

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

Evelyn Kaus Dotto

**INDUÇÃO DE ANTICORPOS NEUTRALIZANTES CONTRA HERPESVÍRUS
BOVINO E VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA POR VACINAS COMERCIAIS
E VACINA EXPERIMENTAL ASSOCIADA COM DIFERENTES ADJUVANTES**

Santa Maria, RS
2020

Evelyn Kaus Dotto

**INDUÇÃO DE ANTICORPOS NEUTRALIZANTES CONTRA HERPESVÍRUS
BOVINO E VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA POR VACINAS COMERCIAIS
E VACINA EXPERIMENTAL ASSOCIADA COM DIFERENTES ADJUVANTES**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa 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: Dr Eduardo Furtado Flores

Santa Maria, RS
2020

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Dotto, Evelyn Kaus

Indução de anticorpos neutralizantes contra herpesvírus bovino e vírus da diarreia viral bovina por vacinas comerciais e vacina experimental associada com diferentes adjuvantes / Evelyn Kaus Dotto.- 2020.
81 p.; 30 cm

Orientador: Eduardo Furtado Flores
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2020

1. Vacinas comerciais 2. Adjuvantes 3. Anticorpos neutralizantes 4. Vírus da diarreia viral bovina 5. Herpesvírus bovino I. Furtado Flores, Eduardo II. Título.

sistema de geração automática de ficha catalográfica da usm. dados fornecidos pelo autor(a). sob supervisão da direção da divisão de processos técnicos da biblioteca central. biblioteca responsável paula schoenfeldt vatta em 10/1720.

Declaro, EVELYN KAUS DOTTO, 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.

Evelyn Kaus Dotto

INDUÇÃO DE ANTICORPOS NEUTRALIZANTES CONTRA HERPESVÍRUS BOVINO E VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA POR VACINAS COMERCIAIS E VACINA EXPERIMENTAL ASSOCIADA COM DIFERENTES ADJUVANTES

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa 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 19 de fevereiro de 2020:

Eduardo Furtado Flores, Ph.D. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Deniz Anziliero, Dr (IMED)

Mário Celso Sperotto Brum, Dr (Unipampa)

Santa Maria, RS 2020

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a toda minha família, mas principalmente aos meus pais, Éverton e Janete e minha irmã Danielle por todo amor, ensinamentos e apoio incondicional.

Ao Fabrício, pelo amor, paciência e incentivo diário.

Aos professores Eduardo Furtado Flores e Rudi Weiblen pela oportunidade, amizade, orientação, confiança e por todos os ensinamentos.

A todos os colegas e ex-colegas do Setor de Virologia, pelo companheirismo e amizade. Vocês foram muito importantes nessa jornada.

A Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) pelo ensino superior público e de qualidade, desde o período de graduação, especialização e mestrado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria (PPGMV-UFSM), pela oportunidade de realizar o mestrado em um programa de excelência.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), pela concessão da bolsa e suporte financeiro, bem como ao apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – código de financiamento 001.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a minha formação pessoal e profissional, muito obrigada!

RESUMO

INDUÇÃO DE ANTICORPOS NEUTRALIZANTES CONTRA HERPESVÍRUS BOVINO E VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA POR VACINAS COMERCIAIS E VACINA EXPERIMENTAL ASSOCIADA COM DIFERENTES ADJUVANTES

AUTORA: Evelyn Kaus Dotto

ORIENTADOR: Eduardo Furtado Flores

O alfa herpesvírus bovino 1 (BoHV-1) e o vírus da diarreia viral bovina (BVDV) são patógenos importantes em bovinos cujas perdas podem ser reduzidas pela vacinação. Este estudo avaliou a resposta sorológica induzida por vacinas comerciais e por uma vacina experimental inativada associada com diferentes adjuvantes. Para isso, grupos de novilhas foram imunizados duas vezes (com intervalo de 30 dias), com nove vacinas comerciais. Amostras de soro foram testadas pela técnica de neutralização viral (VN), para avaliar a indução de anticorpos neutralizantes para seus respectivos vírus, 30 dias após a segunda dose (D60). Para o teste de adjuvante, antígenos de BoHV-1 e BVDV-1 inativados foram combinados com seis adjuvantes diferentes e submetidos ao mesmo protocolo de imunização e sorologia. Sete de nove vacinas comerciais induziram anticorpos contra o BoHV-1 no dia D60, mas apenas três induziram títulos considerados protetores (≥ 16). A frequência de soroconversão entre as vacinas variou de 0% (0/10 dos animais) a 100% (10/10) e os títulos médios geométricos (GMT) variaram de 0 a 43. A frequência de soroconversão em títulos protetores foi de 100%, 37,5% e 25% para BoHV-1, respectivamente. Somente quatro vacinas induziram títulos neutralizantes contra o BVDV-1 e três ao BVDV-2 no D60. A frequência de soroconversão para o BVDV variou de 0% (0/10 animais) a 100% (10/10) e os títulos médios geométricos (GMT) variaram de 0 a 202. Apenas três vacinas conferiram títulos compatíveis com proteção (> 60). A frequência de soroconversão em títulos protetores foi de 55,5%, 42,8% e 12,5% para BVDV-1, respectivamente. Todas as formulações vacinais experimentais induziram títulos neutralizantes contra BoHV-1 no D60 (a frequência de soroconversão variou de 0% a 100% e o GMT variou de 2 a 20), mas apenas quatro induziram títulos protetores. A frequência de soroconversão em títulos protetores foi de 100%, 33,3%, 30% e 20%, respectivamente. Por outro lado, nenhuma das vacinas experimentais foi capaz de induzir anticorpos neutralizantes para BVDV no D60. Nas condições do presente estudo, a maioria das vacinas comerciais induziu resposta sorológica insatisfatória contra os vírus testados, sendo mais evidente para o BVDV. Entre as vacinas experimentais, o adjuvante Emulsigen - DL90 (DDA) foi o mais eficaz na indução de anticorpos contra o BoHV-1, mas não contra o BVDV. Estes resultados indicam a necessidade de reformulação da composição das vacinas e / ou dos protocolos de imunização, para obter resposta sorológica mais consistente para o BoHV-1 e, principalmente, para o BVDV.

PALAVRAS-CHAVE: Vacinas comerciais. Adjuvantes. Anticorpos neutralizantes. Resposta vacinal. Vírus da diarreia viral bovina. Herpesvírus bovino.

ABSTRACT

INDUCTION OF NEUTRALIZING ANTIBODIES AGAINST BOVINE HERPESVIRUS AND BOVINE VIRAL DIARRHEA VIRUS BY COMMERCIAL AND EXPERIMENTAL VACCINES WITH DIFFERENT ADJUVANTS

AUTHOR: Evelyn Kaus Dotto

ADVISER: Eduardo Furtado Flores

Bovine alphaherpesvirus 1 (BoHV-1) and *Bovine viral diarrhea virus* (BVDV) are important pathogens of cattle whose losses may be prevented by vaccination. This study evaluated the serological response induced by commercial vaccines and by an experimental vaccine associated with different adjuvants. For this, groups of seronegative heifers were immunized twice (30 days apart) with nine commercial vaccines and tested for virus neutralizing (VN) antibodies to the respective viruses 30 days after the second vaccine dose (D60). For the adjuvant test, inactivated BoHV-1 and BVDV-1 antigens were combined with six different adjuvants and submitted to the same immunization and serology protocol. Seven out of nine commercial vaccines induced VN antibodies to BoHV-1 at day D60, but only three induced titers considered protective (≥ 16). The frequency of seroconversion among the vaccines varied from 0% (0/10 animals) to 100% (10/10) and the geometric mean titers (GMT) ranged from 0 to 43. The frequency of seroconversion in protective titers was 100%, 37,5% and 25%, respectively. Only four vaccines induced neutralizing titers to BVDV-1 and three to BVDV-2 at D60. The frequency of seroconversion to BVDV among the vaccines varied from 0% (0/10 animals) to 100% (10/10) and the geometric mean titers (GMT) ranged from 0 to 202. Only three vaccines conferred titers compatible with protection (>60). The frequency of seroconversion in protective titers was 55,5%, 42,8% and 12,5% for BVDV-1, respectively. All experimental vaccine formulations induced VN titers against BoHV-1 at D60 (frequency of seroconversion varied from 0% to 100% and GMT= varied from 2 to 20) and four induced protective titers. The frequency of seroconversion in protective titers was 100%, 33,3%, 30% and 20%, respectively. On the other hand, none of the experimental vaccines was able to induce VN antibodies to BVDV at D60. Under the conditions of the present study, most commercial vaccines induced unsatisfactory VN response against the tested viruses, most noticeably to BVDV. Among the experimental vaccines, the adjuvant Emulsigen - DL90 (DDA) was more effective to induce VN antibodies against BoHV-1, but not to BVDV. These results indicate the need for reformulation of vaccine composition and/or immunization protocols as to achieve more consistent serological response to BoHV-1 and, especially, to BVDV.

KEYWORDS: Commercial vaccines. Adjuvants. Neutralizing antibodies. Vaccine response. Bovine viral diarrhea virus. Bovine herpesvirus.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Genoma dos pestivírus.....	13
Figura 2 - Morfologia e organização genômica do alfaherpesvírus bovino 1 (BoHV-1).....	17
Figura 3 - Comparação entre as regiões LR do alfaherpesvírus bovino 1 (BoHV-1) e alfaherpesvírus bovino 5 (BoHV-5).....	19

CAPÍTULO 1

Figura 1- Frequência de soroconversão (%) contra herpesvírus e pestivírus bovino em animais imunizados com diferentes vacinas comerciais.....	54
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características das espécies de pestivírus.....	12
--	----

CAPÍTULO 1

Tabela 1 - Vacinas comerciais avaliadas no presente estudo.....	55
Tabela 2 - Adjuvantes e composição utilizados na formulação das vacinas experimentais	56
Tabela 3 - Resposta sorológica neutralizante 60 dias após a primeira dose vacinal contra BoHV-1 e BoHV-5 em animais imunizados com vacinas comerciais	57
Tabela 4 - Resposta sorológica neutralizante 60 dias após a primeira dose vacinal contra o BVDV-1 e BVDV-2 de animais imunizados com vacinas comerciais.....	58
Tabela 5 - Resposta sorológica neutralizante 60 dias após a primeira dose vacinal contra vacinas experimentais com cepas de BoHV-1 e BVDV-1 associadas com diferentes adjuvantes	59

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
2.1	VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA.....	11
2.1.1	Etiologia.....	11
2.1.2	Epidemiologia, patogenia e apresentações clínicas	14
2.2	HERPESVÍRUS BOVINO.....	16
2.2.1	Etiologia.....	16
2.2.2	Epidemiologia, patogenia e apresentações clínicas	20
2.3	VACINAS CONTRA BoHV-1 e BVDV	24
2.3.1	Vacinas replicativas contendo vírus vivo modificado (modified live virus – MLV – vaccines).....	26
2.3.2	Vacinas inativadas ou não replicativas.....	27
2.3.3	Outras vacinas	28
2.4	USO DE ADJUVANTES EM VACINAS	29
2.4.1	Sais minerais.....	30
2.4.2	Emulsões à base de óleo.....	31
2.4.3	Saponina e complexos imunoestimulantes (ISCOMs).....	32
3	CAPÍTULO I.....	34
	ABSTRACT.....	35
	RESUMO.....	36
	INTRODUÇÃO	37
	MATERIAL E MÉTODOS	39
	RESULTADOS.....	41
	DISCUSSÃO	43
	CONCLUSÃO	47
	REFERÊNCIAS.....	48
4	CONCLUSÃO	60
5	REFERÊNCIAS.....	61
	ANEXO A - Grupos imunizados com nove vacinas comerciais e valores individuais na neutralização viral no D60.	77
	ANEXO B - Grupos imunizados com seis vacinas experimentais associadas com diferentes adjuvantes e valores individuais da neutralização viral no D60.	79

1 INTRODUÇÃO

O alfaherpesvírus bovino -1 (BoHV-1), alfaherpesvírus bovino -5 (BoHV-5) e vírus da diarreia viral bovina (BVDV) são importantes patógenos de bovinos. O BoHV-1 e BoHV-5 pertencem a família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae* e gênero *Varicellovirus* (ICTV, 2019). O BoHV-1 é frequentemente associado com doença respiratória (rinotraqueíte infecciosa bovina – IBR), doença genital como vulvovaginite em fêmeas e balanopostite em touros, e também pode estar associado a infertilidade e aborto (ENGELS & ACKERMANN, 1996). O BoHV-5 é associado a encefalites de curso geralmente fatais (DEL MEDICO ZAJAC et al., 2010). O BVDV pertence à família *Flaviviridae* e gênero *Pestivirus*. As espécies de pestivírus que afetam bovinos são geneticamente classificadas como *Pestivirus A*, *Pestivirus B* e *Pestivirus H*, também denominados de BVDV-1, BVDV-2 e HoBiPeV, respectivamente (ICTV, 2019). As infecções causadas pelo BVDV podem envolver doença reprodutiva e/ou respiratória, digestiva, síndrome hemorrágica, infecções persistentes (PI) e doença das mucosas, de curso geralmente fatal (BAKER, 1995).

O BoHV-1 e BoHV-5 possuem grande similaridade genética, antigênica e biológica, que dificultam o diagnóstico e controle dessas infecções (VOGEL et al., 2002; VARELA et al., 2010). Por outro lado, a reatividade entre os herpesvírus bovinos é considerada um importante fator para a proteção cruzada (ANZILIERO et al., 2011). O BVDV possui grande variabilidade genética e antigênica, resultando em níveis variáveis de reatividade cruzada entre os vírus da mesma espécie e reatividade muito baixa ou inexistente entre vírus de espécies diferentes. Este último contexto reforça a necessidade de incluir as cepas BVDV-1, BVDV-2 e HoBiPeV nas formulações de vacinas (BIANCHI et al., 2011).

