação de bovinos e há práticas de manejo que facilitam o contato de animais de diferentes procedências se caracterizam, primariamente, na identificação de animais persistentemente infectados (PIs), monitoramento sorológico de rebanhos e vacinação (LINDBERG & ALENIUS, 1999; HOUE et al., 2006; SCHIRRMIEIER, 2014).

A utilização de vacinas para promover imunidade protetora frente a BVD apresenta desafios importantes, visto a variabilidade genética e antigênica dos BVDV, relacionada principalmente a diferenças antigênicas entre cepas vacinais e locais (VOGEL et al., 2002; BIANCHI et al., 2011; BAUERMANN et al., 2013; ANZILIERO et al., 2015; DIAS et al., 2017). Embora haja similaridade antigênica entre BVDV de diferentes espécies, se reconhece que estes vírus apresentam alta variabilidade antigênica (RIDPATH et al., 1994; BOTTON et al., 1998; DEREGT et al., 1998; KREUTZ et al., 2000; MONTEIRO et al., 2019). Além disso, as cepas

utilizadas nas vacinas comerciais do Brasil são provenientes de outros países, o que suscita a dúvida se há reatividade cruzada contra isolados locais (DIAS et al., 2017), e vacinas comerciais brasileiras contêm apenas BVDV-1 e BVDV-2, cuja resposta sorológica frente a HoBiPeV é incerta (DIAS et al., 2017; FLORES et al., 2018).

Tendo em vista os resultados obtidos em diferentes estudos de identificação e caracterização genética e antigênica de BVDV-1, BVDV-2 e HoBiPeV brasileiros e testes de reatividade cruzada entre cepas de BVDV vacinais e vírus de campo, levanta-se o questionamento a respeito da seleção de vírus para utilização em vacinas cuja similaridade antigênica se aproxime aos BVDV brasileiros (BAUERMANN et al., 2013, DIAS et al., 2017; FLORES et al., 2018).

O objetivo do presente trabalho foi investigar o potencial de neutralização de soro de animais vacinados com vacinas comerciais e experimentais frente a isolados brasileiros de BVDV-1, BVDV-2 e HoBiPeV.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. PESTIVÍRUS

Os pestivírus formam um gênero de vírus pertencentes à família *Flaviviridae*, compreendendo 11 espécies: *Pestivirus A* (BVDV-1), *Pestivirus B* (BVDV-2), *Pestivirus C* (Vírus da Peste Suína Clássica – CSFV), *Pestivirus D* (Vírus da Doença da Fronteira – BDV), *Pestivirus E* (pestivírus da antilocapra ou Pronghorn - PAPeV), *Pestivirus F* (Vírus Bungowannah - PPeV), *Pestivirus G* (pestivírus da girafa – GPeV), *Pestivirus H* (pestivírus atípicos dos bovinos ou HoBiPeV), *Pestivirus I* (AydinPeV), *Pestivirus J* (pestivírus do rato – RPeV) e *Pestivirus K* (pestivírus atípicos dos suínos – APPeV) (ICTV, 2020). O gênero abrange espécies de importância veterinária, visto a capacidade de infectar ruminantes e suínos e causar doenças de impacto significativo à produção animal (EVANS et al., 2018).

As infecções causadas por pestivírus estão associadas a doenças sistêmicas de gravidade variável, associadas a biótipos não citopáticos (ncp) e citopáticos (cp), com potencial de induzir infecções persistentes em animais imunotolerantes (animais persistentemente infectados - PI) (GILLESPIE et al., 1960; RIDPATH, 2003; BECHER e TAUTZ; 2011; BLOME et al., 2017; BRAUN et al., 2019).

Os pestivírus são vírus envelopados de 40 a 60 nanômetros (nm) e de genoma de RNA fita simples de sentido positivo de cerca de 12,5 quilobases (kb),

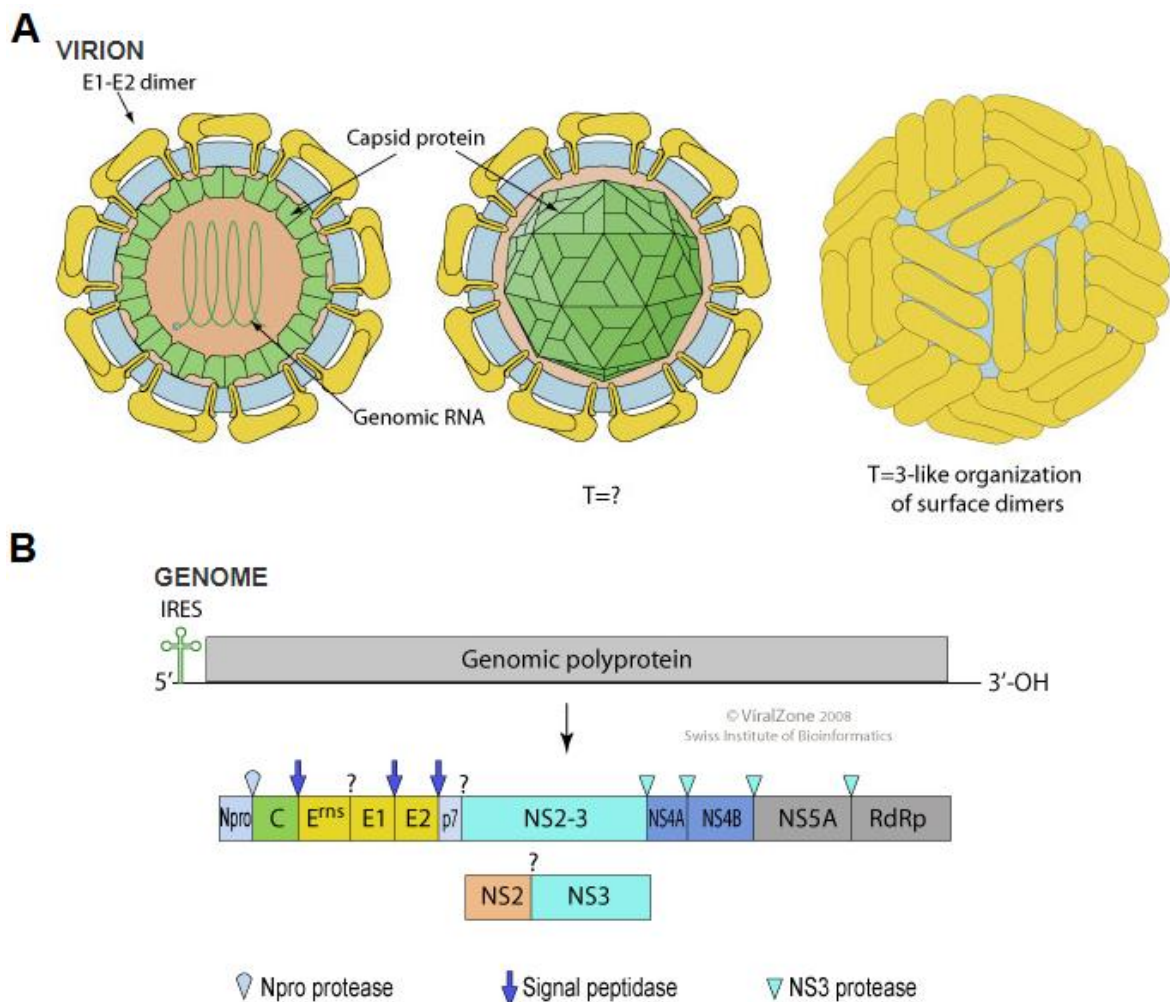
contendo uma fase de leitura aberta (ORF) flanqueada por duas regiões não traduzíveis (UTR) nas porções 5' e 3', cuja tradução resulta na formação de uma poliproteína, que é clivada por proteases celulares e virais, e abrange 12 proteínas diferentes, com funções estruturais (sp) e não estruturais (nsp) (COLLETT et al., 1988; BECHER e TAUTZ, 2011). A primeira proteína traduzida a partir da ORF é uma nsp denominada N^{pro}, seguida por quatro sp (C, E^{ms}, E1 e E2) e sete nsp (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B), representadas na Figura 1 (TAUTZ et al., 2015).

A proteína N^{pro} atua na inibição da resposta dos interferons α e β à infecção pelo vírus por meio da degradação do IRF3 (GOTTIPATTI et al., 2013). A proteína C, primeira sp a ser traduzida, compõe o capsídeo viral (THIEL et al., 1991; TAUTZ et al., 2015). A proteína E^{ms} é uma proteína do envelope viral atua como mediador da ligação do vírion aos glicosaminoglicanos da membrana celular e da endocitose dependente de clatrina, além de promover degradação de moléculas de RNA celular, sendo capaz de inibir a sinalização celular responsável pela síntese de interferons (IQBAL et al., 2004); As proteínas E1 e E2 encontram-se como heterodímeros no envelope viral, e são necessárias para determinar o tropismo, a ligação aos receptores da membrana celular e a fusão à célula do hospedeiro (LI et al., 2013; TAUTZ et al., 2015). Embora a função da proteína E1 não esteja totalmente esclarecida, acredita-se que auxilie na maturação das proteínas celulares e na interação de E2 com os receptores celulares durante sua ligação (MU et al., 2021). Já a proteína E2 atua na ligação com o receptor CD46 das células do hospedeiro, e possui alguns dos principais epítomos passíveis de reconhecimento e neutralização pelo sistema imune (RÜMENAPF et al., 1991; MAURER et al., 2004; CHIMENO ZOTH & TABOGA, 2006; BLOME et al., 2017; BRAUN et al., 2019).

O polipeptídeo hidrofóbico p7 atua como uma viroporina, propiciando influxo de íons para acidificação de vesículas durante a formação de partículas víricas maduras (ZHAO et al., 2017). As proteínas NS2 e NS3 atuam na replicação do RNA e morfogênese das partículas víricas, podendo ser encontradas tanto não clivadas (NS2-NS3) quanto clivadas. A clivagem no sítio entre essas proteínas é determinante para o desenvolvimento de citopatogenicidade (efeito citopático - ecp) em cultivo celular (QU et al., 2001; TAUTZ e THIEL, 2013). A proteína NS4A atua como cofator de NS3, além de auxiliar na promoção da morfogênese viral, enquanto NS4B é essencial na replicação do RNA viral e possui propriedades relacionadas ao

rearranjo de conformação de membranas celulares e formação do complexo de replicação do RNA viral e formação do autofagossomo (WEISKIRCHER et al., 2009; BECHER e TAUTZ, 2011; SUDA et al., 2019). A proteína NS5A possui características associadas à capacidade de fosforilação de quinases celulares (REED et al., 1998), enquanto NS5B possui características de RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), como já fora demonstrado em estudos *in vitro* (PAESHUYSE et al., 2006).

Figura 1 - Organização das proteínas estruturais dos pestivírus (A); Em amarelo, estão representados os heterodímeros E1-E2 associados ao envelope; Em verde, está representado o capsídeo, formado pela proteína C. Organização do genoma dos pestivírus (B).



Fonte: Adaptado de <https://viralzone.expasy.org/39>.

2.2. DIARREIA VIRAL BOVINA E BVDV

2.2.1. Classificação do agente

Dentro do gênero *Pestivirus*, os BVDV estão compreendidos em três genótipos: *Pestivirus A* – BVDV-1; *Pestivirus B* - BVDV-2; *Pestivirus H* – HoBiPeV. Os BVDV-1 são classificados em 21 subgenótipos (BVDV-1a a BVDV-1u), enquanto BVDV-2 e HoBiPeV são divididos em 4 subgenótipos (BVDV-2a a BVDV-d; BVDV-3a a BVDV-3d) (RIDPATH et al., 1994; GIAMMARIOLI et al., 2015; YEŞILBAĞ et al., 2017; SILVEIRA et al., 2020).

A primeira divisão entre genótipos de BVDV ocorreu em estudo de Ridpath e colaboradores (1994), em que se fez a classificação de BVDV-1 e BVDV-2 com base na análise filogenética da região 5' UTR do genoma viral e similaridade antigênica com base no perfil de ligação de anticorpos monoclonais. Muitos estudos relacionados à classificação de genótipos de BVDV ocorreram no início da década de 1990, principalmente pela emergência de variantes de BVDV que causavam maior mortalidade de animais, além de relatos de falha vacinal. A classificação com base em características genéticas e antigênicas pôde propiciar a associação entre casos de BVD com síndrome hemorrágica a isolados posteriormente classificados como BVDV-2 (VILČEK et al. 1994; RIDPATH et al., 1994; PELLERIN et al., 1994; LINDBERG & ALENIUS, 1999). Trabalhos posteriores também classificaram BVDV de acordo com outros segmentos do genoma como, por exemplo, segmentos responsáveis pela tradução de N^{pro} e E2 (LIU et al., 2009a; LIU et al., 2009b; DENG et al., 2015; WEBER et al., 2016).

Em estudo de Schirrmeier e colaboradores (2004), foi feita a caracterização genética e antigênica de um pestivírus atípico (“D32/00_HoBi”), isolado em células de timo fetal ovino suplementadas com soro fetal bovino de origem brasileira, o qual fora comprovado como fonte da contaminação do cultivo a partir de isolamento viral em células de esôfago bovino e PCR. Com base na análise comparativa de sequenciamento do genoma do vírus, estudos de ligação a anticorpos monoclonais e ensaios de reatividade sorológica cruzada, foi possível classificar “D32/00_HoBi” como membro de um genótipo putativo (*HoBi-like* e, posteriormente, *Pestivirus H*) dentro do gênero *Pestivirus*. Os autores citam a maior facilidade de replicação após a passagem do vírus nas células de origem bovina e, tendo em vista que a origem da contaminação fora soro fetal bovino, os bovinos possivelmente seriam a espécie alvo dos *Pestivirus H*.

Em estudos posteriores, foi possível fazer o isolamento de outros pestivírus pertencentes à espécie H com base em características genéticas e antigênicas, além de associá-los a casos de enfermidade semelhantes a BVD. Em estudo de Stalder e colaboradores (2005), foi feita a classificação genotípica de cerca de 150 pestivírus isolados na Suíça, dentre os quais dois vírus foram classificados como pestivírus atípicos (“Brz buf 9”, proveniente de um búfalo do Brasil, e “CH-KaHo/cont”, proveniente de um cultivo celular contaminado, possivelmente suplementado com soro fetal bovino sul americano). Cortez e colaboradores (2006) realizaram a caracterização genética de dois isolados de HoBiPeV (isolado 200 e isolado 315) provenientes de fetos abortados do estado de São Paulo. Os autores comentam a respeito da possibilidade destes isolados terem causado problemas reprodutivos em animais entre os anos de 2002 a 2004 em diferentes regiões, o que poderia ser um indicativo de circulação dos vírus nos rebanhos do estado.

Em estudo de Ståhl e colaboradores (2007), foi feita a caracterização genética e antigênica de um HoBiPeV da Tailândia (“Th/04_KhonKaen”), a partir de uma amostra de soro de bezerro. Os autores afirmam que haveria duas possibilidades para a origem do novo vírus caracterizado, considerando que trabalhos anteriores tratavam de vírus HoBiPeV oriundos da América do Sul: 1) “Th/04_KhonKaen” teria sido introduzido por meio de produtos biológicos (ex.: vacinas, soro fetal bovino) como um agente contaminante; 2) O vírus já estaria disseminado nas populações de bovinos da Tailândia. A necessidade pela criação de testes diagnósticos para HoBiPeV, tanto para monitoramento sorológico de rebanhos livres de BVDV quanto para verificação de contaminantes em produtos biológicos é enfatizada pelos autores. Decaro e colaboradores (2011) fizeram a identificação de dois vírus HoBiPeV (“Italy-1-1/10-1” e “Italy 1-1/10-2”) associados a casos de doença respiratória em bezerros na Itália por meio de PCR e imunofluorescência. A análise de sequenciamento do genoma dos vírus evidenciou a semelhança mais próxima entre a região 5’ UTR de “Italy-1-1/10-1” e “Th/04_KhonKaen”, enquanto a semelhança com cepas de referência de BVDV-1 e BVDV-2 foi menor.

Estudos posteriores possibilitaram melhor compreensão a respeito da patogenia dos vírus HoBiPeV, similaridade e reatividade antigênicas em relação a outros pestivírus e potencial de imunização a partir do uso de vacinas comerciais e

experimentais para BVDV (BAUERMANN et al., 2012; BAUERMANN et al., 2013; DECARO et al., 2015; WEBER et al., 2016; DIAS et al., 2017; JARDIM et al., 2018).

2.2.2. Epidemiologia

A BVD é uma doença de distribuição mundial e de alta prevalência nos rebanhos, sendo foco de vários estudos voltados a estratégias de controle e erradicação (FLORES et al., 2005). A transmissão de BVDV ocorre tanto por via vertical, durante a infecção da fêmea prenhe ao feto, quanto horizontal, através de contato direto com saliva, secreções nasal e lacrimal, sêmen, urina, leite, fluidos fetais e fezes. A forma mais comum de ocorrência de transmissão se dá por meio do contato direto entre animais sadios e animais PI, visto que a persistência da infecção garante que BVDV seja excretado em maiores quantidades e durante um período de tempo maior em comparação a animais apresentando infecção aguda (MEYLING et al., 1990; HOUE, 1999; RIDPATH, 2013; LANYON et al., 2014). A introdução de animais PI nos rebanhos é o principal fator de entrada e estabelecimento de BVD nos rebanhos bovinos (BAKER, 1995; HOUE, 1999). Fômites, aerossóis e vetores mecânicos também contribuem para a transmissão do agente (NISKANEN & LINDBERG, 2003; LANYON et al., 2014).