A vacinação de bovinos contra o BVDV e BoHV-1 no Brasil é voluntária e aumentou nos últimos anos. Cerca de 20 vacinas comerciais contra esses agentes estão registradas ou licenciadas no Brasil. No entanto, nenhuma das vacinas disponíveis contém cepas de HoBiPeV em sua composição e, com exceção de uma vacina comercial viva modificada, todas as outras formulações comerciais contêm cepas de BVDV inativadas (BRASIL, 2019b). Em relação aos herpesvírus, as vacinas licenciadas contêm cepas vivas modificadas ou inativadas de BoHV-1 e BoHV-5 (BRASIL, 2019b). Essas vacinas apresentam combinações diferentes de antígenos ou cepas e podem ser combinadas com outros agentes virais e bacterianos. Além disso, diferentes tipos de adjuvantes estão incluídos nessas vacinas (BRASIL, 2019b).

A proteção induzida por vacinas é atribuída à sua capacidade de estimular a produção de anticorpos neutralizantes, que se ligam a epítomos na superfície dos antígenos e previnem a infecção. Sugere-se que os títulos mínimos de anticorpos para proteger os animais desafiados com BVDV e BoHV-1 sejam ≥ 60 e ≥ 16 , respectivamente (POSPISIL et al., 1996; FULTON & BURGE, 2000). Apesar disso, é importante considerar que altos títulos de anticorpos neutralizantes podem fornecer maior proteção ao hospedeiro. Nesse contexto, adjuvantes são frequentemente usados para aumentar a imunogenicidade do antígeno e, assim, reduzir a massa antigênica (COFFMAN et al., 2010; LEE & NGUYEN, 2015). Os adjuvantes mais comumente utilizados em vacinas experimentais e comerciais incluem hidróxido de alumínio, saponinas, emulsões oleosas, complexos imunoestimulantes (ISCOM – *immunostimulating complexes*), derivados bacterianos, micropartículas poliméricas e derivados de carboidratos (RESENDE et al., 2003; SPICKLER & ROTH, 2003; BASTOLA et al., 2017).

Diante disso, o objetivo deste estudo foi avaliar a produção de anticorpos neutralizantes por nove vacinas comerciais disponíveis no mercado brasileiro contra o BVDV e herpesvírus bovino. Em seguida, avalia-se a influência de diferentes adjuvantes na produção de anticorpos neutralizantes em animais imunizados com uma vacina experimental contendo BVDV-1 e BoHV-1.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA

2.1.1 Etiologia

O BVDV pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Pestivirus* e até 2017, eram reconhecidas quatro espécies de *Pestivirus* [*Bovine viral diarrhea virus 1* (BVDV-1), *Bovine viral diarrhea virus 2* (BVDV-2)], *Border disease virus* (BDV), and *Classical swine fever virus* (CSFV). Atualmente, as espécies de pestivírus que acometem bovinos foram classificadas como *Pestivirus A*, *Pestivirus B* e *Pestivirus H*, tendo como abreviação BVDV-1, BVDV-2 e HoBiPeV (BVDV-3), respectivamente (Tabela 1) (SMITH et al., 2017; COLITTI et al., 2018; ICTV, 2019).

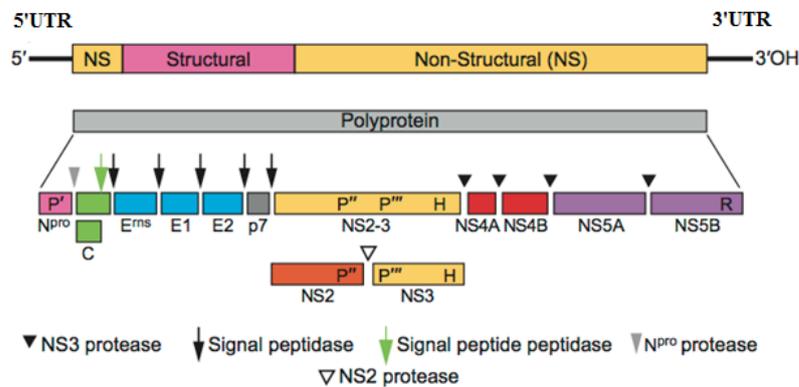
Tabela 1 - Características das espécies de pestivírus.

Nome das espécies existente	Nome proposto para as espécies	Nome dos vírus	Abreviatura	Acesso no Genbank	Hospedeiros	Doença
Vírus da diarreia viral bovina 1	<i>Pestivirus A</i>	Vírus da diarreia viral bovina 1	BVDV-1	M31182	Bovinos, Ovinos, outros ruminantes, Suínos	Diarreia Viral Bovina/Doença das Mucosas (BVD/MD)
Vírus da diarreia viral bovina 2	<i>Pestivirus B</i>	Vírus da diarreia viral bovina 2	BVDV-2	U18059	Bovinos, Ovinos, outros ruminantes, Suínos	BVD/MD
Vírus da peste suína clássica	<i>Pestivirus C</i>	Vírus da peste suína clássica, vírus da cólera	CSFV	X87939	Suínos	Peste Suína Clássica
Vírus da doença das fronteiras	<i>Pestivirus D</i>	Vírus da doença das fronteiras, pestivírus da rena	BDV	AF037405	Ovinos, renas, outros ruminantes, suínos	Doença das fronteiras/ Síndrome do pelo arrepiado
-	<i>Pestivirus E</i>	Pestivírus pronghorn de antílope	Pronghorn	AY781152	Antílopes	Desconhecida
-	<i>Pestivirus F</i>	Vírus Bungowannah	Bungo	EF100713	Suínos	Síndrome da miocardite suína MD-like (girafa) /
-	<i>Pestivirus G</i>	Pestivírus girafa	Giraffe	AF144617	Bovinos/ Girafa	Desconhecido (bovinos)
-	<i>Pestivirus H</i>	HoBi-like pestivírus, pestevírus atípico dos ruminantes, vírus da diarreia viral bovina 3,	HoBiPeV, BVDV-3	FJ040215	Bovinos/ Búfalos	BVD/MD
-	<i>Pestivirus I</i>	Aydin-like pestivírus,		JX428945	Ovinos/ Caprinos	Abortos, malformações congênicas
-	<i>Pestivirus J</i>	Pestivírus de rato		KJ950914	Ratos	Desconhecida
-	<i>Pestivirus K</i>	Pestevírus suíno atípico	APPV	KR011347	Suínos	Tremor congênito

Fonte: Adaptado de SMITH, 2017.

As espécies de BVDV podem ser subdivididas em subgenótipos sendo eles o BVDV-1 (BVDV-1a – 1u) e BVDV-2 (BVDV-2a – 2d) e três pestivírus bovinos atípicos classificados como tipo 3 ou HoBiPeV que estão distribuídos por todo o mundo (FLORES et al., 2002; FULTON et al., 2006; BACHOFEN et al., 2008; LIU et al., 2009; LUZZAGO et al., 2014; YESILBAG et al., 2017). Os pestivírus são vírus envelopados que possuem um genoma RNA de cadeia simples e sentido positivo com cerca de 12,5kb, uma região 5'UTR (região não traduzida), uma fase única de leitura (*open reading frame* – ORF) que codifica uma poliproteína que é clivada por proteases celulares e virais em quatro proteínas estruturais e oito proteínas não estruturais (DONIS, 1995; RIDPATH, 2010b; YESILBAG et al., 2017). A poliproteína viral é traduzida via IRES (*internal ribossomal entry site*) e clivada durante e após a tradução, gerando 11 ou 12 proteínas funcionais na seguinte ordem: N^{pro}_C_E^{rns}_E1_E2_p7_NS2-3_NS4_NS4B_NS5A_NS5B (Figura 1) (RIDPATH, 2010b; YESILBAG et al., 2017).

Figura 1 - Genoma dos pestivírus.



As proteínas virais não estruturais são indicadas como NS. Os símbolos P', P'', P''', H e R indicam a localização da protease N^{pro}, da protease NS2, da protease NS3, NS3 RNA helicase e RdRp NS5B, respectivamente. As proteases e etapas proteolíticas envolvidas na geração de proteínas individuais são indicadas nas setas. Nos vírus BVDV não citopáticos, a clivagem NS2-3 é detectável apenas por um curto período de tempo, logo após a infecção. Em vírus BVDV citopático a NS3 é produzida continuamente em adição ao NS2-3. Fonte: (ICTV, 2019).

Diferentemente de outros gêneros da família *Flaviviridae*, o gênero *Pestivirus* codifica duas proteínas únicas, a N^{pro} e a E^{ms} (RIDPATH, 2010b). A proteína não estrutural, N^{pro}, é uma proteinase, e também atua na supressão da resposta imune inata do hospedeiro. Sugere-se que a N^{pro} bloqueie a produção de interferon (IFN) tipo I, bloqueando a atividade do fator regulador de interferon – 3 (IRF-3) (HILTON et al., 2006; SEAGO et al., 2007). A glicoproteína do envelope E^{ms} possui atividade de ribonuclease (RNase) e também bloqueia a síntese de IFN tipo I favorecendo o estabelecimento e manutenção de infecção persistente (WANG et al., 2015).

Além das diferenças genéticas e antigênicas, os pestivírus podem existir em dois biótipos diferentes, citopático (CP) e não citopático (NCP), de acordo com a capacidade do vírus induzir citopatologia em cultivo (BECHER & TAUTZ, 2011; TAUTZ et al., 2015). Esta característica está relacionada com a proteína NS2-3 (120 kDa) que é uma proteína multifuncional. A regulação da clivagem do NS2-3 é de grande importância para a biologia dos pestivírus, pois é expressa em vírus não citopáticos. A proteína não estrutural 2 (NS2) engloba um domínio cisteína protease que catalisa a clivagem entre NS2 e NS3 (AGAPOV et al., 2004; LACKNER et al., 2004; LACKNER et al., 2006). A NS3 (80kDa) é uma enzima multifuncional com atividade protease, e atividade de NTPase/RNA helicase, sendo expressa

em BVDVs citopáticos (WISKERCHEN & COLLETT, 1991; GU et al., 2000; AGAPOV et al., 2004).

2.1.2 Epidemiologia, patogenia e apresentações clínicas

O BVDV foi descrito pela primeira vez em 1946 (OLAFSON et al., 1946), e é descrito mundialmente com responsável por perdas econômicas importantes na bovinocultura (FLORES et al., 2005; PINIOR et al., 2017; RICHTER et al., 2017). A infecção por BVDV também foi descrita em animais silvestres, porém pouco se sabe sobre seu papel na epidemiologia da doença mesmo sendo alvo de estudos (BECHER et al., 1997; KIM et al., 2009; RIDPATH, 2010b; AGUIRRE et al., 2014; GONG et al., 2014; YESILBAG et al., 2017). No Brasil, os primeiros estudos sorológicos da infecção por BVDV ocorreram na década de 70 e desde então estudos sorológicos e de perfil filogenético foram realizadas confirmando a circulação de BVDV-1, BVDV-2 e HoBiPeV no país (FLORES et al., 2005; BIANCHI et al., 2011; DIAS et al., 2017; SILVEIRA et al., 2017).

Durante a infecção aguda os animais infectados excretam o vírus, porém em títulos inferiores e em menor período de tempo (3 a 10 dias) (BAKER, 1995). O vírus é transmitido entre os animais principalmente por contato direto ou de forma indireta por secreções, restos placentários, fetos abortados ou ainda verticalmente com a infecção de fêmeas prenhes (RIDPATH, 2010a). Transmissão iatrogênica (agulhas e/ou material cirúrgico contaminado, luvas de palpação retal, aplicadores de brinco) e sêmen contaminado podem servir de veículos de transmissão (BAKER, 1995; FLORES et al., 2005; KHODAKARAM-TAFTI & FARJANIKISH, 2017).

A principal porta de entrada do BVDV é a mucosa orofaríngea, por ingestão ou inalação de partículas virais. Os sítios de replicação do vírus, logo após a infecção, são o epitélio superior, orofaringe e tecido linfoide regional (KHODAKARAM-TAFTI & FARJANIKISH, 2017). A apresentação clínica da infecção varia devido à cepa do vírus, espécie hospedeira, *status* imunológico, *status* reprodutivo, idade e infecções concomitantes com outros patógenos (RIDPATH, 2010b; LANYON et al., 2014).

Em bovinos não imunes não prenhes, as infecções agudas com BVDV NCP resultam em viremia transitória (HOWARD, 1990), começando no dia 3 pós-infecção (PEDRERA et al., 2012). O período de viremia pode durar de 5 a 15 dias, dependendo do nível de estresse do hospedeiro e da presença de outros patógenos (RIDPATH, 2010b; LANYON et al., 2014). A

infecção de animais não prenhes, soronegativos e imunocompetentes podem resultar em infecção subclínica ou doença clínica leve em 70-90% dos casos (KHODAKARAM-TAFTI & FARJANIKISH, 2017). Isolados de maior virulência podem provocar sinais clínicos como, por exemplo, período febril curto, leucopenia, linfopenia e/ou trombocitopenia, imunossupressão, descarga nasal, tosse, problemas reprodutivos e diarreia (LANYON et al., 2014).

A forma aguda hemorrágica (síndrome hemorrágica) cursa com febre, diarreia sanguinolenta, hemorragias e tempo de coagulação retardado (FLORES et al., 2005). As lesões encontradas são similares às observadas nos casos de Doença das Mucosas (DM), no entanto diferem de acordo com a presença do vírus CP, pois na forma aguda hemorrágica há a presença o biótipo NCP e na DM há a presença dos biótipos CP e NCP (GOENS, 2002; KHODAKARAM-TAFTI & FARJANIKISH, 2017). Também há diferença em relação à taxa de mortalidade e morbidade, onde a taxa de mortalidade na DM é de aproximadamente 100% e a morbidade é baixa, já na forma hemorrágica a taxa de mortalidade é baixa e a morbidade é alta (GOENS, 2002; KHODAKARAM-TAFTI & FARJANIKISH, 2017).

A infecção de fêmeas prenhes soronegativas é frequentemente seguida de transmissão transplacentária do vírus ao embrião ou feto (HOUE et al., 2006; KHODAKARAM-TAFTI & FARJANIKISH, 2017). As consequências da infecção do concepto dependem do biótipo do vírus (CP ou NCP), cepa viral e período de gestação no momento da infecção (RIDPATH, 2010b; LANYON et al., 2014). Podem ser observados casos de reabsorção embrionária, retorno ao cio, abortos, mumificação fetal, nascimento de natimortos, nascimento de animais fracos e inviáveis ou animais persistentemente infectados (PI) dependendo do período de gestação (LANYON et al., 2014; KHODAKARAM-TAFTI & FARJANIKISH, 2017). A ocorrência de malformações fetais é um achado muito comum e geralmente ocorrem quando a infecção ocorre entre 80 e 150 dias de gestação (LANYON et al., 2014).

O estabelecimento da infecção persistente ocorre quando o feto é infectado entre os dias 40 e 120 de gestação. Os fetos infectados nesse período desenvolvem imunotolerância ao vírus infectante, pois o BVDV NCP possui a capacidade de inibir a indução do IFN tipo I no feto e o seu organismo não consegue erradicar o vírus tornando esses animais PI. Esses animais tornam-se portadores permanentes e excretam o vírus continuamente em altos títulos em secreções e excreções (RIDPATH, 2010b; LANYON et al., 2014; KHODAKARAM-TAFTI & FARJANIKISH, 2017).

Os animais PI podem nascer aparentemente normais, porém frequentemente apresentam malformações congênitas ou retardo no crescimento, não apresentando anticorpos contra o vírus (BAKER, 1995; HOUE et al., 2006; WEBER et al., 2016; KHODAKARAM-TAFTI & FARJANIKISH, 2017). Somente animais PI podem desenvolver DM apresentando lesões ulcerativas em órgãos do sistema gastrointestinal, sendo fatal em aproximadamente 100% dos casos (BROWNLIE et al., 1984; GOENS, 2002; LANYON et al., 2014). Os animais PI são a principal fonte de disseminação do vírus dentro de um rebanho e a identificação de animais PI é alvo de programas de erradicação de BVDV (RIDPATH, 2010b; KHODAKARAM-TAFTI & FARJANIKISH, 2017; REICHEL et al., 2018).

Os fetos que são infectados após o 120º dia de gestação são considerados imunocompetentes e podem desenvolver uma resposta imunológica que pode resultar na erradicação do agente. Por isso fetos infectados no terço final da gestação frequentemente nascem saudáveis, livres do vírus e soropositivos (BAKER, 1995). Apesar da grande manifestação de sinais clínicos, as infecções subclínicas possuem grande impacto econômico, reduzindo os índices reprodutivos em animais de produção, cursando com linfopenia e imunossupressão severa, e facilitando a disseminação de outros agentes no rebanho (RIDPATH, 2010b; LANYON et al., 2014).

2.2 HERPESVÍRUS BOVINO

2.2.1 Etiologia

Os herpesvírus pertencem à família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae* e gênero *Varicellovirus*. As espécies mais importantes que acometem bovinos dentro deste gênero são alfa herpesvírus bovino 1 (BoHV-1) e alfa herpesvírus bovino 5 (BoHV-5) (ICTV, 2019). O BoHV-1 é frequentemente associado com doença respiratória, doença genital, e também está associado a infertilidade e aborto (ENGELS & ACKERMANN, 1996). Esporadicamente esse vírus pode causar encefalite (MARIN et al., 2019).

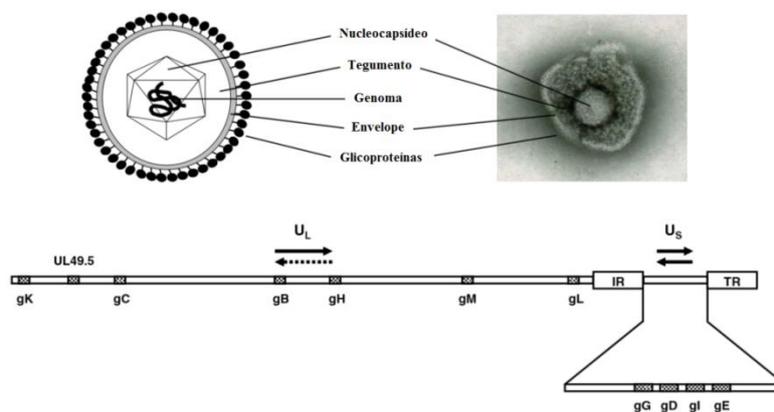
Isolados respiratórios de herpesvírus tem sido classificados como BoHV-1.1, que está associado a amostras clássicas de rinotraqueíte infecciosa (IBR) e BoHV-1.2, associado a doença genital, infertilidade e aborto (ENGELS & ACKERMANN, 1996; SPILKI et al., 2004; NANDI et al., 2009). O subtipo 1.2 é dividido em 1.2a (infecções genitais e abortos) e 1.2b (infecções genitais sem abortos) (MILLER et al., 1991). O BoHV-5 é associado a

encefalites de curso geralmente fatais (DEL MEDICO ZAJAC et al., 2010), embora, eventualmente, tenha sido isolado também do trato genital e respiratório de bovinos (MARIN et al., 2019). Os isolados de BoHV-5 também foram classificados como BoHV-5 subtipos a, b e atípicos ou não-a, não-b (D'ARCE et al., 2002).

O BoHV-1 é um vírus pleomórfico, envelopado e mede cerca de 150 a 300 nm de diâmetro, variando conforme a quantidade de tegumento (ROIZMANN et al., 1992). O envelope viral possui várias glicoproteínas, mas as mais abundantes são gB, gC e gD (THIRY et al., 2006). O tegumento é uma estrutura amorfa contida entre o capsídeo e o envelope lipoproteico (MUYLKENS et al., 2007). Este vírus possui como genoma uma molécula de DNA de fita dupla e linear, com aproximadamente 136 mil pares de base, com 73 ORFs (*open reading frames*) identificadas (MUYLKENS et al., 2007). O genoma do BoHV-1 é classificado como do tipo D, que compreende duas sequências únicas, sendo uma delas longa – *unique long*, U_L – e uma curta – *unique short*, U_S (SCHYNTS et al., 2003). Além disso, este genoma possui duas sequências repetidas, uma interna – *internal repeat*, IR – e outra terminal – *terminal repeat*, TR (SCHYNTS et al., 2003).

O genoma do BoHV-1 contém dez genes que codificam glicoproteínas (gps) (Figura 2). Seis desses genes estão na sequência U_L e codificam as glicoproteínas: gK (UL53), gC (UL44), gB (UL27), gH (UL22), gM (UL10) e gL (UL1). Os outros quatro genes estão na sequência U_S e codificam gG (UL4), gD (UL6), gI (US7) e gE (US8). O gene UL49.5 codifica a proteína N, considerada uma glicoproteína falsa (MUYLKENS et al., 2007).

Figura 2 - Morfologia e organização genômica do alfa herpesvírus bovino 1 (BoHV-1).



O genoma DNA linear de fita dupla contém um arranjo de uma unidade única longa (U_L) e uma unidade única curta (U_S), flanqueada por duas sequências de repetição invertida, denominadas repetição interna (IR) e repetição terminal (TR). O genoma inclui dez genes que codificam seis glicoproteínas que estão localizadas no segmento U_L e quatro no segmento dos U_S . O segmento U_S pode ter duas orientações, conforme representado pelas setas. O segmento U_L é predominantemente presente em uma orientação. A seta pontilhada do segmento

U_L ilustra que cerca de 5% dos genomas mostram o segmento U_L nessa orientação invertida. Fonte: adaptado de THIRY et al. (2006).

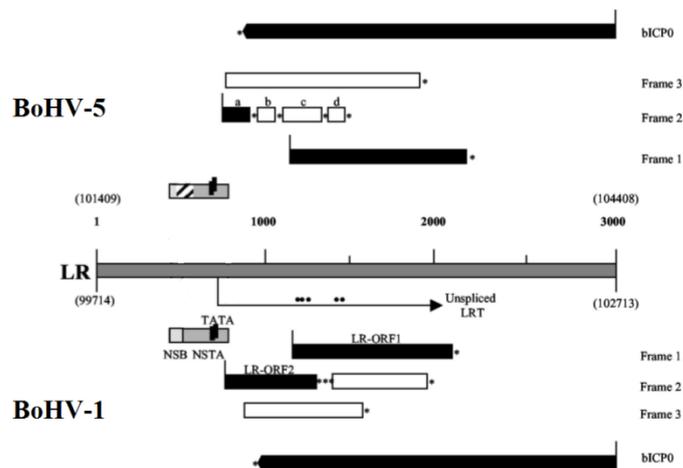
A gK está relacionada com a prevenção da fusão das células infectadas com células adjacentes evitando formação de sincícios (ROBINSON et al., 2008). A gC faz a mediação da ligação dos vírions aos receptores glicosaminoglicanos do heparan sulfato localizados na membrana celular, assim como a gB (LI et al., 1995; LI et al., 1996). A gH forma heterodímeros com a gL e atua na fusão do envelope viral com a membrana celular (MEYER et al., 1999). Além disso, a gL é necessária para o processamento e transporte da gH, que é uma das glicoproteínas mais conservadas entre os membros dessa família viral, sendo importante alvo de anticorpos neutralizantes (BARANOWSKI et al., 1996; KHATTAR et al., 1996). A fusão das gps gH e gL é essencial para glicosilação e formação de epítomos (KHATTAR et al., 1996). A gM atua no envelopamento viral e na inibição da fusão de células infectadas (CRUMP et al., 2004). Além dos genes dessas seis gps que estão localizadas na porção U_L do genoma, temos outros genes localizados na porção U_S do genoma e que transcrevem a gG, que mantém a junção celular entre as células infectadas e facilita a disseminação do vírus entre células (NAKAMICHI et al., 2002); a gD, que está relacionada com a ligação do receptor de entrada celular nectin-1 e a disseminação entre células (KALTHOFF et al., 2008; GABEV et al., 2010); a gI e gE, que formam heterodímeros que facilitam a disseminação da progênie viral entre células (REBORDOSA et al., 1996; YOSHITAKE et al., 1997).

O BoHV-1 e BoHV-5 possuem grande similaridade genética, antigênica e biológica (VOGEL et al., 2002; VARELA et al., 2010). Devido a essas semelhanças o BoHV-5 era anteriormente considerado uma variante neuropatogênica do BoHV-1 (FRENCH, 1962a; FRENCH, 1962b). O BoHV-5 foi reconhecido como vírus distinto pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus, em 1992 e deixou de ser identificado como BoHV-1.3 (ROIZMANN et al., 1992). O genoma do BoHV-5 possui 138.390 pares de base, sendo cerca de 2.500 pares de base mais longo do que o genoma do BoHV-1 (DELHON et al., 2003). O genoma do BoHV-5 também possui o rearranjo correspondente ao do tipo D e todas as ORFs do BoHV-5 estão presentes no BoHV-1. Contudo, o BoHV-5 não possui um homólogo do gene UL0.5 que está presente somente no BoHV-1 e é utilizado para diferenciação dos subtipos BoHV1.1 e BoHV-1.2 (DELHON et al., 2003; MUYLKENS et al., 2007; DEL MEDICO ZAJAC et al., 2010).

Apesar de não ser essencial para a neurovirulência, a gC pode estar relacionada com o neurotropismo e embora a gC do BoHV-5 (gC5) seja 75% idêntica a gC do BoHV-1 (gC1) o terço amino-terminal da proteína difere significativamente. Observou-se que há a deleção de aminoácidos em gC5, que remove dois potenciais sítios de glicosilação e que estão presentes em gC1 (aminoácidos 93 e 111, respectivamente) e um epítipo específico de gC1 (entre os aminoácidos 103 a 122) (DELHON et al., 2003).

Os vírus da subfamília *Alphaherpesvirinae* possuem a característica de estabelecer infecção latente nos gânglios nervosos de hospedeiros infectados (ROCK, 1993). Ao contrário do que ocorre na fase lítica da replicação viral, na fase de latência o gene relacionado à latência (LR) é o único gene viral expresso em neurônios infectados (ROCK, 1993). Os produtos do gene LR inibem a entrada das células na fase S, sugerindo que esse gene regula algum aspecto da latência (SCHANG et al., 1996), inibe a ativação dependente de BICP0 da infecção produtiva (GEISER et al., 2002) e inibe a apoptose (CIACCI-ZANELLA et al., 1999). O BoHV-1 e BoHV-5 possuem diferenças nas sequências relacionadas a latência conforme ilustrado na Figura 3.

Figura 3 - Comparação entre as regiões LR do alfa herpesvírus bovino 1 (BoHV-1) e alfa herpesvírus bovino 5 (BoHV-5).



As posições dos nucleotídeos LR estão localizadas acima (BoHV-5) e abaixo (BoHV-1). Os asteriscos indicam as posições dos códons de parada. O regulador transcricional neurônio-específico do BoHV-1 das regiões NSB e NSTA estão representadas por uma caixa cinza. A caixa hachurada na região reguladora do BoHV-5 representa a sequência deletada. Fonte: Adaptados de Delhon et al (2003).

O BICP0, gene que pode estar relacionado a fator de virulência, é transcrito em dois momentos pós infecção, sendo transcritos *immediate-early* (IE) e *early* (E) (DELHON et al.,

2003). Sugere-se que os mecanismos de controle da transcrição de BICP0 são muito semelhantes entre o BoHV-1 e BoHV-5, mesmo o BICP0 do BoHV-5 sendo cerca de 44 aminoácidos mais longo (DELHON et al., 2003). A região LR do BoHV-5 difere substancialmente da região LR do BoHV-1 tanto na codificação quanto na transcrição das regiões reguladoras (DELHON et al., 2003).