A primeira descrição de BVD foi feita por pesquisadores da Cornell University, em relato de doença contagiosa, clinicamente caracterizada por quadros de gastroenterite com diarreia, formação de úlceras na boca e focinho dos animais, descarga nasal e ocorrência de abortos, sendo previamente atribuída a uma possível contaminação de grãos com nitrato de amônio (OLAFSON et al., 1946). No mesmo ano, foi feito um relato a partir de notas de observação de uma doença de causas desconhecidas que acometia o gado na província de Saskatchewan, no Canadá (CHILDS, 1946). Esse relato trazia informações a respeito dos sinais clínicos observados e dos achados de necropsia, muito semelhantes às observações de Olafson e colaboradores (1946).

Ao longo das décadas seguintes, foi possível elucidar outros fenômenos associados à infecção por BVDV como, por exemplo, a relação causal entre a infecção transplacentária e o desenvolvimento de animais imunotolerantes, suscetíveis à Doença das Mucosas (DM) e manifestações clínicas de BVD

relacionadas a genótipos diferentes (CORIA & McCLURKIN, 1978; ROEDER & DREW, 1984; PELLERIN et al., 1994).

No Brasil, há levantamentos da ocorrência de BVD desde a década de 1960, com registro de isolamentos de vírus provenientes de animais com infecção aguda, animais PI, animais com DM, rebanhos com histórico de perdas reprodutivas, fetos abortados e soro fetal bovino (CANAL et al, 1998; FLORES et al., 2005; MONTEIRO et al., 2018). Em estudo de Flores e colaboradores (2018), verificou-se que, no período de 1998 a 2018, a frequência relativa dos genótipos BVDV-1, BVDV2 e HobiPeV isolados ou detectados em animais apresentando sinais clínicos e em amostras de soro no Brasil foi de 54,4%, 25,7% e 19,9%, respectivamente, com predominância dos subgenótipos 1a (32,9%) e 2b (21,8%).

Tendo em vista a importância do país no comércio de animais vivos e produtos biológicos de origem bovina, alguns estudos têm buscado detectar e caracterizar BVDV presentes nessas fontes. Em estudo de Monteiro e colaboradores (2018), foi feita a detecção e caracterização genética de BVDV presentes em amostras de 73 lotes de soro fetal bovino coletadas entre os anos de 2006 e 2014. Foi constatado que 53,4% das amostras foram positivas para RNA de pestivírus, sendo que uma das amostras continha partículas víricas viáveis. Dentre os lotes positivos, 34 (46,6%) continham BVDV-1, 6 (8,2%) continham BVDV-2, 4 (5,5%) continham HoBiPeV e 5 (6,8%) continham RNA proveniente de mais de um pestivírus.

2.2.3. Patogenia e Manifestações Clínicas

O BVDV liga-se à membrana plasmática por meio da interação de E^{ns} com glicosaminoglicanos para permitir a endocitose, enquanto a proteína E2, presente no envelope viral, possui tropismo ao receptor celular CD46, uma proteína de membrana expressa ubiquamente nas células de espécies animais suscetíveis à infecção pelo vírus (MAURER et al., 2004; LANYON et al., 2014).

A interação com macrófagos e linfócitos é importante para a disseminação do vírus a sítios de tecido linfóide no organismo do hospedeiro antes que ocorra viremia (BROWNLIE et al., 1990; LANYON et al., 2014). O período de incubação dura em torno de 5 a 7 dias. Durante o curso da infecção, ocorre viremia associada a leucopenia, trombocitopenia e linfopenia, bem como apoptose de células linfóides

presentes no timo e tecido linfóide associado aos bronquíolos e à mucosa intestinal, causando quadro de imunossupressão. A imunossupressão do animal permite a potencialização da infecção primária e o estabelecimento de infecções secundárias (BAKER, 1995; POTGIETER et al., 1995; LANYON et al., 2014).

As infecções por BVDV ncp são predominantes em comparação a infecções por vírus cp, uma vez que a prevalência de isolados ncp é superior à de vírus cp, os quais são majoritariamente associados a casos de DM (BROWNLIE et al., 1990; BOTTON et al., 1998). A infecção persistente em animais é dependente de variantes ncp (PETERHANS et al., 2010).

Em animais sadios, a infecção geralmente cursa de maneira subclínica ou aguda. Em infecções subclínicas, eventualmente se pode encontrar animais com febre e alterações hematológicas como leucopenia, trombocitopenia e linfopenia (BAKER, 1995). Quando os animais apresentam infecção de forma aguda, é possível que apresentem febre e sinais clínicos como tosse, descarga nasal mucoide a mucopurulenta, descarga ocular, aparecimento de lesões cutâneas no focinho, formação de úlceras e erosões na mucosa oral e diarreia. A ocorrência de infecções secundárias pode agravar os sinais observados (BAKER, 1995; BRODERSEN, 2014).

Alguns casos de infecção aguda associados a BVDV-2 se desenvolvem como síndrome hemorrágica, cuja manifestação apresenta uma trombocitopenia grave, como ocorrência de diarreia sanguinolenta, epistaxe e formação de petéquias e equimose em mucosas. Estes casos tendem a ser mais graves que quadros onde não ocorre hemorragia, havendo maior taxa de mortalidade de animais (PELLERIN et al., 1994; BAKER, 1995).

Quando a infecção cursa em fêmeas prenhes, BVDV pode infectar o concepto com diferentes consequências de acordo com a fase da gestação em que ocorreu a infecção (BAKER, 1995). A formação dos colitédones da placenta permite com ocorra interação entre vírus e concepto durante o período de viremia da fêmea. Quando a infecção transplacentária ocorre antes dos 30 dias de gestação, pode ocorrer morte embrionária. A partir de 40 a 120 dias de gestação, a infecção do feto pode levar ao desenvolvimento de infecção persistente. A capacidade do BVDV ncp em inibir a produção de interferon do tipo I é fundamental para a perpetuação da infecção no animal (BAKER, 1995; PETERHANS et al., 2010; PETERHANS & SCHWEIZER, 2013). Em razão disso, o feto não é capaz de diferenciar proteínas

virais de proteínas próprias, tornando-se imunotolerante (RIDPATH, 2013). Nesta fase, também é possível que haja desenvolvimento de efeitos teratogênicos em sítios de alta atividade mitótica (especialmente tecido nervoso e linfoide), como hipoplasia cerebral (resultando em ataxia após o nascimento), hipomielinização, braquignatismo, degeneração ocular e retardo no desenvolvimento dos pulmões, ou morte fetal (BROWN et al., 1974; BROWN et al., 1975; BAKER, 1995; LANYON et al., 2014). Já a partir do terço final da gestação, é predominante o aparecimento de efeitos teratogênicos, abortos e, caso o feto seja imunocompetente, este pode debelar a infecção e se tornar soropositivo (LANYON et al., 2014).

Clinicamente, os animais com infecção persistente podem apresentar-se hígidos ou, em alguns casos, com retardo no crescimento e maior susceptibilidade a infecções secundárias. A infecção persistente é responsável pela excreção de grande quantidade de partículas virais ao longo de toda a vida do animal, presentes em secreções nasais e oculares, sêmen, pele, fezes e tecidos (BAKER, 1995; BRODERSEN, 2014). Estes animais têm importância epidemiológica fundamental para a disseminação e manutenção do agente nos rebanhos (HOUE, 1999; FULTON et al., 2005).

A infecção persistente por BVDV pode propiciar a ocorrência da DM, uma enfermidade de alta mortalidade que surge a partir da infecção concomitante de um vírus de biótipo ncp e outro de biótipo cp de BVDV (HOUE, 1999; PETERHANS et al., 2010). A DM possui duas formas de manifestação: 1) a forma aguda, que consiste na ocorrência de úlceras nas mucosas oral e nasal devido a necrose de queratinócitos, as quais podem coalescer e formar extensas áreas de lesões necróticas, além de diarreia profusa e sanguinolenta, leucopenia acentuada, febre e anorexia; 2) a forma crônica, relacionada a casos em que o animal consegue sobreviver à infecção, mas apresenta inapetência, perda de peso, diarreia contínua ou intermitente e lesões erosivas na pele e mucosas (BAKER, 1995; BACHOFEN et al., 2010; BRODERSEN, 2014; LANYON et al., 2014).

2.2.4. Diagnóstico

A identificação de BVDV em rebanhos se baseia na avaliação de informações epidemiológicas relevantes, especialmente em relação ao histórico de doenças infecciosas e a baixos índices de desempenho reprodutivo. A abundância de

diferentes manifestações da doença e inespecificidade de sinais clínicos exige que se faça a escolha do teste diagnóstico de acordo com a situação, seja para triagem, identificação do agente em casos de infecção subclínica ou aguda ou identificação de animais PI (SALIKI & DUBOVI, 2004; BACHOFEN et al., 2010).

As principais técnicas para diagnóstico direto de BVD consistem em formas de identificar a presença do agente a partir de sua atividade biológica, detecção de antígenos e detecção de material genético do agente. As técnicas mais utilizadas para diagnóstico direto de BVD são: 1) Isolamento do agente em cultivo celular, sendo esta a técnica considerada padrão ouro para diagnóstico. Geralmente associada com imunofluorescência, imunoperoxidase, ensaio de imunoabsorção enzimática (*enzyme-linked immunosorbent assay* - ELISA) ou reação em cadeia da polimerase (PCR); 2) ELISA para detecção de antígenos, feito principalmente a partir de amostras de sangue total (capa flogística) ou soro; 3) Imunohistoquímica, para detecção de antígenos em fragmentos de tecido, realizada normalmente a partir de um fragmento de orelha; 4) RT-PCR, o qual amplifica cópias de DNA transcritas a partir do RNA viral, e pode se utilizado para uma vasta gama de amostras como, por exemplo, sangue total, soro, leite, secreções, urina e amostras de tecido fresco ou fixadas em formaldeído (SALIKI & DUBOVI, 2004; HILBE et al., 2007; BRODERSEN, 2014; LANYON et al., 2014).

Técnicas de diagnóstico indireto, em especial ELISA e soroneutralização (SN, ou vírus-neutralização - VN), são utilizadas para monitoramento sorológico de rebanhos, em especial quando não se realiza a vacinação dos animais. Dessa forma, é possível inferir que ocorre circulação de BVDV em uma população de animais com base em na avaliação da resposta humoral. Estas técnicas também podem ser utilizadas em avaliações de resposta vacinal (SALIKI & DUBOVI, 2004; DUBOVI, 2013). A técnica de SN possui alta especificidade ao agente, e avalia em atividade de anticorpos neutralizantes, ou seja, anticorpos com capacidade de inibir a atividade biológica (infecção das células de cultivo celular) do agente escolhido para o teste (HOUE et al., 2006). No entanto, é uma técnica que requer laboratório com estrutura para manutenção de cultivos celulares, bem como pessoal treinado para a realização do teste e padronização adequada, visto que há grande variação entre laboratórios na forma de realização do teste (SALIKI & DUBOVI, 2004). Já os testes de ELISA, embora não apresentem a mesma especificidade dos testes de SN, requerem estrutura menos complexa para sua realização, apresentam maior

facilidade para padronização, obtêm resultado em menor tempo e podem ser empregados para outros tipos de amostras que não sejam soro como, por exemplo, leite proveniente de um animal em específico ou *pool* de amostras de leite, tal qual ocorre em tanques de transporte e armazenamento (LANYON et al., 2014)

2.2.5. Prevenção e Controle

As medidas voltadas a controle e prevenção e BVD baseiam-se em: 1) promover proteção fetal; 2) bloquear a disseminação do vírus dentro as propriedades. Estas medidas consistem em: controlar o status sanitário de animais introduzidos nos rebanhos, certificar locais livres da enfermidade e identificar/remover animais PI e, dependendo da região, vacinação de animais (BITSCH & RØNSHOLT, 1995; BOLIN, 1995; LINDBERG & ALENIUS, 1999).

No ano de 1993, Noruega e Suécia iniciaram um programa de erradicação de BVD sem a utilização de vacinas, acompanhadas por Dinamarca e Finlândia em 1994. O programa baseou-se na identificação e remoção de animais PI e monitoramento de rebanhos por meio de técnicas de diagnóstico direto e indireto em leite de tanques de resfriamento e, com isso, foi possível certificar propriedades e regiões livres da enfermidade (LINDBERG & ALENIUS, 1999). O “modelo escandinavo”, como ficou conhecido este programa de erradicação de BVD, obteve sucesso em tornar os países que o instituíram livres da doença, e outros países europeus adotaram o programa posteriormente (STÅHL & ALENIUS, 2012).

Embora as estratégias para controle e erradicação de BVD sem a utilização de vacinas tenham obtido êxito em reduzir a circulação do agente nos rebanhos europeus, os custos com a realização de testes para monitoramento periódico e adoção de medidas de biosseguridade efetivas dificultam a instauração deste tipo de programa em outras regiões, especialmente em áreas onde ocorre contato entre animais de diferentes procedências, sendo necessário o emprego de vacinação (STÅHL & ALENIUS, 2012; NEWCOMER et al., 2017).

A vacinação para BVD tem dois objetivos principais: 1) prevenir o acometimento dos animais com doença clínica; 2) promover resposta imune em fêmeas prenhes, a qual seja capaz de debelar a infecção transplacentária e, dessa forma, prevenir a infecção do feto. É uma medida considerada complementar às

estratégias de promoção de biossegurança e monitoramento sanitário do rebanho (NEWCOMER et al., 2017).

Em propriedades e regiões onde há alta rotatividade de animais, dificuldade no emprego efetivo de medidas de biossegurança que desfavoreçam a transmissão horizontal do vírus e histórico de casos clínicos e subclínicos de infecção pelo agente, recomenda-se a utilização de vacinas para incitar imunidade a BVDV (BOLIN, 1995; NEWCOMER et al., 2017)

2.2.6. Vacinas e eficácia

Desde a década de 1960, muitos estudos foram direcionados ao desenvolvimento de vacinas para BVD. No ano de 2003, já havia cerca de 160 marcas de vacinas comerciais à venda nos Estados Unidos da América (RIDPATH, 2013). A capacidade de indução de resposta imune frente a diferentes variantes de BVDV e a necessidade por produtos capazes de oferecer alta cobertura vacinal aos rebanhos, tanto na proteção frente à doença aguda quanto à infecção transplacentária, constituem os principais desafios ao desenvolvimento de novas vacinas (RIDPATH, 2013; GRIEBEL, 2015). Atualmente no Brasil há pelo menos 13 vacinas comerciais para BVD, as quais apresentam diferentes formulações (Anexo 1).

Embora se reconheça que as vacinas para BVD possuem a capacidade de induzir resposta imune, é importante que se considere a alta variabilidade antigênica das diferentes cepas de BVDV e qual é o potencial desta característica dos vírus em prejudicar a imunização (RIDPATH et al. 1994; BOTTON et al., 1998; BIANCHI et al. 2011; BAUERMANN et al, 2012). Outros fatores importantes ao desenvolvimento de resposta imune frente ao estímulo vacinal são o tipo das vacinas, sejam elas inativadas ou atenuadas, e a presença e mecanismo de ação de adjuvantes (BOLIN & RIDPATH, 1989; ENDSLEY et ., 2003; RIDPATH, 2013; BACCILI et al. 2019).

Em relação a características antigênicas de BVDV de relevância ao desenvolvimento de resposta imune nos animais, estudos têm demonstrado que E^{ns}, E2 e NS3 apresentam epítomos importantes para o desencadear de imunidade celular e humoral nos animais, com imunodominância de epítomos de E2 (BOLIN, 1993; MAURER et al., 2004; CHIMENO ZOTH & TABOGA, 2006; VAN RIJN et al. 2007). Entretanto, a região do genoma viral que é responsável pela tradução da

proteína E2 é pouco conservada entre diferentes variantes de BVDV, o que propicia alta variabilidade antigênica e, conseqüentemente, baixa reatividade sorológica entre cepas (RIDPATH et al. 1994; DEREGT et al., 1998; BIANCHI et al. 2011).

A presença de partículas virais inativadas ou atenuadas na composição das vacinas também é uma importante variável ao desenvolvimento de resposta imune (BOLIN, 1995). Estudos apontam que vacinas inativadas estimulam a imunidade humoral majoritariamente frente a E2, enquanto vacinas atenuadas estimulam imunidade humoral frente a E2 e NS2/3, com menor resposta a E1 e E^{ms} (BOLIN & RIDPATH, 1989; RIDPATH, 2013). O estímulo à imunidade celular também é um importante fator de diferenciação entre a resposta induzida por vacinas inativadas e atenuadas, visto que vacinas atenuadas possuem partículas víricas viáveis, embora não conservem o mesmo potencial de replicação de vírus não atenuados. Dessa forma, os vírus vacinais podem replicar-se e desencadear uma resposta imune semelhante à infecção natural (BOLIN, 1995; RIDPATH, 2013). Um estudo de Endsley e colaboradores (2003) verificou a indução de resposta imune celular em bezerros que recebiam colostro, tanto nas condições de vacinação com vacina atenuada para BVD quanto em infecção experimental, com baixa manifestação de resposta imune humoral. Em estudo posterior, realizado por Platt e colaboradores (2009), foi verificada a indução de resposta imune celular (linfócitos CD4+, CD8+ e $\gamma\delta$) em bezerros de 1 a 8 semanas de idade que recebiam colostro e vacinados com uma vacina comercial viva modificada para BVDV-1 e BVDV-2, com proteção frente a desafio de BVDV-2.

Embora se aponte como vantajosa a preservação de certa capacidade de replicação do agente vacinal presente nas vacinas atenuadas, visto que a replicação permite a estimulação de resposta imune celular e humoral, a utilização de vacinas vivas ainda levanta questionamentos a respeito de sua segurança, visto a ocorrência de casos de infecção pelas cepas vacinais de BVDV (ENDSLEY et al., 2003; RIDPATH, 2013; GRIEBEL, 2015).