Conforme demonstrado na Figura 3, Enquanto os dois vírus possuem a ORF1 com 66% de similaridade, a ORF2 é bem diferente entre eles. No BoHV-1 a LR-ORF2 pode codificar 181 aminoácidos e uma região de leitura *downstream* sem uma metionina inicial, já no BoHV-5 LR-ORF2 é interrompida quatro vezes, resultando nas fases de leitura de *a* a *d*, onde *a* é a única fase iniciada com uma metionina (DELHON et al., 2003). Além disso, o promotor que conduz a transcrição do BoHV-1 LR está contido próximo a porção 5' do gene LR (JONES et al., 1990) e inclui duas regiões reguladoras: região proteica de ligação específica de neurônios e ativador de transcrição específica de neurônios (NSB e NSTA, respectivamente). Enquanto as regiões próximas a TATA box são conservadas entre o BoHV-5 e o BoHV-1, as sequências de nucleotídeos na região 5' do NSTA são pouco conservadas ou ausentes no BoHV-5 (DELHON et al., 2003). Em relação ao NSB, cerca de 70% dessa região é deletada no BoHV-5 (DELHON et al., 2003). Dada a importância da região LR na latência do vírus e / ou gama de hospedeiros e a patogênese desses vírus, é provável que essas diferenças são de importância biológica para aspectos da interação vírus-neurônio-hospedeiro (DELHON et al., 2003).

2.2.2 Epidemiologia, patogenia e apresentações clínicas

O BoHV-1 apresenta-se distribuído mundialmente (RAAPERI et al., 2014), sendo detectados anticorpos reagentes tanto em bovinos quanto em outras espécies animais, como por exemplo, ovelhas e cabras (BISWAS et al., 2013). No entanto, vários países europeus implementaram com sucesso o programa de erradicação do BoHV-1. Países como Áustria, Dinamarca, Finlândia, Suécia e Suíça estão oficialmente livres do BoHV-1 (ACKERMANN & ENGELS, 2006).

No Brasil, a frequência de animais infectados é indeterminada e varia consideravelmente, dependendo da localidade analisada e tipo de criação, uma vez que esse vírus já foi encontrado em todas as regiões do país. Estudos identificam que o BoHV-1 é distribuído de forma endêmica no Brasil, sendo identificado em vários estados, como por

exemplo Goiás, com prevalência de 51,9% (BARBOSA et al., 2005), Espírito Santo (66,75%) (SANTOS et al., 2014), Rio Grande do Sul (52,9%) (PIOVESAN et al., 2013), Santa Catarina (57,54%) (PASQUALOTTO et al., 2015) e Maranhão (63,23%) (FREITAS et al., 2014). O BoHV-5 foi descrito em vários continentes, no entanto, parece ocorrer com maior frequência na América do Sul, sobretudo no Brasil e na Argentina (CARRILLO et al., 1983; PEREZ et al., 2003; SILVA et al., 2007; RISSI et al., 2008). Embora não haja relatos da doença em todos os estados, sugere-se que o BoHV-5 seja enzoótico no Brasil (CLAUS et al., 2002).

Os bovinos são os principais reservatórios e fonte de infecções, pois a perpetuação da infecção por BoHV-1 ocorre principalmente pelo contato de animais susceptíveis com animais que estejam excretando o vírus (ENGELS & ACKERMANN, 1996). A transmissão do BoHV-1 e 5 ocorre por contato direto e indireto, e também de forma indireta, por veículos ou fômites (ENGELS & ACKERMANN, 1996). O vírus é excretado através de secreções nasais, oculares, genitais, placenta de animais abortados e sêmen (KAUR & CHANDRA, 2016). A principal forma de infecção pelo BoHV-1 ocorre pela mucosa das vias respiratórias superiores e mucosa do trato genital, sendo o contato direto a forma mais comum de transmissão (MUYLKENS et al., 2007). O BoHV-1 causa predominantemente doença respiratória e genital em bovinos, embora também possa estar associado à meningoencefalite (SILVA et al., 2007). O BoHV-5 é a principal causa de meningoencefalite viral em bovinos, mas também pode infectar o trato genital (RISSI et al., 2007). Ambos os vírus foram associados a falhas reprodutivas, como por exemplo, morte embrionária precoce e abortos, que representam as perdas mais significativas relacionadas ao BoHV-1 e BoHV-5 (ENGELS & ACKERMANN, 1996; THIRY et al., 2006)

Após a replicação inicial nas células da mucosa, o BoHV-1 infecta terminações nervosas e é carregado até os corpos neuronais dos gânglios nervosos regionais (ENGELS & ACKERMANN, 1996). No sítio primário da infecção ocorre a replicação viral e posteriormente a sua disseminação, que pode ocorrer de duas formas: disseminação célula a célula, produzindo uma infecção localizada, ou os novos vírions formados podem sair para o meio extracelular, produzindo uma infecção sistêmica (ENGELS & ACKERMANN, 1996). A infecção genital requer contato direto na cópula e a transmissão genital ocorre via sêmen contaminado (OLIVEIRA et al., 2011). Após a infecção, o período de incubação pode variar de 2 a 14 dias dependendo da dose infectante, rota de inoculação (ENGELS & ACKERMANN, 1996; MUYLKENS et al., 2007; NANDI et al., 2009). Os sinais clínicos

podem variar amplamente e para um melhor entendimento serão divididos em: forma respiratória, ocular, genital e neurológica.

2.2.2.1 Forma respiratória

A forma respiratória pode ocorrer como uma infecção subclínica, leve ou grave e tanto o BoHV-1.1 quanto o BoHV-1.2 podem desencadear alterações associadas a problemas respiratórios (MILLER et al., 1991b; SPILKI et al., 2004). A morbidade se aproxima de 100% e a mortalidade pode chegar a 10% (NANDI et al., 2009). A IBR clássica é caracterizada por febre (40,5 à 42° C), inapetência, aumento da frequência respiratória, dispneia, tosse, depressão e queda acentuada na produção de leite em vacas leiteiras (SPILKI et al., 2004; NANDI et al., 2009). Há a presença de secreção nasal bilateral, que pode evoluir de secreção serosa para mucopurulenta, com hiperemia da mucosa nasal (SPILKI et al., 2004; NANDI et al., 2009).

A ocorrência de abortos também pode ser relacionada a infecção por BoHV-1 respiratório (SMITH, 1997). O aborto ocorre próximo ao quinto mês gestação, com expulsão do feto morto e fluidos fetais (BISWAS et al., 2013). Após uma viremia, o BoHV-1 atravessa a barreira materno-fetal e pode produzir uma infecção letal para o feto (OWEN et al., 1964). A forma como o herpesvírus atravessa a placenta ainda é desconhecida, mas como podem ser visualizadas lesões virais em fetos abortados, acredita-se que o vírus se dissemine de forma hematogênica via cordão umbilical (NANDI et al., 2009).

O BoHV-1 pode atuar como um importante agente no complexo respiratório bovino (VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK et al., 1993), pois sua atuação pode favorecer infecções virais e/ou bacterianas secundárias, mas favorece principalmente agentes bacterianos como *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* e *Haemophilus sommus*, podendo provocar quadros de pneumonia nos animais acometidos (YATES, 1982).

2.2.2.2 Forma ocular

Bovinos com doença respiratória por BoHV-1 frequentemente apresentam conjuntivite, que pode ser unilateral ou bilateral e está associada a grande produção de lágrimas (NANDI et al., 2009). Os animais afetados apresentam fotofobia e infecção bacteriana secundária é comum, podendo ser observado pus na secreção lacrimal (NANDI et

al., 2009). Em casos leves os sinais regredem dentro de 5 a 10 dias. Essa forma pode aparecer junto com a forma respiratória (NANDI et al., 2009). As lesões podem se estender do trato nasal até os olhos pelo ducto lacrimal e pode dar origem a conjuntivite e corrimento nasal (NANDI et al., 2009).

2.2.2.3 *Forma genital*

A vulvovaginite pustular infecciosa (IPV) na forma aguda geralmente se desenvolve 1 a 3 dias após a monta, e os sinais clínicos mais comuns no início da infecção são a micção frequente e elevação da cauda, evitando o contato da cauda com a vulva (NANDI et al., 2009; BISWAS et al., 2013). Os animais afetados desenvolvem febre, depressão, anorexia e, além disso, a vulva fica edemaciada e hiperêmica com pequenas pústulas (1–2 mm de diâmetro), que geralmente coalescem para formar membranas fibrosas brancas amareladas que se desprendem gradualmente originando úlceras (NANDI et al., 2009; BISWAS et al., 2013). As lesões geralmente cicatrizam de 10 a 14 dias após o início da doença, mas em alguns animais é possível observar corrimento vaginal persistente por várias semanas (NANDI et al., 2009).

A balanopostite pustular infecciosa (IPB) também se desenvolve após um período de incubação de 1 a 3 dias (NANDI et al., 2009). Lesões semelhantes às da IPV se desenvolvem na mucosa do pênis e prepúcio, e também pode ocorrer infecção bacteriana secundária (NANDI et al., 2009). No período de monta pode ocorrer a formação de tecido cicatricial, que pode provocar aderências extensas e distorções penianas (NANDI et al., 2009). A cura ocorre dentro de 10 a 14 dias, mas alguns animais podem perder libido, ereção e ejaculação dolorosa, sendo necessárias algumas semanas até o animal estar apto a monta regular (NANDI et al., 2009).

O sêmen contaminado com BoHV-1 pode causar IPV e endometrite em vacas, além de epididimite em touros (NANDI et al., 2009). Já foram isolados tanto BoHV-1 quanto BoHV-5 em amostras de sêmen fresco e congelados (OLIVEIRA et al., 2011). Os abortos observados nesses casos geralmente ocorrem entre 4-8 meses de gestação após infecção natural ou vacinação (MUYLKENS et al., 2007; NANDI et al., 2009), e normalmente são causados pelo BoHV-1.1 ou BoHV-1.2a (MUYLKENS et al., 2007). Frequentemente observa-se retenção de placenta, cotilédones geralmente esbranquiçados e morte fetal, causando aborto (NANDI et al., 2009).

2.2.2.4 Forma neurológica

O BoHV-1 pode infectar os neurônios, por meio de terminações nervosas contidas nas mucosas, e ascende em direção ao sistema nervoso central (SNC) (MUYLKENS et al., 2007; NANDI et al., 2009). O BoHV-1 e o BoHV-5 ascendem da mucosa nasal até o SNC via nervo olfatório e/ou trigêmeo (GERDTS et al., 2000; MUYLKENS et al., 2007).

Os bovinos afetados apresentam, inicialmente, incoordenação, que progride para ataxia, bruxismo, convulsões, depressão seguida de excitação, tremores, tropeços e quedas (CLAUS et al., 2002; NANDI et al., 2009). Quando em decúbito, os animais desenvolvem espasmos crônicos das pernas, pescoço e músculos lombares e também apresentam opistótono (NANDI et al., 2009). Coma e morte geralmente ocorrem dentro de 4 dias a partir do início dos distúrbios neurológicos (NANDI et al., 2009). Alguns animais se recuperam, mas podem ficar cegos (RISSI et al., 2007).

A meningoencefalite herpética bovina é a infecção viral do SNC, causada pelo BoHV-5, e cursa com infecção geralmente fatal, caracterizada por uma meningoencefalite não purulenta, associada a lesões necróticas do córtex cerebral e inflamatórias nas substâncias branca e cinzenta (CARRILLO et al., 1983; CLAUS et al., 2002).

2.3 VACINAS CONTRA BoHV-1 e BVDV

O controle das infecções por BoHV-1 e BVDV pode envolver vacinação e/ou medidas de manejo para se obter erradicação (DEREGT, 1998). A vacinação contra os herpesvírus visa prevenir a produção de doença clínica, excreção viral e conseqüentemente reduzir perdas econômicas (VAN OIRSCHOT et al., 1996). Já a vacinação contra o BVDV visa de proteger os animais da enfermidade clínica e promover a redução da circulação do vírus, resultando na redução da infecção fetal e na formação de animais PI (KALAYCIOGLU, 2007). Para o controle do BVDV, além de vacinação, medidas como remoção dos animais PI e de biossegurança, são importantes para manter animais com infecção aguda ou PI afastados do rebanho (DEREGT, 1998).

As vacinas convencionais para BoHV-1 e BVDV podem ser inativadas (não replicativas) ou atenuadas (replicativas), convencionais ou diferenciais e combinadas com outros vírus e/ou bactérias (VAN OIRSCHOT et al., 1996; DEREGT, 1998; VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, 2006). As vacinas inativadas são caracterizadas por estimularem

preferencialmente a resposta humoral e induzirem uma resposta imune em níveis moderados e passageiros, necessitando assim, reforços periódicos (VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK et al., 1993; VAN OIRSCHOT et al., 1996; DEREGT, 1998; VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, 2006). As vacinas inativadas são frequentemente indicadas para animais prenhes (DEREGT, 1998). Por outro lado, as vacinas atenuadas estimulam tanto a resposta humoral quanto celular, e induzem uma imunidade de maior magnitude e duração (DEREGT, 1998; VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, 2006).

Uma importante restrição tanto das vacinas inativadas quanto das atenuadas é a incapacidade na diferenciação sorológica entre animais vacinados e animais infectados naturalmente (VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, 2006). Por outro lado, existem as vacinas diferenciais, inativadas ou atenuadas, que são baseadas em cepas virais contendo deleções de um ou mais genes não-essenciais que codificam proteínas imunogênicas, o que torna possível a diferenciação sorológica dos animais vacinados (VAN OIRSCHOT et al., 1996; DEREGT, 1998). Os programas de controle / erradicação de BoHV-1 podem envolver vacinas com marcadores para diferenciar animais vacinados, de animais infectados com a cepa de campo (DEREGT, 1998).

As vacinas vivas atenuadas induzem uma resposta imunológica de magnitude maior em relação às vacinas inativadas e tem sido utilizadas para imunizar animais contra BoHV-1 (VAN OIRSCHOT et al., 1996; MEEUSEN et al., 2007). Entretanto, as vacinas replicativas apresentam risco mínimo de reversão à virulência da cepa atenuada, conferindo uma desvantagem em relação às vacinas inativadas (SHAMS, 2005).