A participação da resposta humoral também é necessária para promover proteção às infecções por BVDV. Em estudo realizado por Howard e colaboradores (1989), verificou-se que títulos de anticorpos neutralizantes superiores a 240 conferiam proteção à infecção respiratória em bezerros suplementados com colostro, e títulos inferiores a 60 eram insuficientes para promover proteção à doença. Em estudo de Bolin e Ridpath (1995), títulos iguais ou inferiores a 256 não

preveniram febre e viremia após desafio com BVDV-2 (890) em bezerros suplementados com colostro, e animais com títulos iguais ou inferiores a 16 desenvolviam doença grave. Estes estudos mostram a relação entre o título de anticorpos neutralizantes e o potencial de proteção às infecções.

No Brasil, diferentes estudos têm buscado elucidar qual é o potencial imunizador e protetor de vacinas comerciais e quais são as possibilidades de melhoria das vacinas disponíveis ao se tratar de indução de imunidade protetora à doença aguda e à infecção transplacentária, com ênfase à imunização frente às cepas de BVDV provenientes do país.

Um dos primeiros testes de vacinas para BVDV no Brasil foi realizado por Vogel e colaboradores (2001) em ovelhas prenhes, tanto a fim de se conhecer a eficácia da soroconversão e proteção à infecção fetal conferida pelas vacinas testadas frente a variantes de BVDV-1 e BVDV-2 oriundas do país, quanto para validar o modelo experimental de infecção e soroconversão em ovinos. Foram escolhidas para a realização do estudo três vacinas comerciais inativadas, contendo cepas citopáticas e não citopáticas de BVDV. Para a realização dos desafios, foram utilizadas as cepas brasileiras SV126.8 (BVDV-1) e SV260 (BVDV-2) (BOTTON et al., 1998), inoculadas por via intranasal. Amostras de soro foram coletadas em intervalos de 30 dias após a administração das vacinas e no dia do desafio (180 dias após a aplicação da primeira dose vacinal) para serem testadas em ensaios de SN frente a cepas padrão de BVDV-1 (Singer) e BVDV-2 (VS-253), bem como às cepas utilizadas no desafio. Ao final do experimento, os animais foram sacrificados a fim de se coletar amostras de tecido e sangue para isolamento viral. Este estudo pôde demonstrar que a vacinação das ovelhas com as vacinas comerciais inativadas induziu a produção de títulos moderados a baixos frente a BVDV-1 e BVDV-2 e se mostrou ineficaz na capacidade de conferir proteção à infecção fetal. Foi possível isolar os vírus utilizados no desafio nos fetos de todas as ovelhas vacinadas. A utilização de ovinos para o desenvolvimento do estudo pôde ser validada, tendo em vista a replicação de BVDV na espécie e produção de anticorpos neutralizantes após vacinação, embora em baixos títulos.

Em estudo realizado em paralelo ao anteriormente descrito, Vogel e colaboradores (2002) realizaram a vacinação de bovinos com três vacinas inativadas para BVDV, com coleta de amostras de soro nos dias 30, 60, 180 e 210 após a aplicação da primeira dose de cada vacina para ensaios de SN frente a cepas

padrão de BVDV-1 (Singer) e BVDV-2 (VS-253) e cepas brasileiras previamente caracterizadas (BVDV-1: EMP-2, SV126-1, SV126-8, e UFSM-1; BVDV-2: VM-97 e SV260) (BOTTON et al., 1998). Neste estudo, foi possível demonstrar que as vacinas inativadas utilizadas no experimento induziram títulos de anticorpos neutralizantes baixos a moderados frente a BVDV-1 e BVDV-2, sendo que a resposta frente aos BVDV-2 foi significativamente menor, o que foi atribuído à ausência de cepas de BVDV-2 nas vacinas comerciais disponíveis à venda no Brasil naquela época.

No mesmo ano, Brum e colaboradores (2002) realizaram um estudo que tratava da utilização de duas cepas brasileiras de BVDV cp atenuadas (IBSP.2 – BVDV-1; VS-253 – BVDV-2) por passagens sucessivas e pela ação mutagênica de raios ultravioleta (UV) para a confecção de novas vacinas, as quais foram inoculadas em ovelhas prenhes e bovinos a fim de se verificar a inocuidade das cepas, avaliar a proteção fetal aos vírus vacinais e a resposta sorológica e proteção conferidas pela vacinação frente a desafio com vírus heterólogos por meio de SN. O estudo pôde demonstrar que a vacinação com os vírus atenuados induziu a produção de títulos de anticorpos neutralizantes superiores a 256 e conferir proteção frente a cepas heterólogas após aplicação de duas doses da vacina, embora ainda houvesse preservação do potencial de infecção os fetos ovinos e anexos embrionários pelos vírus vacinais.

Tendo em vista a utilização das cepas brasileiras de BVDV do estudo anteriormente descrito, Lima e colaboradores (2004) realizaram a caracterização de IBSP.2 e VS-253 atenuados com base na avaliação do perfil antigênico, cinética de replicação, avaliação morfológica do ecp, inocuidade em bovinos e espectro de reatividade sorológica atribuída à vacinação frente cepas heterólogas de referência e cepas oriundas do Brasil. Este estudo pôde demonstrar os procedimentos de atenuação das cepas não promoveu mudanças significativas a seus perfis antigênicos e características fenotípicas, além de propiciar inocuidade aos animais vacinados e reatividade sorológica alta frente às cepas heterólogas de BVDV-1 e moderada frente às cepas de BVDV-2, o que foi explicado pela origem de VS-253, uma cepa americana de BVDV-2. A revacinação dos animais pôde induzir a produção de títulos de anticorpos neutralizantes mais altos para BVDV-2 em comparação à primovacinação.

No ano seguinte, Lima e colaboradores (2005) realizaram um experimento de avaliação de resposta sorológica induzida por uma vacina atenuada experimental e três vacinas inativadas comerciais em bovinos e reatividade sorológica frente aos vírus homólogos utilizados nas vacinas e a três cepas de BVDV-1 (UFSM-1, SV126-1 e SV126-8) e uma cepa de BVDV-2 (SV260) provenientes do Brasil. A vacina atenuada era composta por sobrenadante de cultivo celular contendo IBSP.2 e VS-253, sendo aplicada uma dose inicial e uma dose de reforço 180 dias após a aplicação da primeira dose, enquanto as vacinas inativadas possuíam BVDV-1 e antígenos de outros patógenos em sua composição, aplicadas em duas doses em intervalos de 30 dias e uma dose reforço 180 após a aplicação da primeira dose. Os resultados obtidos a partir da comparação entre as respostas das vacinas testadas demonstraram que a vacina atenuada experimental pôde induzir a produção de anticorpos neutralizantes em quantidades significativamente superiores às vacinas inativadas comerciais quanto avaliadas frente às cepas homólogas (IBSP.2 e VS-253 para a vacina atenuada e a cepa padrão Singer para as vacinas comerciais). A resposta sorológica induzida pela vacina atenuada apresentou alta reatividade frente à maioria dos vírus heterólogos utilizados no experimento, significativamente superior à resposta induzida pelas vacinas inativadas.

Estudos posteriores deram continuidade a experimentos para tentar elucidar o potencial de imunização e proteção fetal à infecção por BVDV conferido por vacinas atenuadas em bovinos. Em experimento de Arenhart e colaboradores (2008), foi avaliada a resposta sorológica de vacas prenhes vacinadas com uma vacina atenuada experimental contendo IBSP.2 e VS-253 e desafiadas com cepas heterólogas de BVDV-1 (UFSM-1 e SV126-8) e BVDV-2 (SV63 e SV260), bem como a proteção fetal conferida pela imunização. Nesse estudo, foi possível demonstrar que a vacina atenuada induziu produção de altos títulos de anticorpos neutralizantes nos animais que receberam a vacinação, e 17 das 19 vacas vacinadas deram à luz a bezerros saudáveis, livres da infecção por BVDV.

Tendo em vista a recente caracterização de pestivírus emergentes, estudos seguintes buscaram aprofundar o entendimento a respeito da similaridade antigênica entre BVDV-1, BVDV-2 e HoBiPeV, assim como demonstrar o potencial de detecção por testes diagnósticos baseados de antígenos virais e a capacidade de imunização induzida pela utilização de vacinas comerciais frente o novo grupo de pestivírus. Em estudo de Bauermann e colaboradores (2012), se fez a avaliação da capacidade de

detecção de HoBiPeV em testes de ELISA de captura utilizados em diagnóstico de BVD. Também foi avaliada a atividade neutralizante do antissoro de animais desafiados com HoBiPeV frente a frente a seis cepas de BVDV-1 e duas cepas de BVDV-2, bem como atividade neutralizante do soro de bovinos jovens vacinados com cepas inativadas de BVDV-1 e BVDV-2 frente a HoBiPeV. Na avaliação da detecção de HoBiPeV com a utilização de kits comerciais de ELISA de captura para BVDV, foi verificado que os testes disponíveis possuem capacidade para detectar HoBiPeV, e não houve diferença significativa entre o limiar de detecção de HoBiPeV e o limiar de detecção do menor título de BVDV-1 e BVDV-2. Nos testes de atividade neutralizante do antissoro de HoBiPeV frente a demais genótipos de pestivírus, foi verificado que as amostras de antissoro de HoBiPeV obtiveram títulos de anticorpos neutralizantes altos quando testadas frente às cepas de BVDV-2 utilizadas no testes (890 e 296ncp), enquanto a atividade neutralizante frente aos outros pestivírus foi menor. Em relação à avaliação do soro de animais vacinados com vacinas comerciais pra BVD, foi observado que os valores de título médio geométrico (*geometric mean titer* - GMT) de anticorpos neutralizantes das amostras de soro dos animais vacinados com BVDV-1 e BVDV-2 foram maiores para os vírus homólogos utilizados na vacina em comparação a HoBiPeV.

Em estudo posterior, Bauermann e colaboradores (2013) avaliaram a atividade neutralizante de amostras de soro de bovinos imunizados com duas vacinas experimentais (uma vacina inativada e outra atenuada) para BVDV-1 e BVDV-2, testadas frente a BVDV-1 (BVDV1b-NE e BVDV1c-AusB675), BVDV-2 (BVDV2a-890, BVDV2a-296ncp) e HoBiPeV (HoBi_D32/00 e Italy-1/10-1) por SN. Os testes demonstraram uma taxa de soroconversão 25% maior frente a BVDV-1 e BVDV-2 em comparação com HoBiPeV, sendo que a vacina atenuada foi capaz de induzir a produção de anticorpos neutralizantes frente BVDV-1, BVDV-2 e HoBiPeV em um número maior de animais em comparação à vacina inativada. Este estudo pôde enfatizar o potencial de utilização de vacinas atenuadas e inativadas frente a vírus HoBiPeV, e alimentar o questionamento em relação à inclusão de cepas de HoBiPeV em vacinas comerciais específicas a regiões onde há circulação destes vírus nos rebanhos.

Anziliero e colaboradores (2015) avaliaram da resposta humoral induzida por oito vacinas inativadas comerciais contendo antígenos de BVDV e outros patógenos frente a BVDV-1 (Singer) e BVDV-2 (VS-253). O experimento pôde demonstrar que

quatro das vacinas avaliadas não induziram resposta humoral neutralizante frente a Singer, e cinco vacinas não induziram resposta a VS-253, sendo que apenas uma vacina foi capaz que induzir a produção de anticorpos neutralizantes em títulos médios a altos em alguns dos animais frente a BVDV-1 e BVDV-2. Tendo em vista os baixos títulos de anticorpos neutralizantes obtidos a partir da maioria das vacinas avaliadas, os autores enfatizaram a necessidade de atualização da composição das vacinas comerciais para BVD.

De maneira similar a estudos anteriores, que buscavam elucidar o potencial imunizante de vacinas comerciais pra BVDV frente a vírus HoBiPeV, o estudo de Dias e colaboradores (2017) avaliou a similaridade antigênica e a reatividade sorológica entre oito cepas de HoBiPeV provenientes do Brasil (LV01/12, LV02/12, LV03/12, LV04/12, SV478/07, LV22487/12, SV757/15 e LVP-WR-BR11), bem como a atividade neutralizante de amostras de soro de ovinos vacinados com seis vacinas comerciais para BVDV frente às cepas de HoBiPeV, sendo todas inativadas e apenas três contendo antígenos de BVDV-1 e BVDV-2. Os resultados obtidos demonstraram a existência de reatividade sorológica e similaridade antigênica variáveis entre as cepas avaliadas. Quanto à avaliação da resposta humoral induzida pelas vacinas comerciais inativadas frente aos vírus HoBiPeV, pôde-se evidenciar baixa reatividade sorológica aos vírus utilizados nos testes. Os autores frisam a importância de se conhecer a variabilidade antigênica dos vírus HoBiPeV, tanto para aplicações em diagnósticos de BVD quanto para o desenvolvimento de vacinas com maior potencial imunizante.

Em estudo de Baccili e colaboradores (2019), avaliou-se a resposta humoral induzida por três vacinas comerciais inativadas frente a BVDV-1 (Singer) e BVDV-2 (VS-253), com ênfase na contribuição de adjuvantes para indução de anticorpos neutralizantes. Foi observada diferença entre o tipo de adjuvante e a resposta humoral frente aos vírus utilizados nos testes, sendo que o grupo de animais vacinados com a vacina que continha hidróxido de alumínio como adjuvante foi capaz de induzir a produção de anticorpos com atividade neutralizantes a Singer, embora não tenha sido capaz de induzir anticorpos a VS-253, enquanto a vacina comercial que continha Quil A, Amphigen e colesterol em sua formulação foi capaz de estimular a produção de anticorpos neutralizantes a BVDV-1 e BVDV-2.

A fim de avaliar o potencial de imunização conferido por quatro vacinas comerciais inativadas para BVDV, as quais são vendidas no Uruguai e utilizadas por

produtores brasileiros, Merchioratto e colaboradores (2020) realizaram experimento baseado na vacinação de ovelhas com estas vacinas e verificação da reatividade sorológica a cepas padrão de BVDV por meio de SN. Os resultados demonstraram que apenas uma das vacinas comerciais utilizadas no experimento foi capaz de induzir a produção de anticorpos neutralizantes em títulos significativos frente a BVDV-1 e BVDV-2, sendo que apenas 70% dos animais vacinados desenvolveram títulos de anticorpos neutralizantes capazes de conferir proteção à doença. Os autores salientam a necessidade de revisão da composição antigênica das vacinas para BVD disponíveis no mercado.

Dotto e colaboradores (2020) avaliaram a resposta sorológica a BVDV induzida por vacinas comerciais e uma vacina experimental associadas a diferentes adjuvantes. Neste estudo, nove vacinas comerciais foram utilizadas para a vacinação de novilhas soronegativas conforme recomendações dos fabricantes, e um preparado contendo BVDV inativado e associado a diferentes adjuvantes fora administrado no mesmo protocolo vacinal. As amostras de soro dos animais vacinados foram submetidas ao teste de soroneutralização frente a BVDV-1 (Singer), BVDV-2 (VS-253) e HoBiPeV (SV357/03). Os resultados obtidos a partir das amostras de soro dos animais vacinados com as vacinas comerciais demonstraram que apenas quatro vacinas das nove vacinas utilizadas no experimento foram capazes de induzir resposta humoral neutralizante frente a Singer, e apenas três vacinas induziram a produção de anticorpos neutralizantes frente a VS-253 e SV357/03. Dentre as vacinas comerciais, apenas três foram capazes de promover títulos de anticorpos neutralizantes em valores considerados protetores frente à doença para BVDV-1, BVDV-2 e HoBiPeV. Em relação aos testes com as vacinas experimentais, nenhuma foi capaz de promover resposta neutralizante a BVDV. Este estudo pôde reforçar observações anteriores em relação à reformulação da composição antigênica das vacinas comerciais para BVDV disponíveis no Brasil.

3. CAPÍTULO I

Sobre a necessidade de inclusão de pestivírus *HoBi-like* em vacinas respiratórias e reprodutivas para bovinos.¹

Paulo Henrique Hümmelgen Silva^{2,3}, Rudi Weiblen², Eduardo Furtado Flores²

(Artigo submetido à revista *Pesquisa Veterinária Brasileira* – 2021)

Sobre a necessidade de inclusão de pestivírus *HoBi-like* em vacinas respiratórias e reprodutivas para bovinos.¹

Paulo Henrique Hümmelgen Silva^{2,3}, Rudi Weiblen², Eduardo Furtado Flores²

ABSTRACT. – Hümmelgen Silva P.H., Weiblen R. & Flores E.F. 2021. **About the necessity of including HoBi-like pestiviruses in bovine respiratory and reproductive vaccines.** Setor de Virologia, Prédio 63A, Rua Z, Centro de Eventos, Universidade Federal de Santa Maria, CEP: 97105-900, RS, Av. Roraima, 1000, Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: eduardofurtadoflores@gmail.com

HoBi-like pestiviruses (HoBiPeV) constitute a novel group of bovine pestiviruses, genetically and antigenically related to bovine viral diarrhoea virus 1 (BVDV-1) and BVDV-2. Recent data shows that HoBiPeV are endemic among Brazilian cattle, yet bovine reproductive/respiratory vaccines contain only BVDV-1 and BVDV-2 strains. The present study investigated the neutralizing antibody response against these pestiviruses induced by two commercial vaccines (VA – attenuated; VI – inactivated) and by three experimental, replicative, vaccine formulations (VAC1 – monovalent, BVDV-1; VAC2 – bivalent, BVDV-1 + BVDV-2 and VAC3 – trivalent, BVDV-1 + BVDV-2 and HoBiPeV). Seronegative beef calves were immunized once (replicative vaccines) or twice (inactivated vaccine) and serum samples were tested by virus-neutralization (VN) 30 days after vaccination (dpv) (replicative vaccines) or 30 days after the second dose (VI). We considered a threshold VN titer of ≥ 60 indicative of protection against clinical disease. At 30 dpv, VA induced protective titers against BVDV-2 in 7/7 animals (GMT=289.8) and against BVDV-1 and HoBiPeV in 5/7 animals (GMTs=97.5 and 80, respectively). VI induced protective titers against BVDV-1 in 1/7 animal (GMT=16.4), 2/7 animals against BVDV-2 (GMT=53.8) and in none of the calves against HoBiPeV (GMT=12.2). When a pool of sera of each vaccine group was tested against individual Brazilian isolates, VA induced protective titers against 3/7 BVDV-1 isolates, to 9/10 (BVDV-2) and 1/8 (HoBiPeV); VI induced protective titers against 1/7 (BVDV-1), 1/10 (BVDV-2) and none (0/8) HoBiPeV isolates. The experimental vaccine VAC1 induced protective titers against BVDV-1 in 9/9 animals (GMT=320) but in no animal against BVDV-2 or HoBiPeV (GMT<10). VAC2 induced protective titers to BVDV-1 and BVDV-2 in 9/9 animals (GMTs = 160 and 640, respectively), and against HoBiPeV in 7/9 animals (GMT=108.5). Finally, VAC3 induced protective titers in all animals against BVDV-1 (GMT=234.3), BVDV-2 (294.9) and HoBiPeV (201.1). Testing the pool of sera against pestivirus isolates, VAC1 induced titers ≥ 60 against 4/7 BVDV-1 but to none BVDV-2/HoBiPeV isolate; VAC2 induced protective titers against 4/7 BVDV-1; 10/10 BVDV-2 and 2/8 HoBiPeV; VAC3 induced protective titers against all BVDV-1, BVDV-2 and HoBiPeV isolates. These results indicate that vaccines composed by BVDV-1+BVDV-2 – especially those containing inactivated virus - may not induce serological response against a variety of HoBiPeV isolates. Thus, the need of inclusion of HoBiPeV in vaccine formulations should be considered.