Por esse motivo, quando refere-se, principalmente ao BVDV, o uso de vacinas vivas modificadas deve ser tratado com cautela, uma vez que a reversão à virulência da cepa vacinal pode causar imunossupressão e também infecção transplacentária em animais gestantes (SHAMS, 2005; RIDPATH, 2013). Se a infecção ocorrer no primeiro trimestre de gestação, há o risco de infecção do feto que pode resultar em um animal persistentemente infectado (PI) (RIDPATH, 2013; NEWCOMER et al., 2017). Com isso, o uso de vacinas inativadas é frequentemente empregado em programas de controle e erradicação, já que possuem vírus não replicativos em sua formulação (RIDPATH, 2013; NEWCOMER et al., 2017). A maioria das vacinas reprodutivas comercializadas no Brasil são combinações inativadas de BoHV-1 e ou BVDV juntamente com diferentes vírus e / ou bactérias, havendo apenas uma vacina comercial viva modificada licenciada e disponível no mercado brasileiro para BVDV (BRASIL, 2019b).

A vacinação de bovinos contra o BoHV-1 e BVDV no Brasil é voluntária e tem aumentado nos últimos anos, porém é realizada de forma irregular nos diferentes tipos de criação (FLORES et al., 2005). Cerca de 20 vacinas contra esses patógenos estão registradas e / ou licenciadas no Brasil, mas nem todas estão disponíveis no mercado (BRASIL, 2019b). A vacinação contra ambas as enfermidades não impede que animais vacinados sejam infectados pelo vírus de campo (VAN OIRSCHOT et al., 1996).

2.3.1 Vacinas replicativas contendo vírus vivo modificado (modified live virus – MLV – vaccines)

As vacinas MLV passam por um processo de atenuação viral, que podem ser realizada mediante passagens seriadas em cultivo celular, para realização de seleção de variantes de menor virulência, e também geração de vírus incapazes de replicar em temperaturas superiores a 37°C (termosensitivos – TS), ou ainda vírus que possam replicar em temperaturas inferiores a 25°C (*cold-adapted* – CA) (RUIZ-SAENZ et al., 2009). Outro processo de atenuação da cepa viral está relacionado a deleção de genes específicos, associados à virulência, utilizando a tecnologia recombinante, que possibilita reduzir a patogenicidade e virulência dessa cepa viral (SHAMS, 2005). Como consequência desse processo ocorre a atenuação da virulência desse organismo vivo, sem afetar a imunogenicidade (SHAMS, 2005).

A estimulação da resposta imune celular e humoral se dá, pois a multiplicação da cepa vacinal nas células do animal vacinado leva a apresentação de antígenos virais tanto pela via MHC classe I quanto do MHC classe II (JONES & CHOWDHURY, 2007). Após a vacinação, a proteção sistêmica e de mucosas se estabelece em um período de 2 a 3 semanas, e que pode se estender por prolongados períodos de tempo (RUIZ-SAENZ et al., 2009).

Algumas vantagens significativas das vacinas replicativas são a sua forma de administração e a possibilidade de realizar combinações com outros vírus, assim como combinações com bactérias (SHAMS, 2005; RUIZ-SAENZ et al., 2009). Porém, apesar dessas vantagens, além de induzir uma resposta imune humoral e celular, esse tipo de vacina possui algumas desvantagens como, por exemplo, reversão da virulência, além de ocorrência de abortos em fêmeas gestantes (MILLER et al., 1991a), formação de animais PI (RIDPATH, 2013; NEWCOMER et al., 2017) e também o estabelecimento de latência pela cepa vacinal (VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK et al., 1993). A reativação da latência de cepas

vacinais, principalmente quando refere-se a BoHV-1, após a ocorrência de imunossupressão por corticoides, pode levar reinfecção e transmissão do vírus para animais gestantes, podendo causar episódios de aborto (JONES & CHOWDHURY, 2007; RUIZ-SAENZ et al., 2009). Os problemas apresentados pelas vacinas atenuadas podem ser minimizados com o uso de vacinas inativadas (RUIZ-SAENZ et al., 2009).

2.3.2 Vacinas inativadas ou não replicativas

As vacinas inativadas são produzidas pela multiplicação do vírus em cultivo celular, seguida de inativação física ou química, (RUIZ-SAENZ et al., 2009). Os inativantes mais utilizados são formaldeído, β -propiolactona e a etilenimina binária – BEI (VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, 2006). Além desses inativantes, etanol, inativação por calor ou por luz UV também podem ser utilizados (RUIZ-SAENZ et al., 2009).

Vacinas inativadas são usualmente mais seguras do que as vacinas vivas atenuadas, sendo as mais indicadas para fêmeas gestantes, pois não causam aborto nem disseminação do vírus (RUIZ-SAENZ et al., 2009). Outras vantagens desse tipo de vacina são: não estabelecimento de infecção latente; e permitir a fabricação de vacinas multivalentes, pois não ocorre interferência na produção de anticorpos contra outros antígenos inativados (RUIZ-SAENZ et al., 2009). No entanto, as vacinas inativadas são geralmente menos eficazes do que vacinas vivas atenuadas, porque produzem apenas imunidade humoral e não previnem infecções latentes após a exposição ao vírus de campo (RUIZ-SAENZ et al., 2009).

Algumas desvantagens desse tipo de vacina podem estar relacionadas ao processo de inativação, onde o tratamento químico ou físico, usado para inativação viral, pode destruir epítomos neutralizantes do vírus, por meio de degradação das proteínas, durante a inativação, resultando em uma fraca resposta de anticorpos neutralizantes e conseqüentemente baixa proteção (DELRUE et al., 2012; BURRELL et al., 2017). Outra desvantagem observada é a necessidade de realizar mais de uma dose vacinal para induzir títulos neutralizantes (RUIZ-SAENZ et al., 2009). Esses títulos neutralizantes, mesmo assim, são variáveis e alguns animais podem não soroconverter (SCHUDEL et al., 1986). No entanto, a proteção induzida por vacinas virais inativadas baseia-se, preponderantemente, na capacidade de estimular a produção de anticorpos neutralizantes (MCVEY & SHI, 2010).

Alguns estudos avaliando a eficácia de vacinas contra o BoHV-1, realizados no Brasil, observaram que mesmo após três aplicações de vacina inativada, os animais desenvolveram

títulos de anticorpos neutralizantes variáveis e alguns animais não soroconverteram (VOGEL et al., 2002). Em outro estudo avaliando a eficácia de vacinas comerciais, foi possível verificar que a maioria das vacinas comerciais disponíveis no Brasil são ineficientes para BoHV-1 (ANZILIERO et al., 2015).

Tendo em vista a capacidade reduzida de indução de anticorpos neutralizantes por parte das vacinas inativadas, a adição de adjuvantes e utilização de doses múltiplas se fazem necessárias para melhorar a imunogenicidade desse tipo de vacinas (JONES & CHOWDHURY, 2007).

2.3.3 Outras vacinas

As vacinas com marcadores antigênicos são obtidas pela deleção de um ou mais genes não-essenciais que codificam proteínas imunogênicas, por meio de manipulação genética, tornando possível a diferenciação sorológica entre animais vacinados e animais infectados (VAN OIRSCHOT et al., 1996; DEREGT, 1998; KALAYCIOGLU, 2007). Vacinas obtidas com esta estratégia são chamadas de vacinas DIVA (*differentiating infected from vaccinated animals*), sendo as mais utilizadas em planos de vacinação de programas de controle e erradicação em país/região, onde os métodos convencionais de segregação e eliminação dos animais infectados são impraticáveis (KALAYCIOGLU, 2007; RUIZ-SAENZ et al., 2009).

Devido a problemas em relação à segurança de vacinas vivas, ou mesmo em relação à falha das vacinas inativadas em induzir proteção, existe uma tendência de se desenvolver vacinas de subunidade, de DNA ou vacinas com vetores virais recombinantes (DONIS, 1995; KALAYCIOGLU, 2007). Neste contexto são incluídas as vacinas recombinantes, as quais podem ser replicativas (vacinas com marcadores, vacinas atenuadas e portadores de vetores vacinais bacterianos ou virais) ou não replicativas (vacinas de subunidade) (RUIZ-SAENZ et al., 2009).

As vacinas de subunidade utilizam apenas a porção imunogênica de uma proteína, sendo utilizadas nesse sistema geralmente as glicoproteínas de envelope e/ou proteínas do capsídeo (RUIZ-SAENZ et al., 2009). Porém, assim como ocorre com as vacinas inativadas, as vacinas de subunidade também necessitam da adição de adjuvantes para se obter uma resposta imune eficaz (RUIZ-SAENZ et al., 2009; JORGE & DELLAGOSTIN, 2017).

Vacinas vetoriais utilizam vírus natural ou artificialmente atenuados para carrear um ou mais genes, mas também pode-se utilizar plantas e bactérias como vetores, pois podem

codificar antígenos virais imunoprotetores de diferentes vírus (RUIZ-SAENZ et al., 2009; JORGE & DELLAGOSTIN, 2017). Um exemplo deste tipo de vacinas descreve a utilização de BoHV-4 expressando a gD do BoHV-1, em que houve indução de anticorpos neutralizantes específicos contra a gD, porém sem o desenvolvimento de anticorpos neutralizantes para o vetor viral (DONOFRIO et al., 2006).

2.4 USO DE ADJUVANTES EM VACINAS

Adjuvantes são substâncias e formulações que auxiliam na indução de resposta imune a antígenos, principalmente inativados, bem como reduzir a dose antigênica (SHAMS, 2005; COFFMAN et al., 2010; LEE & NGUYEN, 2015). Os adjuvantes possuem diferentes mecanismos de ação, como por exemplo, aumentar a duração da resposta imune, ativar linfócitos T citotóxicos, aumentar a avidéz e a especificidade da resposta de anticorpo, impedir ou reduzir a competição de antígenos em vacinas combinadas e aumentar a potência de antígenos em indivíduos com o sistema imune imaturo, além de aumentar a estabilidade das vacinas, tornando-as menos suscetíveis à degradação que pode ocorrer durante o armazenamento (SHAMS, 2005; BASTOLA et al., 2017).

Até o momento, numerosos compostos orgânicos ou inorgânicos, de origem sintética ou natural, demonstram capacidade de estimular respostas imunes com potentes propriedades adjuvantes potentes (BURAKOVA et al., 2018). Essas substâncias podem ser divididas em dois grupos: grupo dos imunoestimulantes [saponinas, receptor *Toll-like* (TLR) agonistas, citocinas], que estimulam as células apresentadoras de antígenos (APCs) e promovem a secreção de várias citocinas; e grupo dos agentes de entrega (emulsões, micropartículas, sais minerais), que ajudam a preservar a conformação do antígeno para apresentação adequada aos APCs e promove uma liberação lenta para estimulação imunológica contínua (BURAKOVA et al., 2018).

Os adjuvantes mais comumente utilizados em vacinas incluem sais minerais (alumínio), saponinas, emulsões oleosas, complexos imunoestimulantes (*immunestimulating complexes* – ISCOM), derivados bacterianos, micropartículas poliméricas, derivados de carboidratos, dentre outros (RESENDE et al., 2003; SPICKLER & ROTH, 2003; BASTOLA et al., 2017; BURAKOVA et al., 2018). Em vacinas de uso veterinário, os adjuvantes mais utilizados são emulsões oleosas, ISCOMs e hidróxido de alumínio, que é um dos primeiros adjuvantes utilizados em vacinas (BURAKOVA et al., 2018). No entanto, a busca por novas

formulações é constante e nos últimos anos diferentes combinações de adjuvantes estão sendo testados (GARG et al., 2017). Adjuvantes de combinação como Montanides (BAYRY et al., 1999; ASLAM et al., 2013; DAR et al., 2013), ISCOMs (MOREIN & BENGTSSON, 1998; BAYRY et al., 1999), Lipossomas (KORSHOLM et al., 2012; BASTOLA et al., 2017), CpG (KOVACS-NOLAN et al., 2009; SNIDER et al., 2014), dentre outros, têm sido testados em humanos e animais e geraram resultados promissores (VOGEL, 2000; BURAKOVA et al., 2018).

Algumas das características envolvidas na seleção do adjuvante são: o antígeno, as espécies a serem vacinadas, a via de administração e a probabilidade de efeitos colaterais (PETROVSKY & AGUILAR, 2004). Além disso, o idealiza-se um adjuvante estável, de vida útil longa, que seja biodegradável, de produção barata, que não induza resposta imune contra ele mesmo e que promova uma resposta imune adequada (PETROVSKY & AGUILAR, 2004). Em geral, os adjuvantes ativam o sistema imunológico inato através de PRRs presentes nas células imunológicas. A maioria dos adjuvantes imunoestimuladores atua como ligante para PRRs (*pattern recognition receptors*) e levam à secreção de citocinas, aumentando diretamente sua via de ativação (COFFMAN et al., 2010).

2.4.1 Sais minerais

Os compostos de alumínio foram os primeiros adjuvantes utilizados em vacinas (BURAKOVA et al., 2018) e possuem um ótimo perfil de segurança, no entanto induzem uma produção de anticorpos fraca à moderada contra o antígeno associado (GUPTA, 1998) e raramente induzem resposta celular (PETROVSKY & AGUILAR, 2004). Isto se explica, pois há uma forte ligação entre o antígeno e o adjuvante contendo hidróxido de alumínio, que reduz a quantidade de antígeno eluído, resultando em uma fraca produção de anticorpos (HANSEN et al., 2007).