INDEX TERMS: BVDV, pestivirus, antigenic diversity, diagnosis, vaccines.

1. (Data de recebimento.)

(Data de aceite para publicação.)

2. Setor de Virologia, Prédio 63A, Rua Z, Centro de Eventos, Universidade Federal de Santa Maria, CEP: 97105-900, RS, Av. Roraima, 1000, Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: eduardofurtadoflores@gmail.com

3. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, Santa Maria, RS, Brasil.

RESUMO. – [Sobre a necessidade de inclusão de pestivírus *HoBi-like* em vacinas respiratórias e reprodutivas para bovinos.] Os pestivírus *Hobi-like* (HoBiPeV) constituem um novo grupo de pestivírus bovino, geneticamente e antigenicamente relacionados ao vírus da diarréia viral bovina 1 (BVDV-1) e BVDV-2. Dados recentes mostram que HoBiPeV são endêmicos na população bovina brasileira, e as vacinas reprodutivas/respiratórias de bovinos contêm apenas cepas de BVDV-1 e BVDV-2. O presente estudo investigou a resposta de anticorpos neutralizantes contra estes pestivírus induzida por duas vacinas comerciais (VA – vacina atenuada; VI – vacina inativada) e por três vacinas experimentais replicativas (VAC1 – monovalente, BVDV-1; VAC2 – bivalente, BVDV-1+BVDV-2 e VAC3 – trivalente, BVDV-1+BVDV-2+HoBiPeV). Bovinos de corte soronegativos foram imunizados uma vez (vacinas replicativas) ou duas vezes (para VI) e amostras de soro

foram testadas por vírus-neutralização (VN) 30 dias após a vacinação (dpv) (vacinas replicativas) ou 30 dias após a segunda dose (VI). Considerou-se o título ≥ 60 indicador de proteção à doença clínica. Aos 30 dpv, a VA induziu títulos protetores ao BVDV-2 em 7/7 animais (GMT=289,8), e ao BVDV-1 e HoBiPeV em 5/7 animais (GMTs=97,5 e 80 respectivamente). A VI induziu títulos neutralizantes protetores frente ao BVDV-1 em 1/7 animal (GM=16,4), a BVDV-2 em 2/7 animais (GMT=53,8) e a HoBiPeV em nenhum dos animais (GMT=12,2). Quando o pool de soro dos grupos vacinados foi testado frente a isolados de pestivírus, a VA induziu títulos protetores contra 3/7 BVDV-1, 9/10 (BVDV-2) e 1/8 (HoBiPeV); a VI induziu títulos protetores contra 1/7 (BVDV-1), 1/10 (BVDV-2) e nenhum (0/8) HoBiPeV. A vacina experimental VAC1 induziu título protetor ao BVDV-1 em 9/9 animais (GMT=320), e em nenhum animal frente a BVDV-2 e HoBiPeV (GMT<10). A VAC2 induziu títulos protetores a BVDV-1 e BVDV-2 em 9/9 animais (GMTs=160 e 640, respectivamente), e contra HoBiPeV em 7/9 animais (GMT=108,5). Por fim, a vacina trivalente (VAC3) induziu títulos protetores similares a BVDV-1 (GMT=234,3), BVDV-2 (GMT=294,9) e HoBiPeV (GMT=201,1) na totalidade dos animais. Quando o pool de amostras das vacinas foi testado frente aos isolados, VAC1 induziu títulos protetores contra 4/7 isolados de BVDV-1 mas contra nenhum BVDV-2 ou HoBiPeV; VAC2 induziu títulos protetores frente à 4/7 BVDV-1; 10/10 BVDV-2 e 2/8 HoBiPeV. Já a VAC3 conferiu títulos protetores contra todos os isolados de BVDV-1, BVDV-2 e HoBiPeV testados. Estes resultados indicam que vacinas contendo apenas BVDV-1 e BVDV-2 – especialmente aquelas com vírus inativado - podem não induzir resposta sorológica compatível com proteção frente à isolados de HoBiPeV. Dessa forma, a necessidade de incluir isolados de HoBiPeV em formulações vacinais no Brasil deve ser considerada.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: BVDV, pestivírus, diversidade antigênica, diagnóstico, vacinas.

INTRODUÇÃO

Os pestivírus de bovinos incluem o protótipo vírus da diarreia viral bovina 1 (*Bovine viral diarrhea virus 1*, BVDV-1, *Pestivirus A*), BVDV-2 (*Pestivirus B*) e os vírus *HoBi-like* (HoBiPeV, *Pestivirus H*) (ICTV 2020). BVDV-1 e BVDV-2 estão distribuídos mundialmente e têm sido historicamente associados a uma variedade de manifestações clínicas e falhas reprodutivas em bovinos. Os pestivírus *Hobi-like* (HoBiPeV) foram identificados na metade da década de 2000 e têm sido associados com doença com características clinicopatológicas similares àquelas atribuídas a BVDV-1 e BVDV-2 (Schirrmeyer et al. 2004, Bauermann et al. 2013, Hoppe et al. 2019, Decaro 2020).

Os pestivírus são vírus envelopados (~50 nm de diâmetro), com genoma de RNA de fita simples e sentido positivo de 12,3 kb de comprimento. O genoma de RNA contém uma longa fase aberta de leitura (*open reading frame* – ORF) flanqueada por duas regiões não traduzíveis (*untranslated region* – UTR) (5' e 3' UTRs, respectivamente). A ORF é traduzida em uma poliproteína de aproximadamente 3988 aminoácidos, que é processada em 11-12 proteínas estruturais e não estruturais (Tautz et al. 2015). Os pestivírus são classificados em espécies e subespécies (subtipos) com base na identidade nucleotídica da 5' UTR altamente conservada, e nos genes que codificam a proteína não estrutural N^{pro} (Becher et al. 1997), NS3 (Ridpath et al. 1994, Pellerin et al. 1994) e na glicoproteína do envelope E2 (van Rijn et al. 1997).

Os pestivírus *Hobi-like* (HoBiPeV) foram inicialmente identificados em soro fetal bovino (SFB) importado do Brasil (Schirrmeyer et al. 2004) e posteriormente identificados em vários continentes, associados com uma variedade de manifestações clínicas, incluindo doença respiratória (Decaro et al. 2011, Hoppe et al. 2019), gastrointestinal (Decaro et al. 2014, Weber et al. 2016, Cruz et al. 2018), falhas reprodutivas (Decaro 2020) e animais persistentemente infectados (PI) (Decaro et al. 2014, Decaro et al. 2015, Weber et al. 2016). HoBiPeV têm sido identificados também em várias regiões brasileiras associadas com uma variedade de manifestações clínicas (Cortez et al., 2006, Bianchi et al., 2011, Weber et al. 2016, Cruz et al. 2018, Hoppe et al., 2019). De fato, dados recentes indicam que esses vírus são endêmicos e podem representar até 19% dos pestivírus bovinos circulantes no rebanho brasileiro (Flores et al. 2018).

Os HoBiPeV são geneticamente e antigenicamente relacionados a BVDV-1 e BVDV-2, embora diferenças antigênicas significativas tenham sido demonstradas entre estes grupos de vírus (Schirrmeyer et al. 2004, Bauermann et al. 2012, Larska et al. 2012). A baixa reatividade sorológica entre BVDV e HoBiPeV representa uma grande preocupação em relação ao diagnóstico imunológico e, especialmente, à proteção conferida por vacinas (Bauermann et al. 2012, Bauermann et al. 2013, Decaro et al. 2013).

Vacinas vivas modificadas (MLV) e inativadas têm sido amplamente utilizadas para reduzir as perdas causadas por infecções por BVDV mundialmente (Baker 1995, Ridpath 2013). Muitas vacinas estão disponíveis no Brasil, sendo que a maioria contém BVDV-1 e BVDV-2 combinados com outros agentes virais e bacterianos associados a doenças respiratórias e reprodutivas. Nos últimos anos, duas vacinas vivas modificadas contendo cepas de BVDV-1 e BVDV-2 foram introduzidas no mercado. Até o presente momento, nenhuma vacina comercial inclui HoBiPeV em sua formulação.

Como as diferenças antigênicas entre espécies BVDV e HoBiPeV são consideráveis e a eficácia de vacinas bovinas reprodutivas/respiratórias contra HoBiPeV é incerta, investigou-se a atividade neutralizante contra HoBiPeV induzida por algumas vacinas para BVDV. Ademais, investigou-se a reatividade sorológica contra HoBiPeV de três formulações vacinas experimentais; monovalente (BVDV-1); bivalente (BVDV-1 e BVDV-2) e trivalente (BVDV-1, BVDV-2 e HoBiPeV).

MATERIAL E MÉTODOS

Desenho experimental. Com o objetivo de investigar-se a resposta de anticorpos neutralizantes contra BVDV-1, BVDV-2 e HoBiPeV, grupos de bovinos soronegativos foram vacinados com duas vacinas comerciais (VA – vacina atenuada, dose única ou VI – inativada, duas doses; sete animais por grupo vacinal) e com três formulações vacinais experimentais replicativas (VAC1 – monovalente, BVDV-1; VAC2 – bivalente, BVDV-1+BVDV-2 ou VAC3 – trivalente, BVDV-1+BVDV-2+HoBiPeV; nove animais por grupo vacinal, todas as vacinas em dose única). Amostras de soro dos animais vacinados foram testadas por vírus-neutralização (VN) contra BVDV-1, BVDV-2 e HoBiPeV no dia 30 pós-vacinação (vacinas replicativas) ou 30 dias após a segunda dose (VI).

Vírus e células. As cepas/isolados de pestivírus bovinos (BVDV e HoBiPeV) foram amplificadas e quantificadas em células de linhagem MDBK (ATCC - CCL-22, *Madin-Darby bovine kidney*). A técnica de vírus-neutralização (VN) também foi realizada com células MDBK. As células foram cultivadas em meio essencial mínimo (MEM), suplementadas com 10% de soro equino, penicilina (10.000UI/mL), estreptomicina (10mg/mL), ciprofloxacina (10mg/mL) e anfotericina B (250µg/mL) a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. As cepas e isolados de BVDV-1, BVDV-2 e HoBiPeV utilizadas no presente estudo foram anteriormente descritas (Flores et al. 2005, Cortez et al. 2006, Bianchi et al. 2011, Silveira et al. 2015, Dias et al. 2017).

Vacinas comerciais. Duas vacinas comerciais foram utilizadas para a avaliação, sendo uma atenuada (VA) e outra inativada (VI). Ambas contêm cepas de BVDV-1 e BVDV-2 em sua formulação. A VA contém a cepa KE-9 de BVDV-1 e NY-93 de BVDV-2 liofilizadas (Bovela®, Ingelheim am Rhein - Alemanha). A VI contém a cepa 5690 de BVDV-1 e 53637 de BVDV-2, além de outros antígenos virais e bacterianos e o adjuvante ISCOM com Amphigen® (CattleMaster® GOLD FP 5/L5, Parsippany, NJ – Estados Unidos da América).

Quatorze fêmeas bovinas de idade aproximada de dois anos e soronegativas para o BVDV foram alocadas em dois grupos e cada grupo foi imunizado com uma vacina (VA e VI). As vacinas foram administradas pela via subcutânea (SC) de acordo com as recomendações do fabricante. A vacina A foi aplicada em dose única e a vacina VI em duas doses, com intervalo de 30 dias. Amostras de sangue foram coletadas 30 dias após a administração da dose única para VA (D30) e 30 dias após a administração da segunda dose para VI (D60) para obtenção de soro utilizado nos testes de VN.

Vacinas experimentais. Para investigar a reatividade sorológica entre as três espécies de pestivírus, foram elaboradas três vacinas experimentais, com diferentes composições. Essas vacinas eram compostas pelo sobrenadante de cultivo celular inoculado com os respectivos vírus, os quais são todos provenientes do Brasil. A Vacina 1 (VAC1) continha o isolado IBSP-4 (BVDV-1) com título de 10^{5,98}TCID₅₀/mL (dose de 3 mL). A Vacina 2 (VAC2) continha o isolado IBSP-4 (BVDV-1) e o isolado SV323/04 de BVDV-2 (título de 10^{6,1}TCID₅₀/mL). Foram administrados 3mL (1.5 mL de cada vírus). Além dos dois isolados, a vacina 3 (VAC3) continha também o isolado SV757/15 de HoBiPeV (título de 10^{6,04}TCID₅₀/mL). A dose vacinal se constituiu de 3mL (1mL de cada vírus). Assim, o título viral final de cada vacina experimental foi de aproximadamente 3 x 10^{6,0}TCID₅₀.

Vinte e sete bezerros com idade entre 6 e 8 meses, soronegativos para o BVDV, foram divididos em três grupos, de acordo com as vacinas a serem administradas. As vacinas foram administradas pela via intramuscular (IM) em dose única (D0). Amostras de sangue foram coletadas 30 dias após a vacinação (D30) para a realização de testes de VN.

Vírus-neutralização (VN). Os testes de VN foram realizados em placas de polietileno de 96 poços, incubando-se diluições crescentes do soro na base 2 (diluição inicial 1:10) frente a aproximadamente 100-200 TCID₅₀ dos respectivos vírus. Após incubação de 2h a 37°C, uma suspensão de células MDBK foi adicionada às cavidades, seguido de incubação por 96h a 37°C e 5% CO₂. A leitura foi feita pela observação de efeito citopático para os vírus cp e por imunofluorescência (IFA) para os vírus ncp (Corapi et al. 1990). Os títulos foram expressos como a recíproca da maior diluição do soro capaz de neutralizar a replicação viral e transformados em GMT (Thrusfield 1986). A avaliação estatística foi feita com o teste de Friedmann-Dunn (Bauermann et al. 2013) no software GraphPad Prism®, em que diferenças foram consideradas significativas quando o valor de p<0,05 (95% de intervalo de confiança). As amostras individuais de soro foram testadas frente a IBSP-4 (BVDV-1), SV323/04 (BVDV-2) e SV757/15 (HoBiPeV), enquanto *pools* de amostras individuais de cada grupo vacinal foram testadas frente a sete isolados/cepas BVDV-1, dez BVDV-2 e sete HoBiPeV, todos provenientes do Brasil, conforme apresentado nas Figuras 1 e 2. Cada *pool* de amostras dos respectivos grupos vacinais foi composto por 100µL de

soro de cada animal vacinado, de maneira a tornar representativa a influência de cada amostra individual no grupo (Bauermann et al. 2012).

Comitê de Ética no Uso de Animais. As atividades realizadas no projeto ligadas à utilização de animais para vacinação e coleta de amostras estão de acordo com o protocolo da Comissão de Ética de Uso de Animais (CEUA) da UFSM de número 9888201017.

RESULTADOS

Os títulos de anticorpos neutralizantes induzidos pelas imunizações, frente à cepas representativas dos três pestivírus, estão apresentados nos Quadros 1 e 2. Adicionalmente, um *pool* de soro de cada grupo vacinal foi testado frente a sete isolados de BVDV-1, 10 de BVDV-2 e 8 de HoBiPeV. Os resultados estão apresentados nas Figuras 1 e 2.

Os sete animais imunizados com a VA apresentaram títulos neutralizantes entre 40 e 320 contra BVDV-1 (GMT=97,5), entre 80 e 640 frente ao BVDV-2 (GMT=289,8) e entre 40 e 160 frente ao HoBiPeV (GMT = 80) (Quadro 1). Considerando-se títulos ≥ 60 , a VA induziu títulos protetores em 5/7 animais frente ao BVDV-1 e HoBiPeV e em 7/7 frente ao BVDV-2. Já os sete animais imunizados com a VI apresentaram títulos entre 10 e 80 frente ao BVDV-1 (GMT=16,4), entre 20 e 640 (GMT=53,8) frente ao BVDV-2 e apenas dois reagiram frente ao HoBiPeV (títulos de 10 e 20; GMT = 12,2). Nesse grupo vacinal, títulos protetores contra o BVDV-1 foram detectados em apenas um animal, contra o BVDV-2 em dois animais e contra o HoBiPeV em nenhum animal. Os títulos neutralizantes, tanto frente ao BVDV-1, BVDV-2 quanto ao HoBiPeV, foram superiores nos animais da VA. Quando o *pool* de soro dos grupos vacinados foi testado frente a isolados de pestivírus, a VA induziu títulos protetores contra 3/7 isolados de BVDV-1, 9/10 (BVDV-2) e 1/8 (HoBiPeV). Já a VI induziu títulos protetores contra 1/7 (BVDV-1), 1/10 (BVDV-2) e contra nenhum isolado de HoBiPeV (0/8) (Fig. 1).

Amostras de soro dos animais imunizados com a VAC1 apresentaram títulos neutralizantes entre 160 e 640 contra o vírus homólogo (GMT = 320). Dois animais desenvolveram anticorpos que neutralizaram SV323 (BVDV-2; títulos de 10 e 20, GMT <10) e quatro animais desenvolveram anticorpos que neutralizaram SV757/15 (HoBiPeV; títulos iguais a 10, GMT <10); os demais não apresentaram anticorpos neutralizantes em títulos ≥ 10 , limite mínimo de detecção da técnica (Quadro 2). Os animais imunizados com a VAC2 (BVDV-1 + BVDV-2) apresentaram títulos moderados frente ao BVDV-1 (entre 80 e 320, GMT=160) e títulos mais altos frente ao BVDV-2 (320 a 1280, GMT=640). Quando testadas frente ao HoBiPeV SV757/15, as amostras deste grupo apresentaram títulos neutralizantes entre 40 e 320 (GMT=108,5), semelhantes aos títulos neutralizantes frente ao BVDV-1. A imunização dos bezerros com uma vacina trivalente (VAC3, BVDV-1 + BVDV-2 + HoBiPeV) induziu títulos moderados a altos frente ao BVDV-1 (160 – 640, GMT = 234,3) e HoBiPeV (entre 80 e 1280, GMT = 201,1) e um pouco superiores frente ao BVDV-2 (320-1280, GMT=294,5). Quando o *pool* de amostras séricas dos grupos vacinais foi testado frente aos isolados, VAC1 induziu títulos protetores contra 4/7 isolados de BVDV-1 mas contra nenhum BVDV-2 ou HoBiPeV; VAC2 induziu títulos protetores frente à 4/7 BVDV-1; 10/10 BVDV-2 e 2/8 HoBiPeV. Já a VAC3 conferiu títulos protetores contra todos os isolados de BVDV-1, BVDV-2 e HoBiPeV testados (Fig. 2).

DISCUSSÃO

Os pestivírus bovinos são antigenicamente relacionados entre si, porém apresentam diferenças antigênicas que podem comprometer o diagnóstico e a eficácia de vacinas (Schirrmeyer et al. 2004, Bauermann et al. 2012, Bauermann et al. 2013, Dias et al. 2017). Estudos recentes demonstram uma ampla circulação de HoBiPeV no rebanho bovino brasileiro, além de BVDV-1 e BVDV-2 (Flores et al. 2018). Como a maioria das vacinas comerciais contém apenas BVDV-1 e BVDV-2, sendo estas de origem americana, o presente estudo avaliou a resposta sorológica contra HoBiPeV em animais imunizados com duas vacinas comerciais (VA e VI) e com formulações experimentais contendo pestivírus bovinos provenientes do Brasil, de composição monovalente (BVDV-1), bivalente (BVDV-1 + BVDV-2) e trivalente (BVDV-1+BVDV-2+HoBiPeV). Com isso, pretendeu-se avaliar a necessidade da inclusão de isolados de HoBiPeV em vacinas no Brasil.

Os resultados obtidos indicam que, considerando-se títulos protetores ≥ 60 (Howard et al. 1989), vacinas que contenham apenas BVDV-1 e BVDV-2, sobretudo as inativadas, não induzem títulos de magnitude protetora contra vários isolados de HoBiPeV. Por outro lado, a adição de um isolado de HoBiPeV na formulação trivalente foi suficiente para a indução de títulos protetores contra todos os isolados de BVDV-1, BVDV-2 e HoBiPeV.

A grande diversidade entre isolados de BVDV já era bem conhecida quando, em 1994, foi identificado um novo grupo (ou genótipo) de BVDV, cujos vírus eram genética e antigenicamente diferentes daqueles anteriormente conhecidos (Pellerin et al. 1994, Ridpath et al. 1994). Esse genótipo foi então denominado BVDV-2 e os isolados/cepas clássicas denominados BVDV-1. Posteriormente esses dois grupos genéticos foram reconhecidos como espécies virais distintas (ICTV 2017). À medida que isolados desse novo genótipo (ou espécie) foram sendo identificados em diferentes países, tornava-se evidente a necessidade de sua inclusão nas formulações vacinais. Assim, a composição das vacinas na maioria dos países onde há a circulação de BVDV-1 e

BVDV-2 inclui cepas das duas espécies (BVDV-1 e BVDV-2). Atualmente, pelo reconhecimento de 21 subtipos de BVDV-1 (a – u) e 4 subtipos de BVDV-2 (a – d), a inclusão de mais de um subtipo de BVDV-1 e BVDV-2 nas vacinas tem sido proposta/realizada nos Estados Unidos (Ridpath 2013). Nesse sentido, a identificação do HoBiPeV em vários países, e em especial, a constatação de seu status endêmico no Brasil (Flores et al. 2018), tem causado preocupação com relação à proteção vacinal, já que as vacinas comercializadas no Brasil contêm apenas BVDV-1 e BVDV-2.

Além das diferenças antigênicas entre HoBiPeV e BVDV-1/BVDV-2 (Decaro et al. 2011, Bauermann et al. 2012, Bauermann et al. 2013), isolados de HoBiPeV também apresentam diversidade antigênica entre si (Dias et al. 2017). Com isso, além da inclusão desse novo pestivírus na formulação de vacinas, a seleção de cepa representativa, que forneça proteção cruzada contra isolados de campo parece ser necessária.

Estudos prévios relatam a importância da relação entre a vacinação para BVDV e a indução de resposta imune que garanta proteção à doença, bem como proteção à infecção fetal, visto que a ocorrência de animais persistentemente infectados (PI) é fundamental para a manutenção de BVDV nos rebanhos. (Bolin et al. 1995, Newcomer et al. 2017, Baccilli et al. 2019). A indução de resposta por anticorpos neutralizantes por meio de vacinação tem papel fundamental na proteção à doença, dada a participação desses anticorpos nos mecanismos de neutralização e inativação da infectividade viral (Baccilli et al. 2019).

Vacinas inativadas induzem resposta primariamente humoral, dependendo de ao menos duas aplicações para a indução de títulos de anticorpos neutralizantes que garantam proteção (Bolin et al. 1995, Brownlie et al. 1995), enquanto vacinas atenuadas/vivas modificadas têm capacidade de induzir respostas humoral e celular, visto o potencial de replicação do vírus atenuado no animal vacinado (Endsley et al. 2003, Newcomer et al. 2017).

Os resultados obtidos a partir dos testes com as vacinas comerciais demonstraram que a VA foi capaz de induzir anticorpos neutralizantes com títulos considerados protetores (valores ≥ 60) frente a IBSP-4 (BVDV-1), SV323/04 (BVDV-2) e SV757/15 (HoBiPeV) para a maioria dos animais, sendo a resposta frente a SV323/04 significativamente superior à resposta para SV757 ($p < 0,05$). Já a VI foi capaz de induzir títulos protetores para IBSP-4 em apenas um animal e para SV323/04 em apenas dois animais. A avaliação das amostras de VA e VI em *pool* demonstraram que VA foi capaz de induzir títulos de anticorpos neutralizantes frente a 3/7 BVDV-1, 9/10 BVDV-2 e apenas um HoBiPeV (SV757/15), enquanto VI foi capaz de conferir títulos protetores frente a apenas um BVDV-1 (VS63) e um BVDV-2 (SV193/08).

A diferença da resposta entre essas vacinas pode ser explicada por 1) presença do agente replicativo na VA que, por preservar potencial de replicação no hospedeiro, pôde induzir maior estímulo em comparação ao agente inativado na VI; e 2) características antigênicas que possam desencadear resposta cruzada mais elevada entre os antígenos de VA e IBSP-4/SV323/04 em comparação com os antígenos de VI.

Embora não se tenha realizado testes frente a cepas padrão de BVDV, o presente estudo enfatizou a utilização de isolados brasileiros a fim retratar a realidade local de forma mais representativa.

Vários estudos foram realizados com o objetivo de elucidar o potencial de imunização promovido por vacinas comerciais para BVDV disponíveis no Brasil. Visando quantificar a resposta humoral e a proteção fetal de ovelhas vacinadas com três vacinas comerciais inativadas frente a BVDV-1 e BVDV-2, Vogel e colaboradores (2001) observaram que as três vacinas não induziram títulos protetores à viremia e à infecção fetal. Em estudo posterior (Vogel et al. 2002), foi avaliada a resposta humoral de bovinos vacinados com três vacinas comerciais inativadas frente a BVDV-1 e BVDV-2, quando se observou baixa indução de anticorpos neutralizantes visto as diferenças antigênicas entre cepas vacinais e isolados de campo.

No estudo de Lima e colaboradores (2005), se fez a avaliação da resposta humoral em bovinos proporcionada por uma vacina atenuada experimental em comparação a três vacinas inativadas comerciais frente a BVDV-1 e BVDV-2, quando se obteve indução de maiores títulos de anticorpos neutralizantes na vacina atenuada experimental em comparação com as vacinas inativadas comerciais para os vírus utilizados nos testes. Em estudo realizado por Anziliero e colaboradores (2015), foi realizada a avaliação da resposta humoral induzida por oito vacinas inativadas comerciais para BVDV frente a BVDV-1 e BVDV2, em que quatro vacinas não induziram resposta humoral neutralizante a BVDV-1 e cinco vacinas não induziram resposta a BVDV-2. No estudo de Dotto e colaboradores (2020 – dissertação de mestrado), avaliou-se a resposta humoral de bovinos vacinados com nove vacinas comerciais para BVDV frente a BVDV-1, BVDV-2 e HoBiPeV, em que se verificou maior indução de resposta neutralizante em animais vacinados com a vacina viva contendo BVDV-1 e BVDV-2.

Em estudo realizado por Baccilli e colaboradores (2019), avaliou-se a resposta humoral induzida por três vacinas comerciais frente a BVDV-1 e BVDV-2, com ênfase na contribuição de adjuvantes para indução de anticorpos neutralizantes. Foi observada diferença entre o tipo de adjuvante e a resposta humoral frente aos vírus utilizados nos testes.

Em relação aos testes com as vacinas experimentais, foi verificada a presença de títulos de anticorpos neutralizantes frente aos vírus homólogos a cada vacina. A VAC1 apresentou GMT significativamente maior para IBSP-4 em comparação com SV323/04 e SV757/15 ($p < 0,05$), uma vez que apresentava apenas BVDV-1 em sua composição, de maneira a não garantir reatividade cruzada frente SV323/04 (BVDV-2) e SV757/15 (e demais HoBiPeV) visto as diferenças antigênicas. Esta observação também se refletiu na avaliação do *pool* de amostras

de VAC1 frente aos demais BVDV-1, BVDV-2 e HoBiPeV, em que a resposta desencadeada por VAC1 gerou anticorpos neutralizantes frente a apenas 4/7 isolados de BVDV-1.

A VAC2 foi capaz de induzir títulos de anticorpos com valores de GMT acima de 60 para IBSP-4, SV323/04 e SV757/15, sendo que o GMT frente a SV323/04 foi significativamente superior aos valores de GMT de IBSP-4 e SV757/15 ($p < 0,05$). Embora não possuísse HoBiPeV em sua composição, a presença de um BVDV-2 pôde contribuir para o desencadear de reatividade cruzada com HoBiPeV devido às similaridades antigênicas, como fora proposto em estudos anteriores (Schirrmeier et al. 2004, Bauermann et al. 2012, Dias et al. 2017). A resposta do *pool* de amostras de VAC2 frente aos demais BVDV-1, BVDV-2 e HoBiPeV gerou títulos superiores a 60 para 4/7 isolados de BVDV-1, para todos os isolados de BVDV-2 e apenas dois isolados de HoBiPeV (LV01/12 e SV757/15). Estes resultados demonstram que VAC2 possui amplo espectro de reatividade frente a BVDV-2, porém não possibilita a indução de anticorpos neutralizantes frente a outros BVDV-1 e à maioria dos HoBiPeV brasileiros.

A VAC3 induziu valores de GMT acima de 60 para IBSP-4, SV323/04 e SV757/15, vírus homólogos aos utilizados na composição da vacina, sem diferença significativa entre as respostas ($p = 0,51$). No teste de amostras em *pool* frente aos demais isolados de BVDV-1, BVDV-2 e HoBiPeV, obteve-se títulos protetores de anticorpos neutralizantes frente a todos os vírus utilizados na avaliação. A escolha de SV757/15 para a composição de VAC3 se deve à reatividade cruzada e similaridade antigênica de valores consideráveis em relação à maioria das cepas de HoBiPeV utilizadas no teste, ambas verificadas em estudo anterior (Dias et al. 2017).

O presente estudo pôde evidenciar o potencial de utilização de cepas/isolados de BVDV em vacinas vivas modificadas, dada a geração de títulos de anticorpos neutralizantes de caráter protetor em VA, VAC1, VAC2 e VAC3 frente a diferentes cepas/isolados de BVDV em comparação a VI, que não induziu títulos protetores frente aos vírus testados. Estudos anteriores apontam como vantajosa a utilização de vacinas vivas modificadas de BVDV em razão do estímulo ao desencadear de resposta humoral semelhante à infecção natural, dado o potencial de replicação do agente vacinal (Bolin 1995, Fulton et al. 2003, Lima et al. 2005).

A participação da resposta celular frente ao estímulo das vacinas experimentais também pode ser explorada em experimentos futuros. Em estudo realizado por Endsley e colaboradores (2003), foi verificada a indução de resposta imune celular para vacina viva modificada de BVDV em bezerros que recebiam colostro, sem manifestação de resposta imune humoral. Em estudo posterior (Platt et al. 2009), verificou-se a indução de resposta imune celular (linfócitos CD4+, CD8+ e $\gamma\delta$) em bezerros de 1 a 8 semanas de idade que recebiam colostro e foram vacinados com uma vacina comercial viva modificada para BVDV-1 e BVDV-2, com proteção frente ao desafio de BVDV-2, mostrando a importância do estímulo à imunidade celular desencadeada por vacina viva modificada de BVDV.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos indicam que vacinas contendo apenas BVDV-1 e BVDV-2, especialmente inativadas, podem não conferir proteção heteróloga contra isolados de HoBiPeV. Assim, em populações bovinas onde ocorra a circulação dos três pestivírus, a inclusão de cepas de HoBiPeV é recomendável, pois iria resultar em resposta sorológica de espectro mais amplo, conferindo proteção contra as três espécies de pestivírus bovino.

Agradecimentos.- Os autores são gratos à Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao apoio e financiamento parcial da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasil - Código financeiro 001.

Declaração de conflito de interesse.- Os autores não possuem conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

- Anziliero D., Martins M., Weiss M., Monteiro F.L., Ataíde C.F., Weiblen R. & Flores E.F. 2015. Resposta sorológica aos herpesvirus bovino tipos 1 e 5 e vírus da diarreia viral bovina induzida por vacinas comerciais. *Ciência Rural* 45(1): 58–63. <<http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20130167>>
- Baccili C., Martin C.C., Silva K.N., Nichi M., Flores E.F., Vercesi Filho A.E., Pituco E.M. & Gomes V. 2019. Serological response against bovine herpesvirus and bovine viral diarrhoea virus induced by commercial vaccines in Holstein heifers. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 39 (11): 870–878. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-5150-pvb-6208>
- Baker J.C. 1995. The clinical manifestations of bovine viral diarrhoea infection. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 11 (3): 425-445. <[http://dx.doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30460-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30460-6)>.