Existem vários relatos sobre o uso de adjuvantes de alumínio em diversas vacinas na medicina veterinária e humana (BURAKOVA et al., 2018). Os adjuvantes de alumínio promovem a secreção de interleucina (IL)-4, que estimula T *helper* 2 (Th2) imune, induzindo a produção de imunoglobulinas IgG1 e IgE e eosinófilos, tornando esses adjuvantes bons candidatos para vacinas antibacterianas e / ou antiparasitárias (BURAKOVA et al., 2018). Para melhorar a eficácia dos compostos de alumínio em vacinas virais, a estratégia se

norteia na coadministração de outros adjuvantes para estimular as células Th1 (BURAKOVA et al., 2018).

Um estudo realizado por LI et al. (2014) avaliou a atividade desse adjuvante contendo nano ou micropartículas de hidróxido de alumínio. A produção de anticorpos, induzida por antígenos adjuvados com nanopartículas de hidróxido de alumínio, foi maior e mais duradoura que a resposta induzida a antígenos adjuvados com micropartículas. Sugere-se que as nanopartículas de hidróxido de alumínio facilitem a captação do antígeno pelas células APCs (LI et al., 2014).

2.4.2 Emulsões à base de óleo

Uma emulsão é a dispersão de duas fases imiscíveis, como por exemplo, água e óleo, acrescidos de surfactantes para estabilizar o sistema de emulsão (AUCOUTURIER et al., 2001). Existem diferentes classes de emulsões, sendo elas óleo em água, água em óleo, água em óleo em água, óleo em água em óleo, dentre outras (BASTOLA et al., 2017).

O adjuvante óleo em água (o / a) é formado pela dispersão de gotículas de óleo em uma fase aquosa (BURAKOVA et al., 2018), envolve a resposta inflamatória inata e recrutamento e ativação de APCs (BASTOLA et al., 2017). Ele também facilita a persistência de antígenos no local da injeção e melhora a entrega de antígenos às células imunocompetentes (LEROUX-ROELS, 2010). Um exemplo de adjuvante óleo em água é o Emulsigen.

O Emulsigen em combinação com DDA, principal agente imunoestimulador, induz uma resposta de Th1 e Th2, sendo comumente utilizado em vacinas de subunidade (VAN DONKERSGOED et al., 1996; VAN ROOIJ et al., 2002; LI et al., 2006; ORESKOVIC et al., 2019). Esse adjuvante induz uma forte resposta inflamatória, com secreção de diferentes citocinas e quimiocinas, ativando a resposta imune, recrutando neutrófilos no local da administração, e causando uma rápida maturação e ativação de células dendríticas (ORESKOVIC et al., 2019).

A combinação entre Emulsigen e DDA, induz grande reação inflamatória no local da aplicação, por causa do DDA. Devido a isso, alguns estudos buscam alternativas para reduzir reações secundárias, sendo sugerido, por exemplo, o uso de CpG ODN em combinação com Emulsigen para reduzir a reação inflamatória local após a vacinação (IOANNOU et al., 2002). Essa combinação de adjuvantes já foi testada contra o vírus da hepatite C (LI et al., 2006) e

BVDV (LIANG et al., 2006), por exemplo. Além disso, o Emulsigen tem sido testado e utilizado em vacinas contra *Toxoplasma gondii* (HISZCZYNSKA-SAWICKA et al., 2010), BoHV-1 (IOANNOU et al., 2002), vírus da Raiva (KAUR et al., 2010), BoHV-5 (DUMMER et al., 2014), dentre outros.

As emulsões de água em óleo (a / o) são dispersões de gotículas de água no interior de uma fase oleosa (BURAKOVA et al., 2018). Acredita-se que esse tipo de emulsão atue induzindo inflamação local e aumenta o recrutamento e a ativação de APCs (LEROUX-ROELS, 2010). Por isso, reações inflamatórias, formação de granuloma e úlceras no local da injeção são alguns efeitos colaterais associados a emulsões (BASTOLA et al., 2017). Adjuvantes como adjuvante completo de Freund (CFA), adjuvante incompleto de Freund (IFA) e Montanide ISA 660 VG, são emulsões água em óleo (BASTOLA et al., 2017). O mecanismo de ação dessas emulsões inclui a formação de depósitos no local da injeção, permitindo a liberação lenta de antígeno e estimulação de anticorpos (PETROVSKY & AGUILAR, 2004).

O Montanide, tem sido usado em vacinas experimentais para ratos, camundongos, cães e gatos, usando diferentes tipos de materiais sintéticos, recombinantes e antígenos naturais (BASTOLA et al., 2017). Além disso, é possível encontrar o Montanide como emulsão água em óleo em água, que induz uma resposta imune protetora de curto e longo prazo, estimulando a resposta imune humoral e mediada por células (BURAKOVA et al., 2018). Esse adjuvante é compatível com antígenos inativados e também com recombinantes. Vários tipos de emulsões têm sido utilizados, com diferentes óleos naturais, a fim de encontrar formulações mais estáveis, potentes e menos tóxicas (PETROVSKY & AGUILAR, 2004).

2.4.3 Saponina e complexos imunoestimulantes (ISCOMs)

Saponinas são glicosídeos tensoativos que contêm um núcleo hidrofóbico e de estrutura triterpenóide com cadeias de carboidratos ligadas ao núcleo (PETROVSKY & AGUILAR, 2004). As saponinas induzem um forte efeito adjuvante para antígenos T-dependentes e T-independentes, além de induzir forte resposta citotóxica de linfócitos CD8+ e potencializar a resposta imune de mucosa (PETROVSKY & AGUILAR, 2004). A saponina mais utilizada é a Quil A (BURAKOVA et al., 2018).

Quil A é uma saponina derivada de um extrato aquoso da casca de *Quillaja saponária* composto por mais de 23 saponinas diferentes (PETROVSKY & AGUILAR, 2004;

BASTOLA et al., 2017). Frações purificadas deste estrato têm sido estudadas como alternativas para a utilização de hidróxido de alumínio (PETROVSKY & AGUILAR, 2004). Quil A é utilizado com sucesso em vacinas veterinárias, mas é considerado muito tóxico para humanos (PETROVSKY & AGUILAR, 2004; BURAKOVA et al., 2018).

A combinação de colesterol, fosfolipídios e uma fração purificada de Quil-A em complexos imunoestimulantes (ISCOMs) ajudam a melhorar a estabilidade e reduzir a toxicidade da saponina (BURAKOVA et al., 2018). Os ISCOMS são particularmente eficazes na ativação da imunidade celular, estimulando a resposta de células CD4+ e CD8+ (BURAKOVA et al., 2018). Os ISCOMs atuam induzindo a produção de altas concentrações de anticorpos duradouros e por induzindo uma resposta imune Th1 e Th2 equilibrada, com células T multifuncionais e CTLs (BASTOLA et al., 2017).

3 CAPÍTULO I

Indução de anticorpos neutralizantes contra herpesvírus bovino e vírus da diarreia viral bovina por vacinas comerciais e vacina experimental associada com diferentes adjuvantes¹

Evelyn K. Dotto^{2,3}, Rudi Weiblen², Eduardo F. Flores²

(Artigo a ser submetido à revista *Ciência Rural* – 2020)

Indução de anticorpos neutralizantes contra herpesvírus bovino e vírus da diarreia viral bovina por vacinas comerciais e vacina experimental associada com diferentes adjuvantes

Induction of neutralizing antibodies against bovine herpesvirus and bovine viral diarrhea virus by commercial and experimental vaccines with different adjuvants.

Evelyn K. Dotto^{1,2}, Rudi Weiblen^{1,2}, Eduardo F. Flores^{1,2*}

ABSTRACT

Bovine alphaherpesvirus 1 (BoHV-1) and *Bovine viral diarrhea virus* (BVDV) are important pathogens of cattle whose losses may be prevented by vaccination. This study evaluated the serological response induced by commercial vaccines and by an experimental vaccine associated with different adjuvants. For this, groups of seronegative heifers were immunized twice (30 days apart) with nine commercial vaccines and tested for virus neutralizing (VN) antibodies to the respective viruses 30 days after the second vaccine dose (D60). For the adjuvant test, inactivated BoHV-1 and BVDV-1 antigens were combined with six different adjuvants and submitted to the same immunization and serology protocol. Seven out of nine commercial vaccines induced VN antibodies to BoHV-1 at day D60, but only three induced titers considered protective (≥ 16). The frequency of seroconversion among the vaccines varied from 0% (0/10 animals) to 100% (10/10) and the geometric mean titers (GMT) ranged from 0 to 43. The frequency of seroconversion in protective titers was 100%, 37,5%, and 25%, respectively. Only four vaccines induced neutralizing titers to BVDV-1 and three to BVDV-2 at D60. The frequency of seroconversion to BVDV among the vaccines varied from 0% (0/10 animals) to 100% (10/10) and the geometric mean titers (GMT) ranged from 0 to 202. Only three vaccines conferred titers compatible with protection (>60). The frequency of seroconversion in protective titers was 55,5%, 42,8% and 12,5% for BVDV-1 and 100% and 57,1% for BVDV-2. All experimental vaccine formulations induced VN titers against BoHV-1 at D60 (frequency of seroconversion varied from 0% to 100% and GMT varied from 2 to 20) and four induced protective titers. The frequency of seroconversion in protective titers was 100%, 33,3%, 30% and 20%, respectively. On the other hand, none of the experimental vaccines was able to induce VN antibodies to BVDV at D60. Under the conditions of the present study, most commercial vaccines induced unsatisfactory VN response against the tested viruses, most noticeably to BVDV. Among the experimental

vaccines, the adjuvant Emulsigen - DL90 (DDA) was more effective to induce VN antibodies against BoHV-1, but not to BVDV. These results indicate the need for reformulation of vaccine composition and/or immunization protocols as to achieve more consistent serological response to BoHV-1 and, especially, to BVDV.

INDEX TERMS: commercial vaccines, adjuvants, neutralizing antibodies, vaccine response, bovine viral diarrhea virus, bovine herpesvirus.

¹Setor de Virologia, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, Centro de Eventos da UFSM, Rua Z, prédio 63A, Santa Maria, RS, Brasil, CEP: 97105-900.

²Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, Santa Maria, RS, Brasil.

* Autor para correspondência. E-mail: eduardofurtadoflores@gmail.com

RESUMO

O alfa herpesvírus bovino 1 (BoHV-1) e o vírus da diarréia viral bovina (BVDV) são patógenos importantes em bovinos cujas perdas podem ser reduzidas pela vacinação. Este estudo avaliou a resposta sorológica induzida por vacinas comerciais e por uma vacina experimental inativada associada com diferentes adjuvantes. Para isso, grupos de novilhas foram imunizados duas vezes (com intervalo de 30 dias), com nove vacinas comerciais, e amostras de soro foram testadas pela técnica de neutralização viral (VN), para avaliar a indução de anticorpos neutralizantes para seus respectivos vírus, 30 dias após a segunda dose (D60). Para o teste de adjuvante, antígenos de BoHV-1 e BVDV-1 inativados foram combinados com seis adjuvantes diferentes e submetidos ao mesmo protocolo de imunização e sorologia. Sete de nove vacinas comerciais induziram anticorpos contra o BoHV-1 no dia D60, mas apenas três induziram títulos considerados protetores (≥ 16). A frequência de soroconversão entre as vacinas variou de 0% (0/10 dos animais) a 100% (10/10) e os títulos médios geométricos (GMT) variaram de 0 a 43. A frequência de soroconversão em títulos protetores foi de 100%, 37,5%, e 25%, respectivamente. Somente quatro vacinas induziram títulos neutralizantes contra o BVDV-1 e três ao BVDV-2 no D60. A frequência de soroconversão para o BVDV variou de 0% (0/10 animais) a 100% (10/10) e os títulos médios geométricos (GMT) variaram de 0 a 202. Apenas três vacinas conferiram títulos compatíveis com proteção (> 60). A frequência de soroconversão em títulos protetores foi de 55,5%, 42,8% e 12,5% para BVDV-1 e 100% e 57,1% para BVDV-2. Todas as formulações vacinais experimentais induziram títulos neutralizantes contra BoHV-1 no D60 (a frequência de

oroconversão variou de 0% a 100% e o GMT variou de 2 a 20), mas apenas quatro induziram títulos protetores. A frequência de oroconversão em títulos protetores foi de 100%, 33,3%, 30% e 20%, respectivamente. Por outro lado, nenhuma das vacinas experimentais foi capaz de induzir anticorpos neutralizantes para BVDV em D60. Nas condições do presente estudo, a maioria das vacinas comerciais induziu resposta insatisfatória na VN contra os vírus testados, sendo mais evidente para o BVDV. Entre as vacinas experimentais, o adjuvante Emulsigen - DL90 (DDA) foi o mais eficaz na indução de anticorpos contra o BoHV-1, mas não contra o BVDV. Estes resultados indicam a necessidade de reformulação da composição das vacinas e / ou protocolos de imunização, para obter resposta sorológica mais consistente para o BoHV-1 e, principalmente, para o BVDV.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: vacinas comerciais, adjuvantes, anticorpos neutralizantes, resposta vacinal, vírus da diarreia viral bovina, herpesvirus bovino.

INTRODUÇÃO

O alfa herpesvírus bovino 1 (*Bovine alphaherpesvirus 1*, BoHV-1), 5 (*Bovine alphaherpesvirus 5*, BoHV-5) e vírus da diarreia viral bovina (*Bovine viral diarrhea virus*, BVDV) são patógenos importantes de bovinos. O BoHV-1 e BoHV-5 pertencem a família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae* e gênero *Varicellovirus* (ICTV, 2019). O BoHV-1 é frequentemente associado com doença respiratória (rinotraqueíte infecciosa bovina – IBR), doença genital (vulvovaginite em fêmeas e balanopostite em touros), infertilidade e abortos e infecção de animais jovens (ENGELS & ACKERMANN, 1996). O BoHV-5 é associado a encefalites de curso geralmente fatal (DEL MEDICO ZAJAC et al., 2010). O BVDV pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Pestivirus*, e abrange três espécies virais distintas: BVDV-1 (*Pestivirus A*), BVDV-2 (*Pestivirus B*) e HoBiPeV (*Pestivirus H*) (ICTV, 2019). As infecções causadas pelo BVDV podem resultar em uma variedade de manifestações clínicas, que incluem doença reprodutiva e/ou respiratória, digestiva, síndrome hemorrágica, infecções persistentes (PI) e doença das mucosas (DM), além de perdas reprodutivas como mortalidade embrionária ou fetal, abortos e natimortalidade (BAKER, 1995).