- Bauermann, F.V, Flores, E.F. & Ridpath, J.F. 2012. Antigenic relationships between Bovine viral diarrhoea virus 1 and 2 and HoBi virus: Possible impacts on diagnosis and control. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 24 (2): 253-261. <<http://dx.doi.org/10.1177/1040638711435144>>
- Bauermann, F.V., Harmon A., Flores E.F., Falkenberg S.M., Reedy J.M. & Ridpath J.F. 2013. In vitro neutralization of HoBi-like viruses by antibodies in serum of cattle immunized with inactivated or modified live vaccines of bovine viral diarrhoea viruses 1 and 2. *Veterinary Microbiology* 166: 242-245. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.04.032>>
- Becher P., Orlich M., Shannon A.D., Horner G., König M. & Thiel H.J. 1997. Phylogenetic analysis of pestiviruses from domestic and wild ruminants. *Journal of General Virology* 78 (6): 1357-1366. <<https://doi.org/10.1099/0022-1317-78-6-1357>>
- Bianchi E., Martins M., Weiblen R. & Flores E.F. 2011. Perfil genotípico e antigênico de amostras do vírus da diarréia viral bovina isoladas no Rio Grande do Sul (2000-2010). *Pesquisa Veterinária Brasileira* 31 (8): 649-655. <<https://doi.org/10.1590/S0100-736X2011000800003>>
- Bolin, S.R. 1995. Control of bovine viral diarrhoea infection by use of vaccination. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 11 (3): 615-625. <[https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30470-9](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30470-9)>
- Brownlie J., Clarke M.C., Hooper L.B. & Bell G.D. 1995. Protection of the bovine fetus from bovine viral diarrhoea virus by means of a new inactivated vaccine. *The Veterinary Record* 137: 58-62. <<https://doi.org/10.1136/vr.137.3.58>>
- Corapi W.V., Donis R.O. & Dubovi E.J. 1990. 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* 51 (9): 1388-1394. <PMID: 2168687>
- Cortez, A., Heinemann, M. B., Castro, A. M. de, Soares, R. M., Pinto, A. M. V., Alfieri, A. A., Flores, E. F., Leite, R. C. & Richtzenhain, L. J. 2006. Genetic characterization of Brazilian bovine viral diarrhoea virus isolates by partial nucleotide sequencing of the 5'-UTR region. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 26, 211-216. <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2006000400005&lng=en&nrm=iso>
- Cruz R.A.S., Rodrigues W.B., Silveira S., Oliveira V.H.S., Campos C.G., Leite Filho R.V., Boabaid F.M., Driemeier D., Canal C.W., Alfieri A.A., Pescador C.A., Colodel E.M. 2018. Mucosal disease-like lesions caused by HoBi-like pestivirus in Brazilian calves in 2010-2011: Clinical, pathological, immunohistochemical, and virological characterization. *Research in Veterinary Science* 119: 806-808. <<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2018.06.010>>
- Decaro N., Lucente M.S., Mari V., Cirone F., Cordioli P., Camero M., Sciarretta R., Losurdo M., Lorusso E. & Buonavoglia C. 2011. Atypical Pestivirus Respiratory Disease in Calves, Europe. *Emerging Infectious Diseases* 17 (8): 1549-1552. <<https://doi.org/10.3201/eid1708.101447>>
- Decaro N., Mari V., Sciarretta R., Lucente M.S., Camero M., Losurdo M., Larocca V., Colao V., Cavaliere N., Lovero A., Lorusso E. & Buonavoglia C. 2013. Comparison of the cross-antibody response induced in sheep by inactivated bovine viral diarrhoea virus 1 and HoBi-like pestivirus. *Research in Veterinary Science* 94: 806-808. <<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.11.016>>
- Decaro N., Lanave G., Lucente M.S., Mari V., Varello K., Losurdo M., Larocca V., Bozzetta E., Cavaliere N., Martella V. & Buonavoglia C. 2014. Mucosal disease-like syndrome in a calf persistently infected by HoBi-like pestivirus. *Journal of Clinical Microbiology* 52 (8): 2946-2954. <<https://doi.org/10.1128/JCM.00986-14>>
- Decaro N., Losurdo M., Larocca V., Lucente M.S., Mari V., Varello K., Patruno G., Camero M., Sciarra M., Occhiogrosso L., Tempesta M., Iulini B. & Buonavoglia C. 2015. HoBi-like pestivirus experimental infection in pregnant ewes: reproductive disorders and generation of persistently infected lambs. *Veterinary Microbiology* 178: 173-180. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.05.011>>
- Decaro N. 2020. HoBi-like pestivirus and reproductive disorders. *Frontiers in Veterinary Science* 7: 1-5. <<https://doi.org/10.3389/fvets.2020.622447>>

- Dias R.K., Carnelutti J.F., Weber M.N., Canal C.W., Bauermann F.V., Ridpath J.F., Weiblen R. & Flores E.F. 2017. Antigenic diversity of Brazilian isolates of HoBi-like pestiviruses. *Veterinary Microbiology* 203: 221–228. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.03.021>>
- Dotto E.K., 2020. Indução de anticorpos neutralizantes contra herpesvírus bovino e vírus da diarreia viral bovina por vacinas comerciais e vacina experimental associado com diferentes adjuvantes. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Maria. 84p.
- Endsley J.J., Roth J.A., Ridpath J. & Neill J. 2003. Maternal antibody blocks humoral but not T cell responses to BVDV. *Biologicals* 31: 123–125. <[http://dx.doi.org/10.1016/S1045-1056\(03\)00027-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1045-1056(03)00027-7)>
- Flores E.F., Weiblen R., Vogel F. S.F., Roehe P.M. & Alfieri, A.A. 2005. A infecção pelo vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV) no Brasil Viral – histórico, situação atual e perspectivas. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 25 (3): 125–134. <<https://doi.org/10.1590/S0100-736X2005000300002>>
- Flores E.F., Cargnelutti J.F., Monteiro F.L., Bauermann F.V & Ridpath, J.F. 2018. A genetic profile of bovine pestiviruses circulating in Brazil (1998 – 2018). *Animal Health Research Reviews* 19: 134-141. <<https://doi.org/10.1017/S1466252318000130>>
- Fulton R. W., Saliki J. T., Burge L. J. & Payton M. E. 2003. Humoral immune response and assessment of vaccine virus shedding in calves receiving modified live virus vaccines containing bovine herpesvirus-1 and bovine viral diarrhoea virus 1a. *Journal of Veterinary Medicine, Series B* 50 (1): 31–37. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0450.2003.00608.x>
- Hoppe I.B.A.L, Souza-Pollo A., Medeiros A.S.R., Samara I.S. & Carvalho A.A.B. 2019. HoBi-like pestivirus infection on an outbreak of bovine respiratory disease. *Research in Veterinary Science* 126: 184-191. <<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2019.09.003>>
- Howard C. J., Clarke M. C. & Brownlie J. 1989. Protection Against Respiratory Infection with Bovine Virus Diarrhoea Virus by Passively Acquired Antibody. *Veterinary Microbiology* 19: 195–203. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(89\)90066-7](https://doi.org/10.1016/0378-1135(89)90066-7)
- ICTV (2017) Taxonomy History, Pestivirus B. International Committee of Taxonomy of Virus. <<https://talk.ictvonline.org/ictv/proposals/ICTV%207th%20Report.pdf>>
- ICTV (2020) Flaviviridae. International Committee of Taxonomy of Viruses. <<http://www.ictvonline.org>>
- Larska M., Polak M.P., Riitho V., Strong R., Belák S., Alenius S., Uttenthal Å., Liu L. Kinetics of single and dual infection of calves with an asian atypical bovine pestivirus and a highly virulent strain of bovine viral diarrhoea virus 1. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 35 (4): 381-390. <<https://doi.org/10.1016/j.cimid.2012.03.003>>
- Lima M., Flores E.F. & Weiblen R. 2005. Anticorpos neutralizantes contra o vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV): comparação entre um imunógeno experimental atenuado e três vacinas comerciais inativadas. *Ciência Rural* 35 (1): 230–234. <<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782005000100039>>
- Newcomer B.W., Chamorro M.F. & Walz, P.H. 2017. Vaccination of cattle against bovine viral diarrhoea virus. *Veterinary Microbiology* 206: 78-83. <<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.04.003>>
- Pellerin C., Hurk J., Lecomite J. & Tijssen P. 1994. Identification of a New Group of Bovine Viral Diarrhoea Virus Strains Associated with Severe Outbreaks and High Mortalities. *Virology* 203: 260-268. <<https://doi.org/10.1006/viro.1994.1483>>
- Platt R., Widell P.W., Kesl L.D. & Roth, J. A. Comparison of humoral and cellular immune responses to a pentavalent modified live virus vaccine in three age groups of calves with maternal antibodies, before and after BVDV type 2 challenge. *Vaccine* 27: 4508–4519 (2009). <<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.05.012>>

- Ridpath J.F., Bolin S.R. & Dubovi, J. 1994. Segregation of Bovine Viral Diarrhea Virus into Genotypes. *Virology* 205, 66–74. <<https://doi.org/10.1006/viro.1994.1620>>
- Ridpath J.F. 2013. Immunology of BVDV vaccines. *Biologicals* 41 (1): 14-19. <<https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2012.07.003>>
- Schirrmeier H., Depner K., Hoffmann B. & Beer M. 2004. Communication Genetic and antigenic characterization of an atypical pestivirus isolate , a putative member of a novel pestivirus species. *Journal of General Virology* 85: 3647–3652. <<https://doi.org/10.1099/vir.0.80238-0>>
- Silveira M.S., Weber M.N., Mósena C.S., Silva M.S., Streck A.F., Pescador C.A., Flores E.F., Weiblen R., Driemeier D., Ridpath J.F. & Canal C.W. 2015. Genetic Diversity of Brazilian Bovine Pestiviruses Detected Between 1995 and 2014. *Transboundary and Emerging Diseases* 64 (2): 613-623. <<https://doi.org/10.1111/tbed.12427>>
- Tautz N., Tews B.A., Meyers G. 2015. The Molecular Biology of Pestiviruses, p. 47–160. In: *Advances in Virus Research*. Vol. 93. Academic Press Inc., Cambridge.
- Thrusfield M. 1986. Serological epidemiology, p. 280. In: *Veterinary Epidemiology*.. Butterworth & Co. Ltd., Londres.
- van Rijn P.A. 2007. A common neutralizing epitope on envelope glycoprotein E2 of different pestiviruses : Implications for improvement of vaccines and diagnostics for classical swine fever (CSF). *Veterinary Microbiology* 125: 150–156. <<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.05.001>>
- Vogel F.S.F., Scherer C.F.C., Flores E.F., Weiblen R., Lima M. & Kunrath C.F. 2001. Resposta Sorológica e Avaliação de Proteção Fetal em Ovelhas Prenhes Vacinadas contra o Vírus da Diarréia Viral Bovina. *Ciência Rural* 31 (5): 831–838. <<https://doi.org/10.1590/S0103-84782001000500015>>
- Vogel F.S.F., Flores E.F., Weiblen R., Mayer S.V., Quadros V.L & Oldoni I. 2002. Magnitude duration and specificity of the serological response in cattle vaccinated against bovine viral diarrhea virus (BVDV). *Ciência Rural* 32 (1): 83–89. <<https://doi.org/10.1590/S0103-84782002000100015>>
- Weber M.N., Mósena A.C.S., Simões S.V.D., Almeida L.L., Pessoa C.R.M., Budaszewski R.F., Silva T.R., Ridpath J.F., Riet-Correa F., Driemeier D. & Canal C.W. 2016. *Transboundary and Emerging Diseases* 63 (1): 92-100. <<http://dx.doi.org/10.1111/tbed.12223>>.

Quadro 1. Anticorpos neutralizantes contra BVDV-1, BVDV-2 e HoBiPeV induzidos pelas vacinas comerciais.

Vacina	Animal	Título neutralizante frente a:		
		BVDV-1 (IBSP-4)	BVDV-2 (SV323/04)	HoBiPeV (SV757/15)
Vacina A (atenuada)	7040	320	80	40
	7042	80	320	80
	7044	40	160	80
	7076	320	640	160
	7057	80	640	160
	7120	80	320	80
	7121	40	320	40
	GMT	97,5^{AB*}	289,8^A	80^B
Vacina I (inativada)	7007	20	20	≤10
	7038	10	40	≤10
	7051	10	40	≤10
	7089	10	80	≤10
	7128	20	20	20
	7164	80	640	≤10
	7165	10	40	10
	GMT	16,4^{AB}	53,8^A	12,2^B

*Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre valores de título geométrico (GMT) frente aos vírus avaliados para a mesma vacina no Teste de Friedmann-Dunn.

Quadro 2. Anticorpos neutralizantes contra BVDV-1, BVDV-2 e HoBiPeV induzidos pelas vacinas experimentais.

Vacina	Animal	Título neutralizante frente a:		
		BVDV-1 (IBSP-4)	BVDV-2 (SV323/04)	HoBiPeV (SV757/15)
Vacina 1	51	320	20	<10
	52	640	<10	10
	53	320	<10	<10
	54	640	<10	<10
	55	160	<10	10
	56	160	<10	10
	57	320	<10	<10
	58	320	<10	<10
	59	320	<10	10
	GMT	320^A	<10^B	<10^B
Vacina 2	61	160	640	160
	62	320	640	40
	63	160	320	40
	64	80	640	160
	65	160	320	320
	66	160	640	160
	67	160	1280	80
	68	320	1280	160
	69	80	640	80
	GMT	160^B	640^A	108,5^B
Vacina 3	1	160	80	80
	2	640	320	320
	3	640	160	160
	4	320	80	160
	5	160	320	640
	6	160	1280	160
	7	160	1280	1280
	8	160	640	80
	9	160	160	80
	10	160	160	80
	GMT	234,3^A	294,5^A	201,1^A

*Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre valores de título geométrico médio (GMT) frente aos vírus avaliados para a mesma vacina no Teste de Friedmann-Dunn.

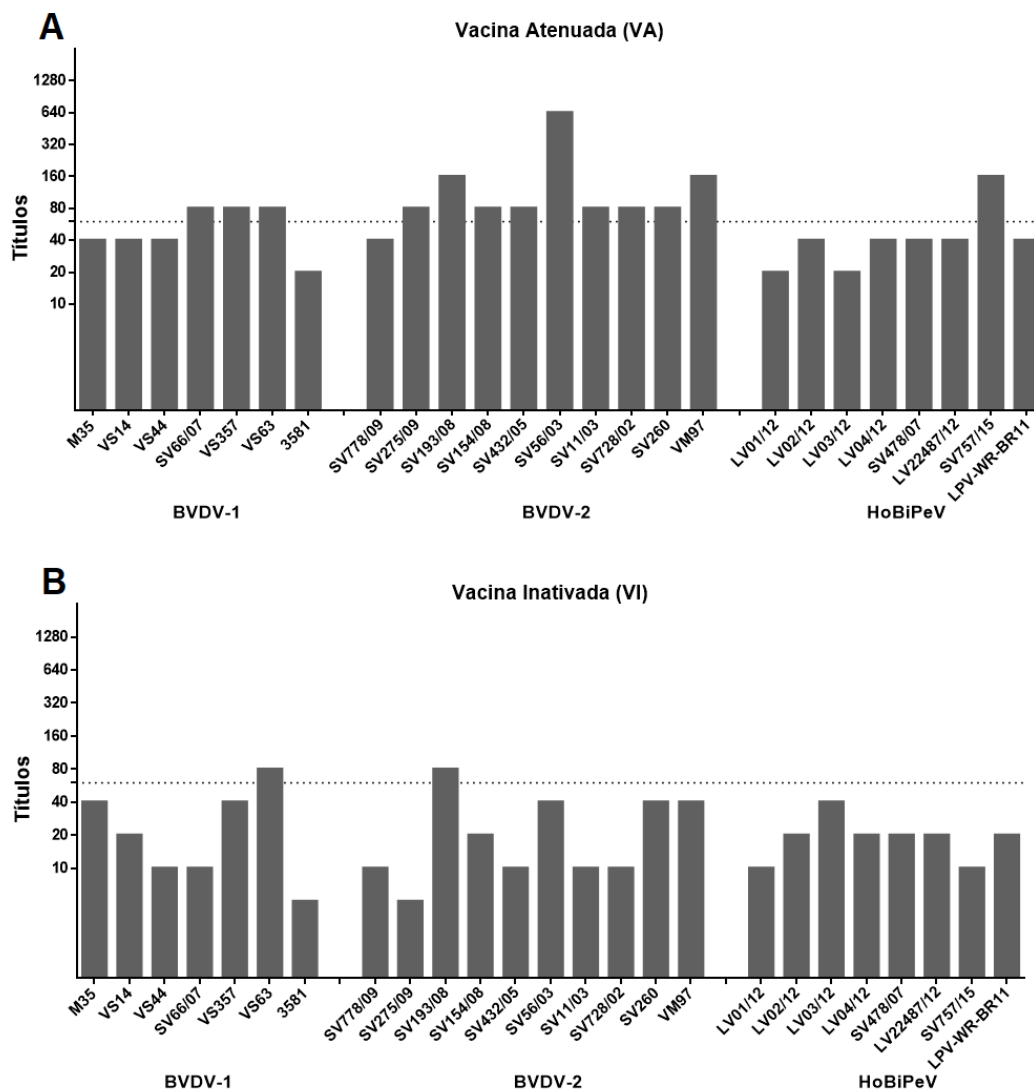


Fig 1. Títulos de anticorpos neutralizantes no *pool* de soro de animais imunizados com vacinas comerciais (**1A**: Vacina atenuada [VA]; **1B**: Vacina inativada [VI]) frente às cepas/isolados de BVDV-1. A linha pontilhada indica título de 60, mínimo para conferir proteção à doença clínica (Howard et al., 1989).

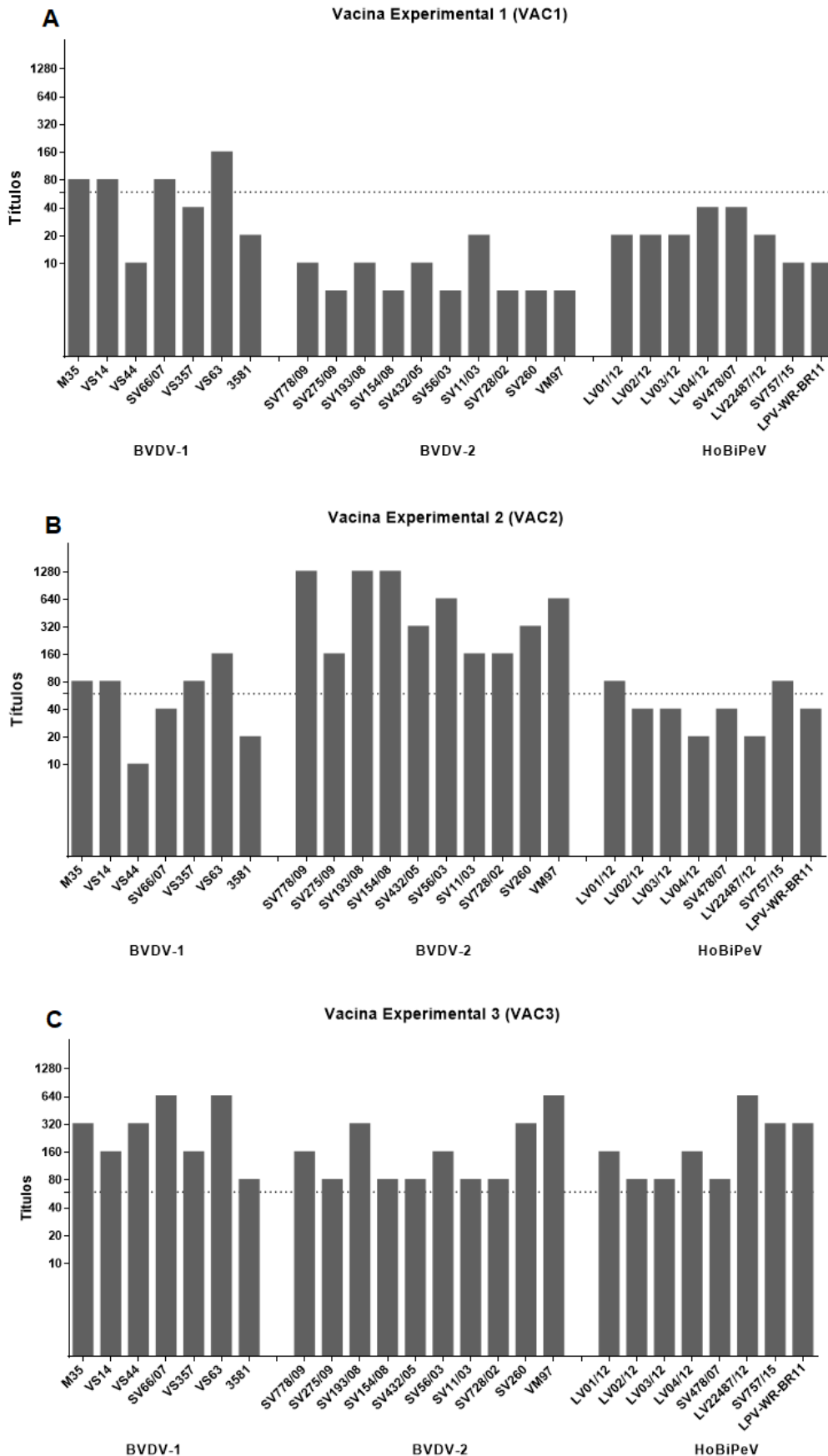


Fig 2. Títulos de anticorpos neutralizantes no pool de soro de animais imunizados com vacinas experimentais (**2A** [VAC1]: Vacina monovalente [IBSP.4 - BVDV-1]; **2B** [VAC2]: Vacina bivalente [IBSP.4 - BVDV-1 + SV323/04 - BVDV-2]; **2C** [VAC3]: Vacina trivalente [IBSP.4 - BVDV-1 + SV323/04 - BVDV-2 + SV757/15 - HoBiPeV]) frente às cepas/isolados de BVDV-2. A linha pontilhada indica título de 60, mínimo para conferir proteção à doença clínica (Howard et al., 1989).

4. CONCLUSÃO

Reforçando achados anteriores baseados em testes de reatividade sorológica advinda de imunização com vacinas comerciais e experimentais para BVDV frente a diferentes isolados de BVDV-1, e BVDV-2 e HoBiPeV (Bauermann et al., 2012; 2013; Dias et al., 2017; Dotto et al., 2020), o presente estudo pôde evidenciar a influência da composição antigênica e do tipo da vacina em relação à indução de resposta imune neutralizante em títulos protetores, em especial à utilização de vacina atenuada contendo vírus HoBiPeV. Tendo em vista que estes vírus possuem alta prevalência nas populações de bovinos do Brasil e não estão presentes em formulações de vacinas comerciais disponíveis no mercado nacional (Flores et al., 2018), o presente estudo sugere que a inclusão de cepas HoBiPeV nas vacinas amplie o espectro de reatividade cruzada frente a cepas heterólogas de pestivírus bovino.

5. REFERÊNCIAS

- ANZILIERO, D. *et al.* Resposta sorológica aos herpesvírus bovino tipos 1 e 5 e vírus da diarreia viral bovina induzida por vacinas comerciais. **Ciência Rural**, 2015. v. 45, n. 1, p. 58–63. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20130167>>.
- ARENHART, S. *et al.* Proteção fetal contra o vírus da diarréia viral bovina (BVDV) em vacas prenhes previamente imunizadas com uma vacina experimental atenuada. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 2008. v. 28, n. 10, p. 461–470. Disponível em: <<https://www.scielo.br/pdf/pvb/v28n10/v28n10a04.pdf>>.
- BACCILI, C. C. *et al.* Serological response against bovine herpesvirus and bovine viral diarrhoea virus induced by commercial vaccines in Holstein heifers 1. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 2019. v. 39, n. 11, p. 870–878. Disponível em: <10.1590/1678-5150-PVB-6208>.
- BACHOFEN, C. *et al.* Clinical appearance and pathology of cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus of different genetic subgroups. **Veterinary Microbiology**, 2010. v. 141, n. 3–4, p. 258–267.
- BAKER, J. C. The clinical manifestations of bovine viral diarrhoea infection. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice.**, 1995. v. 11, n. 3, p. 425–445. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30460-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30460-6)>.
- BAUERMAN, F. V; FLORES, E. F.; RIDPATH, J. F. Antigenic relationships between Bovine viral diarrhoea virus 1 and 2 and HoBi virus : Possible impacts on diagnosis and control. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, 2012. v. 24, n. 2, p. 253–261. Disponível em: <<https://doi.org/10.1177/1040638711435144>>.

BAUERMANN, F. V *et al.* In vitro neutralization of HoBi-like viruses by antibodies in serum of cattle immunized with inactivated or modified live vaccines of bovine viral diarrhoea viruses 1 and 2. **Veterinary Microbiology**, 2013. v. 166, n. 1–2, p. 242–245. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.04.032>>.

BECHER, P.; TAUTZ, N. RNA recombination in pestiviruses: Cellular RNA sequences in viral genomes highlight the role of host factors for viral persistence and lethal disease. **RNA Biology**, 2011. v. 8, n. 2, p. 216–224. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4161/rna.8.2.14514>>.

BIANCHI, E. *et al.* Perfil genotípico e antigênico de amostras do vírus da diarréia viral bovina isoladas no Rio Grande do Sul (2000-2010) 1. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 2011. v. 31, n. 8, p. 649–655. Disponível em: <<https://www.scielo.br/pdf/pvb/v31n8/a03v31n8.pdf>>.

BITSCH, V.; RØNSHOLT, L. Control of bovine viral diarrhoea virus infection without vaccines. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, 1995. v. 11, n. 3, p. 627–640. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30471-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30471-0)>.

BLOME, S. *et al.* Classical swine fever—an updated review. **Viruses**, 2017. v. 9, n. 4, p. 1–24. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3390/v9040086>>.

BOLIN, S. R.; RIDPATH, J. F. Specificity of neutralizing and precipitating antibodies induced in healthy calves by monovalent modified-live bovine viral diarrhoea virus vaccines. **American Journal of Veterinary Research**, 1989. v. 50, n. 6, p. 817-821. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2548419/>>.

BOLIN, S.R. Immunogens of bovine viral diarrhoea virus. **Veterinary Microbiology**, 1993. v. 37, p. 263-271. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0378-1135\(93\)90028-6](https://doi.org/10.1016/0378-1135(93)90028-6)>.

BOLIN, S. R. Control of bovine viral diarrhoea infection by use of vaccination. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, 1995. v. 11, n. 3, p. 615–25. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30470-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30470-9)>.

BOLIN, S. R.; RIDPATH, J. F. Assessment of protection from systemic infection or disease afforded by low to intermediate titers of passively acquired neutralizing antibody against bovine viral diarrhoea virus in calves. **American Journal of Veterinary Research**, 1995. v. 56, n. 6, p. 755-759. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7653884/>>.

BOTTON, S. A. *et al.* Caracterização preliminar de amostras do vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV) isoladas no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 1998. v. 18, n. 2, p. 84–92. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/s0100-736x1998000200008>>.

BRAUN, U. *et al.* Border disease in cattle. **Veterinary Journal**, 2019. v. 246, p. 12–20. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2019.01.006>>.

BRODERSEN, B. W. Bovine Viral Diarrhoea Virus Infections: Manifestations of Infection and Recent Advances in Understanding Pathogenesis and Control. **Veterinary Pathology**, 2014. v. 51, n. 2, p. 453–464. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1177/0300985813520250>>.

BROWN, T. T.; BISTNER, S. I.; DELAHUNTA, A. Pathogenetic studies of infection of the bovine fetus with bovine viral diarrhoea virus. I. Cerebellar Atrophy. **Veterinary Pathology**, 1974. v. 11, n. 6, p. 486–505. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1177/030098587401100604>>.

BROWN, T. T.; BISTNER, S. I.; DELAHUNTA, A. Pathogenetic studies of infection of the bovine fetus with bovine viral diarrhoea virus. II. Ocular lesions. **Veterinary Pathology**, 1975. v. 12, n. 5–6, p. 394–404. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1177/0300985875012005-00606>>.

- BROWNLIE, J. The pathogenesis of bovine virus diarrhoea virus infection. **Revue Scientifique et Technique de l'OIE**, 1990. v. 9, n. 1, p. 43–59. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.20506/rst.9.1.491>>.
- BRUM, M. C. S. *et al.* Proteção fetal frente a desafio com o vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV) em ovelhas imunizadas com duas amostras de vírus modificadas experimentalmente. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 2002. v. 22, n. 2, p. 64–72. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/s0100-736x2002000200006>>.
- CANAL, C. W. *et al.* Detection of antibodies to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and characterization of genomes of BVDV from Brazil. **Veterinary Microbiology**, 1998. v. 63, n. 2–4, p. 85–97. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1135\(98\)00232-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1135(98)00232-6)>.
- CHILDS, T. X Disease of Cattle - Saskatchewan. **Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science**, 1946. v. 10, n. 11, p. 316–9. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17648222>0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1661174>.
- CHIMENO ZOTH, S.; TABOGA, O. Multiple recombinant ELISA for the detection of bovine viral diarrhoea virus antibodies in cattle sera. **Journal of Virological Methods**, 2006. v. 138, p. 99–108. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.07.025>>.
- COLLETT, M. S. *et al.* Proteins Encoded by Bovine Viral Diarrhea Virus : The Genomic Organization of a Pestivirus. **Virology**, 1988. v. 165, p. 200–208. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/0042-6822\(88\)90673-3](http://dx.doi.org/10.1016/0042-6822(88)90673-3)>.
- CORIA, M. F.; McCLURKIN, A. W. Specific immune tolerance in an apparently healthy bull persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, 1978. v. 172, n. 4, p.449-451. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/203564/>>.
- CORTEZ, A. *et al.* Genetic characterization of Brazilian bovine viral diarrhoea virus isolates by partial nucleotide sequencing of the 5'-UTR region. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 2006. v. 26, n. 4, p. 211–216. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2006000400005>>.
- DECARO, N. *et al.* Atypical Pestivirus Respiratory Disease in Calves , Europe. **Emerging Infectious Diseases**, 2011. v. 17, n. 8, p. 1549–1552. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3201/eid1708.101447>>.
- DECARO, N. *et al.* HoBi-like pestivirus experimental infection in pregnant ewes: Reproductive disorders and generation of persistently infected lambs. **Veterinary Microbiology**, 2015. v. 178, n. 3–4, p. 173–180. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.05.011>>.
- DENG, M. *et al.* Prevalence study and genetic typing of Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) in four bovine species in China. **PLoS ONE**, 2015. v. 10, n. 4, p. 1–16. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0121718>>.
- DEREGT, D. *et al.* Mapping of a type 1-specific and a type-common epitope on the E2 (gp53) protein of bovine viral diarrhoea virus with neutralization escape mutants. **Virus Research**, 1998. v. 53, p. 763–772. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1702\(97\)00129-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1702(97)00129-9)>.
- DIAS, R. K. *et al.* Antigenic diversity of Brazilian isolates of HoBi-like pestiviruses. **Veterinary Microbiology**, 2017. v. 203, p. 221–228. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.03.021>>.

DOTTO, E.K. **Indução de anticorpos neutralizantes contra herpesvírus bovino e vírus da diarreia viral bovina por vacinas comerciais e vacina experimental associado com diferentes adjuvantes**. 2020. 84p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)-Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2020.

DUBOVI, E. J. Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhoea virus. **Biologicals**, 2013. v. 41, n. 1, p. 8–13. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biologicals.2012.06.004>>.

ENDSLEY, J. J. *et al.* Maternal antibody blocks humoral but not T cell responses to BVDV. **Biologicals**, 2003. v. 31, p. 123–125. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1045-1056\(03\)00027-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1045-1056(03)00027-7)>.

EVANS, C. A. *et al.* Global knowledge gaps in the prevention and control of bovine viral diarrhoea (BVD) virus. **Transboundary and Emerging Diseases**, 2018. v. 66, n. 2, p. 640–652. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/tbed.13068>>.

FLORES, E. F. *et al.* A infecção pelo vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV) no Brasil - histórico, situação atual e perspectivas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 2005. v. 25, n. 3, p. 125–134. Disponível em: <<https://www.scielo.br/pdf/pvb/v25n3/a02v25n3.pdf>>.

FLORES, E. F. *et al.* A genetic profile of bovine pestiviruses circulating in Brazil (1998 – 2018). **Animal Health Research Reviews**, 2018. v. 19, p. 134–141. Disponível em: <<https://doi.org/10.1017/S1466252318000130>>.

FULTON, R. W. *et al.* Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) subgenotypes in diagnostic laboratory accessions: Distribution of BVDV1a, 1b, and 2a subgenotypes. **Veterinary Microbiology**, 2005. v. 111, n. 1–2, p. 35–40. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.10.002>>.

GIAMMARIOLI, M. *et al.* Genetic detection and characterization of emerging HoBi-like viruses in archival foetal bovine serum batches. **Biologicals**, 2015. v. 43, n. 4, p. 220–224. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biologicals.2015.05.009>>.

GILLESPIE, J. H.; BAKER, J. A.; MCENTEE, K. A Cytopathogenic Strain of Virus Diarrhoea Virus. **The Cornell Veterinarian**, 1960. v. 50, p. 73–79. Disponível em: <<https://babel.hathitrust.org/cgi/pt?id=uc1.b3779835&view=1up&seq=83>>.

GOTTIPATI, K. *et al.* The Structure of Classical Swine Fever Virus Npro: A Novel Cysteine Autoprotease and Zinc-Binding Protein Involved in Subversion of Type I Interferon Induction. **PLoS Pathogens**, 2013. v. 9, n. 10. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1003704>>.

GRIEBEL, P. J. BVDV vaccination in North America: Risks versus benefits. **Animal Health Research Reviews**, 2015. v. 16, n. 1, p. 27–32. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1017/S1466252315000080>>.

HILBE, M. *et al.* Comparison of five diagnostic methods for detecting bovine viral diarrhoea virus infection in calves. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, 2007. v. 19, n. 1, p. 28–34. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1177/104063870701900105>>.

HOUE, H. Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections. **Veterinary Microbiology**, 1999. v. 64, n. 2–3, p. 89–107. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1135\(98\)00262-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1135(98)00262-4)>.

HOUE, H.; LINDBERG, A.; MOENNIG, V. Test strategies in bovine viral diarrhoea virus control and eradication campaigns in Europe. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, 2006. v. 18, n. 5, p. 427–436. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1177/104063870601800501>>.

HOWARD, C. J.; CLARKE, M. C.; BROWNLIE, J. Protection Against Respiratory Infection with Bovine Virus Diarrhoea Virus by Passively Acquired Antibody. **Veterinary Microbiology**, 1989. v. 19, p. 195–203. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0378-1135\(89\)90066-7](https://doi.org/10.1016/0378-1135(89)90066-7)>.

ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. 2012. Disponível em: <<https://talk.ictvonline.org/>>.

IQBAL, M. *et al.* Role for Bovine Viral Diarrhea Virus Erns Glycoprotein in the Control of Activation of Beta Interferon by Double-Stranded RNA. **Journal of Virology**, 2004. v. 78, n. 1, p. 136–145. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/jvi.78.1.136-145.2004>>.

JARDIM, J. C. *et al.* Respiratory signs, fever and lymphopenia in calves inoculated with Brazilian HoBi-like pestiviruses. **Microbial Pathogenesis**, 2018. v. 123, p. 264–268. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.07.024>>.

KREUTZ, L. C. *et al.* Production and characterization of monoclonal antibodies to Brazilian isolates of bovine viral diarrhoea virus. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 2000. v. 33, n. 12, p. 1459–1466. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-879X2000001200010>>.

LANYON, S. R. *et al.* Bovine viral diarrhoea: Pathogenesis and diagnosis. **Veterinary Journal**, 2014. v. 199, n. 2, p. 201–209. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.07.024>>.

LI, Y. *et al.* Crystal structure of glycoprotein E2 from bovine viral diarrhoea virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2013. v. 110, n. 17, p. 6805–6810. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1300524110>>.

LIMA, M. *et al.* Caracterização de amostras atenuadas do vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV) tipos 1 e 2 para uso em vacinas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 2004. v. 24, n. 1, p. 35–42. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/s0100-736x2004000100009>>.

LIMA, M.; FLORES, E. F.; 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. v. 35, n. 1, p. 230–234. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0103-84782005000100039>>.

LINDBERG, A. L. E.; ALENIUS, S. Principles for eradication of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections in cattle populations. **Veterinary Microbiology**, 1999. v. 64, n. 2–3, p. 197–222. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1135\(98\)00270-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1135(98)00270-3)>.

LINDBERG, A. *et al.* The control of bovine viral diarrhoea virus in Europe: today and in the future. **Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)**, 2006. v. 25, n. 3, p. 961–79. Disponível em: <https://doc.oie.int/seam/resource/directMedia/A3_ZodyrXj9cqUZI4vH2Za7JrEUSWFGw?binaryFileId=9647&cid=4715>.

LIU, L. *et al.* Phylogeny, classification and evolutionary insights into pestiviruses. **Virology**, 2009a. v. 385, n. 2, p. 351–357. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2008.12.004>>.

LIU, L. *et al.* Virus recovery and full-length sequence analysis of atypical bovine pestivirus Th/04_KhonKaen. **Veterinary Microbiology**, 2009b. v. 138, n. 1–2, p. 62–68. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.03.006>>.