O BoHV-1 e BoHV-5 possuem grande similaridade biológica, antigênica e genética, o que dificulta a diferenciação entre esses dois agentes (VOGEL et al., 2002; VARELA et al., 2010). Por outro lado, a reatividade sorológica existente entre esses agentes se constitui em um importante fator para a proteção cruzada, seja por infecção natural ou por vacinação (ANZILIERO et al., 2011). Já os pestivírus bovinos (BVDV-1, BVDV-2 e HoBiPeV)

possuem grande variabilidade genética e antigênica, resultando em níveis variáveis de reatividade cruzada entre os vírus da mesma espécie e reatividade muito baixa ou inexistente entre vírus de espécies diferentes. Este último contexto reforça a necessidade de incluir as cepas BVDV-1, BVDV-2 e HoBiPeV nas formulações de vacinas (BIANCHI et al., 2011).

A vacinação de bovinos contra o BoHV-1 e BVDV no Brasil é voluntária e tem aumentado nos últimos anos, porém ainda é incipiente para um rebanho bovino de mais de 200 milhões de cabeças (FLORES et al., 2005; BRASIL, 2019a). Cerca de 20 vacinas contra esses patógenos estão registradas e / ou licenciadas no Brasil, mas nem todas estão disponíveis no mercado (BRASIL, 2019b). No entanto, nenhuma das vacinas disponíveis contém cepas de HoBiPeV em sua composição e, com exceção de uma vacina comercial viva modificada, todas as outras formulações comerciais contêm cepas de BVDV inativadas (BRASIL, 2019b). Em relação aos herpesvírus, a maioria das vacinas licenciadas contém cepas inativadas de BoHV-1, algumas contêm também o BoHV-5, mas também há o licenciamento de algumas vacinas contendo cepas de BoHV-1 atenuadas (BRASIL, 2019b). As vacinas contra BoHV-1 e BVDV apresentam combinações diferentes de antígenos ou cepas e podem ser combinadas com outros agentes virais e bacterianos (Brasil 2019).

A proteção induzida por vacinas virais inativadas baseia-se, preponderantemente, na capacidade de estimular a produção de anticorpos neutralizantes (MCVEY & SHI, 2010). No entanto, a relação entre níveis de anticorpos neutralizantes e proteção *in vivo* é difícil de ser estabelecida. Como parâmetro, sugere-se que títulos mínimos de anticorpos neutralizantes para proteger os animais desafiados com o BoHV-1 e BVDV sejam aproximadamente ≥ 16 e ≥ 60 , respectivamente (POSPISIL et al., 1996; FULTON & BURGE, 2000).

Nesse contexto, adjuvantes são frequentemente usados para aumentar a imunogenicidade de antígenos inativados e, assim, reduzir a dose vacinal (COFFMAN et al., 2010; LEE & NGUYEN, 2015). Os mecanismos de ação da maioria dos adjuvantes são pouco compreendidos, mas incluem retardar a absorção/degradação dos antígenos (efeito *depot*) (JORGE & DELLAGOSTIN, 2017), aumentar o tempo de exposição ao sistema imunológico, recrutar células inflamatórias (neutrófilos, macrófagos, células dendríticas) (BASTOLA et al., 2017; BURRELL et al., 2017), opsonização ou facilitação de fagocitose, ativação de linfócitos T e células dendríticas, aumento da captura e apresentação de antígenos por células apresentadoras de antígeno (BASTOLA et al., 2017; JORGE & DELLAGOSTIN, 2017). Com isso, os adjuvantes provocam aumento na duração da resposta imune, potencialização dos efeitos dos antígenos em indivíduos com o sistema

imune imaturo, ativação de linfócitos T citotóxicos (CTLs), incremento na avidéz e a especificidade de anticorpos e redução ou prevenção na competição de antígenos em vacinas combinadas (SHAMS, 2005; MCVEY & SHI, 2010).

Os adjuvantes mais utilizados em vacinas incluem sais minerais (alumínio), saponinas, emulsões oleosas, complexos imunoestimulantes (ISCOM – *immunostimulating complexes*), derivados bacterianos, micropartículas poliméricas, derivados de carboidratos, dentre outros (RESENDE et al., 2003; SPICKLER & ROTH, 2003; BASTOLA et al., 2017; BURAKOVA et al., 2018). Em vacinas de uso veterinário os adjuvantes mais utilizados são emulsões oleosas, ISCOMs e hidróxido de alumínio, que foi um dos primeiros adjuvantes utilizados em vacinas (BURAKOVA et al., 2018). No entanto, a busca por novas formulações é constante e, nos últimos anos, vários adjuvantes combinados estão sendo testados (GARG et al., 2017). Adjuvantes de combinação como Montanides (BAYRY et al., 1999; ASLAM et al., 2013; DAR et al., 2013), ISCOMs (MOREIN & BENGTTSSON, 1998; BAYRY et al., 1999), Lipossomas (KORS HOLM et al., 2012; BASTOLA et al., 2017), CpG (KOVACS-NOLAN et al., 2009; SNIDER et al., 2014), dentre outros, tem sido testados em humanos e animais e tem apresentado resultados promissores (VOGEL, 2000; BURAKOVA et al., 2018).

Considerando-se a importância da vacinação na prevenção das perdas associadas com BoHV-1 e BVDV e questionamentos sobre a eficácia das vacinas, o presente trabalho avaliou a resposta sorológica neutralizante induzida por vacinas comerciais, além de investigar a imunogenicidade de uma formulação vacinal experimental inativada com antígenos do BoHV-1 e BVDV contendo diferentes adjuvantes.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho consistiu de duas partes. A primeira envolveu o teste de vacinas comerciais contra o BoHV-1 e BVDV; a segunda envolveu o teste de uma vacina experimental inativada contra o BoHV-1 e BVDV-1, na qual os antígenos virais foram conjugados a diferentes adjuvantes. Nos dois trabalhos, bovinos foram imunizados com duas doses de vacina com intervalo de aproximadamente 30 dias. Amostras de sangue para a realização de testes de neutralização viral (VN) foram coletadas nos dias 0 (primeira dose), 30pv (segunda dose) e 30 dias após o reforço vacinal (D60).

Células e vírus. A multiplicação, titulação e testes de neutralização viral (VN) do BVDV foram realizadas em células MDBK. Células CRIB (FLORES & DONIS, 1995), foram utilizados para multiplicação, titulação e VN dos herpesvírus (BoHV-1, BoHV-5). As

células foram mantidas em MEM (Vitrocell®, Nova Campinas, São Paulo - Brasil), suplementadas com penicilina (10.000UI / mL), estreptomicina (10mg / mL), ciprofloxacina (10mg / mL) e anfotericina B (250µg / mL). Para o cultivo de células MDBK e CRIB foram utilizados 10% de soro equino e soro fetal bovino, respectivamente.

As cepas Singer (BVDV-1) e VS-253 (BVDV-2), gentilmente fornecidos pelo Dr. Ruben Donis (University of Nebraska in Lincoln, Lincoln, NE, USA), foram utilizadas nos ensaios de VN para BVDV. As cepas de herpesvírus utilizadas nos testes de VN foram Cooper (BoHV-1) e SV507/99 (BoHV-5). No teste de adjuvantes foi utilizada uma cepa de BoHV-1 defectiva na glicoproteína gE (WEISS et al., 2015) e uma cepa de BVDV-1 quimérico (IBSP4/NADL) (Arenhart et al., dados não publicados).

Testes de neutralização viral (VN). As amostras de soro foram testadas para a presença de anticorpos neutralizantes contra BVDV e BoHV por VN, utilizando as cepas citadas anteriormente, de acordo com o experimento realizado. Resumidamente, os ensaios de VN foram realizados em placas de 96 cavidades, contendo diluições crescentes do soro. As amostras foram incubadas com 100–200 TCID₅₀ do respectivo vírus por 2 h. Em seguida, foi adicionada uma suspensão de células CRIB ou MDBK e as placas foram incubadas a 37 ° C com 5% de CO₂. Os títulos neutralizantes foram determinados pela presença ou não de efeito citopático nas células infectadas após 96 h de incubação. Os títulos de anticorpos foram transformados em título médio geométrico (GMT) (THRUSFIELD, 1986).

Teste de vacinas comerciais. Um total de 74 fêmeas bovinas, menores de dois anos de idade, foram utilizadas para avaliar a produção de anticorpos neutralizantes induzidos por nove vacinas comerciais disponíveis no Brasil (Tabela 1). As vacinas foram obtidas em estabelecimentos comerciais do setor agrícola. O armazenamento dos produtos e o protocolo vacinal foram realizados de acordo com as recomendações de cada fabricante.

Amostras de sangue foram coletadas previamente para identificar animais soronegativos contra BVDV e BoHV pelo teste de VN. Os animais soronegativos foram alocados em grupos de acordo com a vacina utilizada. A vacinação foi realizada aleatoriamente de acordo com a ordem de entrada dos animais no tronco de contenção. A primeira dose da vacina (D0) e a dose de reforço, realizadas após 30 dias (D30), seguiram as recomendações do fabricante. Amostras de sangue foram coletadas nos dias 30 (D30) e 60 após a vacinação (D60), para monitorar a resposta neutralizante desses animais frente às vacinas. Os testes de VN utilizaram as cepas de BVDV-1 (Singer), BVDV-2 (VS-253), BoHV-1 (Cooper) e BoHV-5 (SV507/99).

Teste de adjuvantes. O teste de adjuvantes foi realizado com uma formulação experimental inativada, contendo antígenos de BoHV-1 (BoHV-1 Δ gE) e BVDV-1 (IBSP4/NADL) conjugados com diferentes adjuvantes (Tabela 2).

Inativação viral e emulsificação. As cepas de BoHV-1 e BVDV-1 foram amplificadas em cultivo celular, quantificadas e inativadas por método químico usando etilenimina binária (BEI). Para inativação viral, foi adicionado 1% de BEI à suspensão do vírus. A suspensão viral permaneceu em agitação por 48 h a 37 ° C. Para confirmar a inativação do vírus, uma alíquota da suspensão viral inativada foi inoculada nas células CRIB e MDBK, respectivamente. As células foram monitorizadas diariamente quanto ao efeito citopático.

Após a inativação, a suspensão viral foi emulsificada com cada um dos seis adjuvantes testados. A suspensão viral continha 10⁷ TCID₅₀ / mL de BoHV-1 e 10⁷ TCID₅₀/mL de BVDV-1. A proporção de adjuvante adicionado à formulação variou de acordo com o adjuvante utilizado e suas respectivas fontes, que estão demonstradas na Tabela 2.

Experimento em animais. Cinquenta e oito fêmeas bovinas, menores de dois anos de idade, soronegativas para BoHV-1 e BVDV-1, foram alocadas em grupos de acordo com os adjuvantes testados (Tabela 2). A primeira dose da vacina (D0) e a dose de reforço, 30 dias após, foi realizada por via subcutânea. Os testes de VN foram realizados com o soro coletado no D0, dia 30 (D30) e dia 60 (D60). Os testes de VN foram realizados contra os vírus homólogos (BVDV-1 IBSP4/NADL e BoHV-1 Δ gE).

RESULTADOS

Como as recomendações para as vacinas comerciais inativadas indicam a realização de duas doses para indução de resposta imunológica, no presente estudo serão considerados os resultados da sorologia no D60 (30 dias após a segunda dose). Da mesma forma, serão considerados, para efeitos de discussão, títulos protetivos de ≥ 16 para BoHV-1 e ≥ 60 para BVDV (POSPISIL et al., 1996; FULTON & BURGE, 2000).

Teste de vacinas comerciais

Os resultados dos testes de VN realizados com soro de animais vacinados com as vacinas comerciais estão apresentados na Figura 1 e Tabela 3. A Figura 1 apresenta a frequência de soroconversão nos D30 e D60 induzida pelas diferentes vacinas (A – I). Os resultados dos testes individuais de VN e o GMT de cada grupo vacinal contra os herpesvírus

bovino (BoHV-1/BoHV-5) e BVDV (BVDV-1, BVDV-2) estão apresentados nas Tabelas 3 e 4, respectivamente.

Entre as vacinas testadas, sete induziram títulos neutralizantes para o BoHV-1 e seis para BoHV-5 no D60, mas apenas as vacinas E, F e H induziram títulos ≥ 16 (Tabela 3). Todos os animais vacinados com a vacina F produziram títulos ≥ 16 contra BoHV-1 e BoHV-5, com $\text{GMT-log}_2 = 43$ para ambos os vírus. As vacinas E e H induziram títulos neutralizantes variáveis. Apenas três animais apresentaram títulos protetores ≥ 16 contra BoHV-1 e dois animais contra BoHV-5 após imunização com a vacina E ($\text{GMT-log}_2 = 11$ para BoHV-1 e $\text{GMT-log}_2 = 8$ para BoHV-5). Em relação à vacina H, dois animais apresentaram títulos ≥ 16 para BoHV-1 e três para BoHV-5, com $\text{GMT-log}_2 = 11$ e $\text{GMT-log}_2 = 8$, respectivamente. A vacina C não induziu títulos neutralizantes contra BoHV-1 e BoHV-5, pois sua formulação vacinal contém apenas BVDV-1 e BVDV-2.

Em relação ao BVDV, quatro das nove vacinas testadas produziram títulos neutralizantes no D60 contra o BVDV-1 e três contra o BVDV-2 (Tabela 4). A vacina que induziu a maior resposta sorológica contra o BVDV-1 e BVDV-2 foi a vacina C ($\text{GMT-log}_2 = 54$ e $\text{GMT-log}_2 = 202$, respectivamente).