- MAURER, K. *et al.* CD46 Is a Cellular Receptor for Bovine Viral Diarrhea Virus. **Journal of Virology**, 2004. v. 78, n. 4, p. 1792–1799. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/jvi.78.4.1792-1799.2004>>.
- MERCHIORATTO, I. *et al.* Immunogenicity in sheep of Uruguayan commercial vaccines against bovine alphaherpesvirus 1, 5 and bovine pestiviruses. **Ciência Rural**, 2020. v. 50, n. 4, p. 1–7. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20190465>>.
- MEYLING, A.; HOUE, H.; JENSEN, A. M. Epidemiology of bovine virus diarrhoea virus. **Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)**, 1990. v. 9, n. 1, p. 75–93. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.20506/rst.9.1.489>>.
- 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**, 2018. v. 38, n. 3, p. 387–392. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-5283>>.
- MONTEIRO, F. L. *et al.* Detection of bovine pestiviruses in sera of beef calves by a RT-PCR based on a newly designed set of pan-bovine pestivirus primers. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, 2019. v. 31, n. 2, p. 255–258. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1177/1040638719826299>>.
- MU, Y.; BINTINTAN, I.; MEYERS, G. Downstream Sequences Control the Processing of the Pestivirus Erns-E1 Precursor. **Journal of Virological Methods**, 2021. v. 95, n. 1, p. 1–17. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1128/JVI.01905-20>>.
- NEWCOMER, B. W.; CHAMORRO, M. F.; WALZ, P. H. Vaccination of cattle against bovine viral diarrhoea virus. **Veterinary Microbiology**, 2017, p. 0–1. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.04.003>>.
- NISKANEN, R.; LINDBERG, A. Transmission of bovine viral diarrhoea virus by unhygienic vaccination procedures, ambient air, and from contaminated pens. **Veterinary Journal**, 2003. v. 165, n. 2, p. 125–130. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1090-0233\(02\)00161-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1090-0233(02)00161-2)>.
- OLAFSON, P; MACCALLUM; FOX, F. H. An Apparently New Transmissible Disease of Cattle. **The Cornell Veterinarian**, 1946. v. 36, n. 1, p. 205–13. Disponível em: <<https://babel.hathitrust.org/cgi/pt?id=uc1.b4179371&view=1up&seq=223>>.
- PAESHUYSE, J. *et al.* A Novel, Highly Selective Inhibitor of Pestivirus Replication That Targets the Viral RNA-Dependent RNA Polymerase. **Journal of Virology**, 2006. v. 80, n. 1, p. 149–160. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/jvi.80.1.149-160.2006>>.
- PELLERIN, C. *et al.* Identification of a New Group of Bovine Viral Diarrhoea Virus Strains Associated with Severe Outbreaks and High Mortalities. **Virology**, 1994. v. 203, p. 260–268. Disponível em: <<https://doi.org/10.1006/viro.1994.1483>>.
- PETERHANS, E. *et al.* Cytopathic bovine viral diarrhoea viruses (BVDV): Emerging pestiviruses doomed to extinction. **Veterinary Research**, 2010. v. 41, n. 6. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1051/vetres/2010016>>.
- PETERHANS, E.; SCHWEIZER, M. BVDV: A pestivirus inducing tolerance of the innate immune response. **Biologicals**, 2013. v. 41, n. 1, p. 39–51. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biologicals.2012.07.006>>.

PLATT, R. *et al.* Comparison of humoral and cellular immune responses to a pentavalent modified live virus vaccine in three age groups of calves with maternal antibodies, before and after BVDV type 2 challenge. **Vaccine**, 2009. v. 27, n. 33, p. 4508–4519. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.05.012>>.

POTGIETER, L. N. Immunology of bovine viral diarrhea virus. **The Veterinary Clinics of North America. Food animal practice**, 1995. v. 11, n. 3, p. 501–520. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30464-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30464-3)>.

QU, L., McMULLAN, L.; RICE, C. Isolation and Characterization of Noncytopathic Pestivirus Mutants Reveals a Role for Nonstructural Protein NS4B in Viral Cytopathogenicity. **Journal of Virology**. 2001. v. 75, n. 22, p.10651-10662. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/JVI.75.22.10651-10662.2001>>.

REED, K. E.; GORBALENYA, A. E.; RICE, C. M. The NS5A / NS5 Proteins of Viruses from Three Genera of the Family Flaviviridae Are Phosphorylated by Associated Serine / Threonine Kinases. **Journal of Virology**. 1998. v. 72, n. 7, p. 6199–6206. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/jvi.72.7.6199-6206.1998>>.

RIDPATH, J. F.; BOLIN, S. R.; DUBOVI, J. Segregation of Bovine Viral Diarrhea Virus into Genotypes. **Virology**, 1994. v. 205, p. 66–74. Disponível em: <<https://doi.org/10.1006/viro.1994.1620>>.

RIDPATH, J. F. BVDV genotypes and biotypes: Practical implications for diagnosis and control. **Biologicals**, 2003. v. 31, n. 2, p. 127–131. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1045-1056\(03\)00028-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1045-1056(03)00028-9)>.

RIDPATH, J. F. Immunology of BVDV vaccines. **Biologicals**, 2013. v. 41, p. 14–19. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biologicals.2012.07.003>>.

ROEDER, P.L.; DREW, T.W. Mucosal disease of cattle: a late sequel to fetal infection. **The Veterinary Record**. 1984. v. 114, n. 13, p. 309-313. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1136/vr.114.13.309>>.

RÜMENAPF, T. *et al.* Structural proteins of hog cholera virus expressed by vaccinia virus: further characterization and induction of protective immunity. **Journal of Virology**, 1991. v. 65, n. 2, p. 589–597. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/jvi.65.2.589-597.1991>>.

SALIKI, J. T.; DUBOVI, E. J. Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhea virus infections. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, 2004. v. 20, n. 1, p. 69–83. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cvfa.2003.11.005>>.

SCHIRMEIER, H. *et al.* Communication Genetic and antigenic characterization of an atypical pestivirus isolate , a putative member of a novel pestivirus species. **Journal of General Virology**, 2004. v. 85, p. 3647–3652. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.80238-0>>.

SCHIRMEIER, H. Three years of mandatory BVD control in Germany - Lessons to be learned. **Proceedings XXVIII World Buiatrics Congress, Cairns 2014**, 2014. p. 2012–2015. Disponível em: <https://www.fli.de/fileadmin/FLI/IVD/three-years-of-mandatory-BVD_20140806.pdf>.

SILVEIRA, S. *et al.* Phylogenetic and evolutionary analysis of HoBi-like pestivirus: Insights into origin and dispersal. **Transboundary and Emerging Diseases**, 2020. v. 67, n. 5, p. 1909–1917. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/tbed.13520>>.

STÅHL, K. *et al.* Short note Natural infection of cattle with an atypical 'HoBi' -like pestivirus – Implications for BVD control and for the safety of biological products. **Veterinary Research**, 2007. v. 38, p. 517–523. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1051/vetres:2007012>>.

STÅHL, K.; ALENIUS, S. BVDV control and eradication in Europe -an update. **Japanese Journal of Veterinary Research**, 2012. v. 60, n. SUPPL. Disponível em: <https://eprints.lib.hokudai.ac.jp/dspace/bitstream/2115/48530/1/60_Suppl.-4.pdf>.

STALDER, H. P. *et al.* Genetic heterogeneity of pestiviruses of ruminants in Switzerland. **Preventive Veterinary Medicine**, 2005. v. 72, n. 1–2, p. 37–41. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2005.01.020>>.

SUDA, Y.; MURAKAMI, S.; HORIMOTO, T. Bovine viral diarrhoea virus non-structural protein NS4B induces autophagosomes in bovine kidney cells. **Archives of Virology**, 2019. v. 164, n. 1, p. 255–260. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00705-018-4045-x>>.

TAUTZ, N.; THIEL, H.-J. Pestivirus NS2-3/NS3 Serine Peptidase. **Handbook of Proteolytic Enzymes, 3rd Edition**, 2013. v. 53, n. 9, p. 1689–1699. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7150157/pdf/main.pdf>>.

TAUTZ, N.; TEWS, B. A.; MEYERS, G. The Molecular Biology of Pestiviruses. **Advances in Virus Research**. [S.l.]: Academic Press Inc., 2015, V. 93, p. 47–160.

THIEL, H. J. *et al.* Hog cholera virus: molecular composition of virions from a pestivirus. **Journal of Virology**, 1991. v. 65, n. 9, p. 4705–4712. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/jvi.65.9.4705-4712.1991>>.

VAN RIJN, P. A. Van. Short communication A common neutralizing epitope on envelope glycoprotein E2 of different pestiviruses : Implications for improvement of vaccines and diagnostics for classical swine fever (CSF)? **Veterinary Microbiology**, 2007. v. 125, p. 150–156. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.05.001>>.

VILČEK, S. *et al.* Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. **Archives of Virology**, 1994. v. 136, n. 3–4, p. 309–323. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/BF01321060>>.

VOGEL, F. *et al.* Resposta sorológica e avaliação de proteção fetal em ovelhas prenhes vacinadas contra o vírus da diarréia viral bovina (BVDV). **Ciência Rural**, 2001. v. 31, n. 5, p. 831–838. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782001000500015>>.

VOGEL, F. S. F. *et al.* Magnitude duration and specificity of the serological response in cattle vaccinated against bovine viral diarrhoea virus (BVDV). **Ciência Rural**, 2002. v. 32, n. 1, p. 83–89. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782002000100015>>.

WEBER, M. N. *et al.* Clinical Presentation Resembling Mucosal Disease Associated with 'HoBi'-like Pestivirus in a Field Outbreak. **Transboundary and Emerging Diseases**, 2016. v. 63, n. 1, p. 92–100. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/tbed.12223>>.

WEISKIRCHER, E. *et al.* Bovine viral diarrhoea virus NS4B protein is an integral membrane protein associated with Golgi markers and rearranged host membranes. **Virology Journal**, 2009. v. 6, p. 1–15. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/1743-422X-6-185>>.

YARNALL, M. J.; THRUSFIELD, M. V. Engaging veterinarians and farmers in eradicating bovine viral diarrhoea: A systematic review of economic impact. **Veterinary Record**, 2017. v. 181, n. 13, p. 347. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1136/vr.104370>>.

YEŞİLBAĞ, K.; ALPAY, G.; BECHER, P. Variability and Global Distribution of Subgenotypes of Bovine Viral Diarrhea Virus. **Viruses**, 2017. v. 9, p. 1–19. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3390/v9060128>>.

ZHAO, C. *et al.* Classical swine fever virus nonstructural protein p7 modulates infectious virus production. **Scientific Reports**, 2017. v. 7, n. 1, p. 1–11. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-13352-w>>.

ANEXO 1 – Vacinas comerciais para BVDV disponíveis no Brasil.

(Continua)

Vacina	Composição Antigênica*	Tipo	Dose administrada	Fabricante
Bovela	Cepas liofilizadas de BVDV-1 ncp (cepa KE-9, entre 10 ⁴ TCID ₅₀ /mL e 10 ⁶ TCID ₅₀ /mL) e BVDV-2 ncp (NY-93, entre 10 ⁴ TCID ₅₀ /mL e 10 ⁶ TCID ₅₀ /mL)	Viva Modificada	2mL / IM; duas doses com intervalos de 30 dias entre si	Boehringer Ingelheim
CattleMaster GOLD FP 5+L5	Cepas liofilizadas de BoHV-1, PI3 e BRSV; Solução líquida contendo BVDV-1 cp (cepa 5960) e BVDV-2 cp (cepa 53637) inativados; Cepas inativadas de <i>Leptospira</i> spp; Adjuvante ISCOM com Amphigen®	Viva Modificada/Inativada**	5mL / SC; duas doses com intervalos de 30 dias entre si	Zoetis
CattleMaster 4+L5	Cepas liofilizadas de BoHV-1, PI3 e BRSV; Solução líquida contendo BVDV-1 cp (cepa 5960) e BVDV-2 cp (cepa 53637) inativados; Cepas inativadas de <i>Leptospira</i> spp; Adjuvante hidróxido de alumínio	Viva Modificada/Inativada	5mL / IM; duas doses com intervalos de 30 dias entre si	Zoetis
Bovi-Shield GOLD (One Shot)	Amostras vivas modificadas de vírus da Rinotraqueíte Infeciosa Bovina (cepa Passage C-13), vírus da Diarreia Viral Bovina Tipo 1 (cepa NADL), vírus da Diarreia Viral Bovina Tipo 2 (cepa 53637), vírus da Parainfluenza Bovina Tipo 3 (cepa AL-IM), vírus Sincicial Respiratório Bovino (cepa BRSV/375) e toxóide de <i>Mannheimia haemolytica</i> (cepa NL 1009).	Viva Modificada	2mL / SC; revacinação anual com dose única	Zoetis
Ceva/Hertape	Vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina/vulvovaginite pustular infecciosa dos bovinos (IBR- cepa Colorado); vírus da diarreia viral bovina (BVDV-1: NADL) vírus da diarreia viral bovina (BVDV-2: New York).	Inativada	5mL / SC; duas doses com intervalos de 30 dias entre si	Ceva/Hertape
Bovigen Repro Total SE	Suspensão inativada de herpesvírus bovino tipo 1 e tipo 5, Diarreia Viral Bovina tipo 1 e tipo 2, <i>Leptospira interrogans</i> sorovares: pomona, wolffi, hardjo prajitno, icterohaemorrhagiae, canicola, copenhageni, bratislava e <i>Leptospira borgpetersenii</i> sorovar hardjo bovis, <i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i> , <i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>venerealis</i> , <i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>venerealis</i> biotipo intermedius, selenito de sódio 10 mg/dose em hidróxido de alumínio a 10%	Inativada	5mL / SC ou IM; duas doses com intervalos de 30 dias entre si	Virbac
Bovigen V4J5	Suspensão inativada de Herpesvírus Bovino tipo 1 e tipo 5, Diarreia Viral Bovina tipo 1 e tipo 2, Vírus da Parainfluenza Bovina tipo 3(PI3), Vírus Sincicial Respiratório Bovino (BRSV), Mannheimia haemolytica, Pasteurella multocida, Escherichia coli K99 e J5, Salmonella Dublin adsorvidos em hidróxido de alumínio	Inativada	5mL / SC ou IM; duas doses com intervalos de 30 dias entre si	Virbac
Poliguard	Suspensão inativada de antígenos da Rinotraqueíte Infeciosa Bovina (IBR), Diarréia Viral Bovina (BVD), e bacterinas de <i>Leptospira pomona</i> , <i>L. wolffii</i> , <i>L. hardjo</i> , <i>L. icterohaemorrhagiae</i> , <i>L. canicola</i> e <i>L. grippotyphosa</i> , adsorvidos em hidróxido de alumínio. Contém Selenato de sódio 4,8 mg/mL e timerosal.	Inativada	5mL / SC; duas doses com intervalos de 21 a 30 dias entre si	MSD/Vallée

(Conclusão)

Vacina	Composição Antigênica*	Tipo	Dose administrada	Fabricante
Hiprabovis 9	Contém sorovares de leptospiros (<i>L. hardjo</i> , <i>L. icterohaemorrhagiae</i> , <i>L. bratislava</i> , <i>L. pomona</i> e <i>L. wolffi</i>), Herpesvírus Bovino (BoHV-1 e BoHV-5) e Vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV-1 e BVDV-2). Emulsão com óleo mineral como adjuvante.	Inativada	5mL / SC; duas doses com intervalos de 30 dias entre si	Hipra
Bayovac Repro 15	Suspensão inativada de Vírus Herpes Bovino (IBR) tipo 1 e tipo 5, Diarreia Viral Bovina tipo 1 e tipo 2; <i>Leptospira interrogans</i> sorovares: pomona, wolfii, hardjo prajitno, hardjo bovis, tarassovi, icterohaemorrhagiae, canicola e grippotyphosa; <i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i> , <i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>venerealis</i> ; <i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>venerealis</i> biótipo intermedius; Selenato de sódio 10mg; Hidróxido de alumínio 10%; Contém timerosal como conservante.	Inativada	5mL / SC; duas doses com intervalos de 30 dias entre si	Bayer
Bayovac RD	Emulsão em adjuvante oleoso de suspensão inativada de: Vírus Herpes Bovino (cepa IBR-T1 e IBR-T2); Vírus Parainfluenza 3; Vírus de Diarreia Viral Bovina (cepas citopatogênica e não citopatogênica); <i>Escherichia coli</i> K99; <i>Salmonella</i> Dublin; <i>Pasteurella haemolytica</i> e <i>Pasteurella multocida</i> .	Inativada	5mL / SC ou IM; duas doses com intervalos de 30 dias entre si	Bayer
Bioabortogen H	Suspensão inativada contendo IBR (Rinotraqueíte Infecciosa Bovina) - BoHV - 1; BVDV I e II (Diarreia Viral Bovina); <i>Campylobacter fetus fetus</i> ; <i>Campylobacter fetus venerealis</i> ; <i>Leptospira interrogans pomona pomona</i> ; <i>Histophilus somni</i> .	Inativada	5mL / SC; duas doses com intervalos de 30 dias entre si	Biogenesis Bagó
Supravac 10	Suspensão contendo vírus inativados por betapropiolactona de BVDV - Vírus da Diarreia Viral Bovina Tipo 1 amostra citopática e não citopática, BVDV - Vírus da Diarreia Viral Bovina Tipo 2 amostra citopática, IBR-Rinotraqueíte Infecciosa Bovina, BRSV-Vírus Respiratório Sincicial Bovino, PI3-Parainfluenza Bovina tipo 3 e bacterinas do cultivo de <i>Pasteurella haemolytica</i> , leptospiros pomona, canicola, icterohaemorrhagiae, hardjo, wolfii e grippotyphosa, mortos pelo formol e calor e adsorvidos pelo gel de hidróxido de alumínio como adjuvante.	Inativada	5mL / SC; duas doses com intervalos de 30 dias entre si	Venco