Com exceção das vacinas A e C, todas as outras induziram anticorpos contra o BoHV-1 no D60, com frequência que variou entre 20 e 100%. No entanto, apenas as vacinas E, F e H apresentaram títulos protetores (≥ 16) com frequência de 37,5%, 100% e 25%, respectivamente, contra BoHV-1. Já contra o BoHV-5, as vacinas A, C e I não induziram anticorpos, enquanto as outras induziram anticorpos em proporção variável dos animais (entre 10 e 100%). Apenas as vacinas E, F e H induziram títulos considerados protetivos contra BoHV-5, com frequência de 25%, 100% e 37,5%, respectivamente.

Para o BVDV, as vacinas C e F induziram anticorpos contra as espécies virais testadas (BVDV-1 e BVDV-2), com frequência entre 80 e 100%. Já a vacina E produziu anticorpos contra BVDV-1 com frequências de 100%, e frequência $< 20\%$ contra BVDV-2. No que se refere a títulos protetores (≥ 60) apenas as vacinas C, E e F induziram títulos protetivos com frequência de 55,5%, 12,5% e 42,8%, respectivamente, contra BVDV-1. Com relação à cepa de BVDV-2, apenas as vacinas C e F apresentaram títulos protetores. A vacina C apresentou frequência de anticorpos protetores de 100% contra BVDV-2, já a vacina F apresentou frequência de anticorpos protetores de 57,1% contra BVDV-2.

Teste de adjuvantes

Os resultados dos testes de VN e o GMT de cada grupo vacinal contra o BoHV-1 e BVDV-1 no D60 são apresentados na Tabela 5. Todas as formulações experimentais induziram títulos neutralizantes detectáveis contra o BoHV-1 no D60, com frequência que variou entre 30 e 100%. Essas formulações continham os adjuvantes Emulsigen - DL 90 (DDA), Montanide ISA 201, Montanide ISA 660 VG, Hidróxido de alumínio + saponina, Oleosa Biovet + saponina e Polygen (CpG). Dentre estas, quatro produziram títulos protetivos contra o BoHV-1, mas apenas a formulação contendo o adjuvante Emulsigen - DL 90 (DDA) conferiu títulos protetivos em todos os animais do grupo vacinal. Os demais grupos vacinais com formulações contendo Montanide ISA 660 VG ou Oleosa Biovet + saponina ou Polygen (CpG ODN) induziram títulos protetores com frequências de 22,2%, 30% e 20%, respectivamente (Tabela 5). Nenhuma das formulações vacinais experimentais foi capaz de induzir títulos neutralizantes detectáveis contra o BVDV no D60.

DISCUSSÃO

Os resultados dos testes de vacinas comerciais demonstraram, em geral, resposta sorológica de maior magnitude nas vacinas contendo cepa atenuada de BoHV-1 (vacina F) e na vacina contendo cepas de BVDV atenuado (vacina C). Esse resultado corrobora estudos anteriores, pois este tipo de vacina induz uma resposta imunológica de magnitude maior em relação às vacinas inativadas (MEEUSEN et al., 2007). Entretanto, vacinas atenuadas apresentam riscos inerentes à presença do agente infeccioso, como reversão à virulência e transmissão transplacentária e infecção fetal, entre outras, o que representa uma desvantagem em relação às vacinas inativadas (SHAMS, 2005).

Quando refere-se ao BVDV, o uso de vacinas vivas modificadas deve ser tratado com cautela, uma vez que o risco de reversão à virulência da cepa vacinal pode causar imunossupressão e também infecção transplacentária em animais gestantes (SHAMS, 2005; RIDPATH, 2013). Se a infecção ocorrer no primeiro trimestre de gestação, há o risco de infecção do feto que pode resultar em animal persistentemente infectado (PI) (RIDPATH, 2013; NEWCOMER et al., 2017). Por isso o uso de vacinas inativadas é comumente empregado em programas de controle e erradicação, já que possuem vírus não replicativos em sua formulação (RIDPATH, 2013; NEWCOMER et al., 2017).

As vacinas comerciais induziram resposta em níveis protetores apenas após a segunda dose vacinal. Isso se explica, pois a maioria das vacinas testadas é composta por vírus

inativados, cujo protocolo de primovacinação recomenda duas doses iniciais. Com a utilização desse tipo de vacina, a resposta imune humoral, após a primeira dose vacinal, demora cerca de três a quatro semanas para se estabelecer (CHASE, 2007). A concentração de anticorpos aumenta após 10 a 14 dias a partir da aplicação da primeira dose vacinal, porém este aumento ocorre de forma lenta (CHASE, 2007). Portanto, como a maioria das vacinas comerciais contra BoHV-1 e BVDV possuem cepas inativadas do vírus, é fundamental realizar o protocolo completo de primovacinação, de acordo com as instruções dos fabricantes. Nesse sentido, supostas falhas vacinais frequentemente estão associadas ao uso de protocolos incompletos de vacinação, e não à falhas na qualidade das vacinas.

Em geral, a maioria das vacinas comerciais foram imunogênicas contra o BoHV-1, produzindo títulos detectáveis no teste de VN. No entanto, apenas as vacinas E, F e H induziram títulos protetivos (≥ 16) contra o BoHV-1. O grupo imunizado com a vacina F apresentou títulos protetivos em todos os animais vacinados. As vacinas E e H induziram títulos ≥ 16 em 25% e 37,5% dos animais imunizados, respectivamente. Alguns países consideram aceitáveis títulos neutralizantes ≥ 8 em pelo menos 80% dos animais imunizados com vacinas atenuadas contra o BoHV-1 (US Government Printing Office, 2014). Neste contexto, as vacinas E e F induziram títulos neutralizantes em níveis e frequência satisfatórios.

Tanto a vacina E quanto a F são compostas por BoHV-1 vivo modificado (*modified live virus* - MLV), com diferença na composição do adjuvante. Dentre as oito vacinas contendo cepas de BoHV-1, apenas essas duas vacinas contêm MLV. Esse tipo de vacina induz resposta imune humoral e celular, pois a multiplicação do vírus nas células do hospedeiro induz a apresentação de antígenos virais pela via do MHC classe I e MHC classe II (JONES & CHOWDHURY, 2007). Além disso, de 2 a 3 semanas após a vacinação se estabelece uma proteção sistêmica e de mucosa, por períodos prolongados de tempo (RUIZ-SAENZ et al., 2009). Isto explica a resposta imune de maior magnitude em animais vacinados com a vacina E e F, comparado aos imunizados com vacinas inativadas.

Embora o BoHV-5 esteja presente na formulação de apenas três vacinas (A, D e H), foi possível detectar anticorpos neutralizantes contra este vírus em seis das nove vacinas testadas (B, D, E, F, G e H). Resultados semelhantes foram encontrados por Anziliero e colaboradores (2015) em que, mesmo não contendo BoHV-5 nas formulações vacinais, foi possível detectar anticorpos neutralizantes contra este vírus em níveis similares aos identificados contra BoHV-1. Isso se deve à grande similaridade antigênica entre BoHV-1 e

BoHV-5, o que resulta em extensiva reatividade sorológica e neutralização cruzada (VOGEL et al., 2002; VARELA et al., 2010). Assim, a necessidade de incluir esses dois vírus nas vacinas pode ser reavaliada, pois a proteção induzida contra um desses agentes pode, em tese, proteger contra o outro.

As vacinas contra BVDV disponíveis no mercado brasileiro são compostas por suspensão viral inativada, com exceção de uma vacina contendo o vírus vivo modificado (vacina C) (BRASIL, 2019b). Além disso, nenhuma vacina comercial disponível contém o HoBiPeV em sua composição (BRASIL, 2019b). Em nosso estudo, a resposta sorológica das vacinas comerciais contra o BVDV foi indetectável na maioria das vacinas testadas. Este perfil se repetiu quando realizada a detecção de anticorpos contra BVDV-1 e BVDV-2. Isto indica que, nas condições do presente estudo, a maioria das vacinas comerciais contra BVDV disponíveis no mercado não induzem títulos adequados (ou mesmo detectáveis) de anticorpos, quando testadas no D60 após o protocolo de primovacinação. No Brasil há a circulação de BVDV-1, BVDV-2 e HoBiPeV no rebanho bovino (FLORES et al., 2018), por isso, a grande variabilidade genética entre esses vírus, e uma baixa reatividade sorológica cruzada, confere um obstáculo para a formulação vacinal e efetividade da resposta sorológica (BIANCHI et al., 2011).

De forma preocupante, seis das nove vacinas comerciais testadas não induziram atividade neutralizante detectável para o BVDV-1. Além disso, sete vacinas não induziram anticorpos neutralizantes contra o BVDV-2. Apenas as vacinas C e F produziram títulos moderados a altos contra as espécies de pestivírus testadas. Com isso, observa-se que a maioria das vacinas comerciais testadas não produz resposta sorológica eficiente contra o BVDV-1 e BVDV-2, conforme observado anteriormente por Anzillero e colaboradores (2015). Apesar da falta de soroconversão detectável ao BVDV pela maioria das vacinas comerciais, é possível que a primovacinação tenha produzido células de memória e que, após reestimulação antigênica, níveis detectáveis de anticorpos sejam observados. Para responder tal, questão, seria necessário revacinar esses animais com um intervalo maior (180 dias, por exemplo) e investigar a magnitude da resposta anamnésica.

Em resumo, a vacina com maior produção de anticorpos neutralizantes protetivos contra o BoHV-1 foi a vacina F, seguida pelas vacinas E e H, respectivamente. Quanto ao BVDV, a vacina C foi melhor, seguida pelas vacinas F e E, respectivamente. Esses resultados apontam a necessidade de revisão na composição da maioria das vacinas comerciais brasileiras. Uma das alternativas para potencializar o efeito dos antígenos contidos nas

formulações vacinais é a utilização de adjuvantes (BASTOLA et al., 2017). A busca por novas formulações é constante e nos últimos anos vários adjuvantes combinados são utilizados (GARG et al., 2017).

O hidróxido de alumínio foi um dos primeiros adjuvantes utilizados em vacinas (BURAKOVA et al., 2018) e a maioria das vacinas comerciais testadas no presente estudo (A, B, D, E, G e I) utilizam esse adjuvante. O hidróxido de alumínio tem um ótimo perfil de segurança, no entanto induz uma produção de anticorpos fraca à moderada contra o antígeno associado (GUPTA, 1998). Isto se explica, pois há uma forte ligação entre o antígeno e o adjuvante contendo hidróxido de alumínio, que reduz a quantidade de antígeno eluído, resultando em uma fraca produção de anticorpos (HANSEN et al., 2007). Contudo, um estudo realizado por LI et al. (2014) avaliou a atividade desse adjuvante contendo nano ou micropartículas de hidróxido de alumínio. A produção de anticorpos induzida por antígenos adjuvados com nanopartículas de hidróxido de alumínio foi maior e mais duradoura que a resposta induzida a antígenos adjuvados com micropartículas. Sugere-se que as nanopartículas de hidróxido de alumínio facilitam a captação do antígeno pelas células APCs (LI et al., 2014). Dentre as vacinas comerciais testadas, não foi possível identificar qual composição ou partículas de hidróxido de alumínio foi utilizada, mas é possível identificar quais vacinas contém adjuvantes combinados.

A fim de avaliar a eficácia de diferentes adjuvantes para formulações vacinais futuras, testaram-se seis adjuvantes. Dentre eles, o Emulsigen – DL90 (DDA) induziu títulos neutralizantes homogêneos dentro do grupo vacinal, e também em níveis protetivos (≥ 16) contra o BoHV-1. Os demais grupos vacinais apresentaram títulos neutralizantes detectáveis, porém os anticorpos protetivos foram observados com frequência abaixo de 50%,

O Emulsigen em combinação com DDA, principal agente imunoestimulador, induz uma resposta de Th1 e Th2, sendo frequentemente utilizado em vacinas de subunidade (VAN DONKERSGOED et al., 1996; VAN ROOIJ et al., 2002; LI et al., 2006; ORESKOVIC et al., 2019). Esse adjuvante induz uma forte resposta inflamatória, com secreção de diferentes citocinas e quimiocinas, ativando a resposta imune, recrutando neutrófilos no local da administração, e causando uma rápida maturação e ativação de células dendríticas (ORESKOVIC et al., 2019). A combinação entre Emulsigen e DDA, induz grande reação inflamatória no local da aplicação, por causa do DDA. Devido a isso, alguns estudos buscam alternativas para reduzir reações secundárias, sendo sugerido, por exemplo, o uso de CpG ODN em combinação com Emulsigen para reduzir a reação inflamatória local após a

vacinação (IOANNOU et al., 2002). Essa combinação de adjuvantes já foi testada contra o vírus da hepatite C (LI et al., 2006) e BVDV (LIANG et al., 2006), por exemplo. Além disso, o Emulsigen tem sido testado e utilizado em vacinas contra *Toxoplasma gondii* (HISZCZYNSKA-SAWICKA et al., 2010), BoHV-1 (IOANNOU et al., 2002), vírus da Raiva (KAUR et al., 2010), BoHV-5 (DUMMER et al., 2014), dentre outros.

A ausência de resposta neutralizante contra BVDV nos animais imunizados com as vacinas experimentais pode estar relacionada a problemas na inativação do vírus, resultando em alterações na conformação de epítomos de glicoproteínas alvo de anticorpos neutralizantes (BOLIN, 1993; NIEDERHAUSER et al., 2008), assim como verificado em estudos avaliando a glicoproteína G5 do vírus da raiva (NIEDERHAUSER et al., 2008). Por isso, alguns estudos sugerem que o método de avaliação de anticorpos neutralizantes no soro de animais vacinados com suspensões inativadas não seja um indicador consistente de proteção contra todos os tipos de infecções virais (NIEDERHAUSER et al., 2008; MACEDO et al., 2013). Porém, ressalta-se que a proteção induzida por vacinas inativadas baseia-se, preponderantemente, na capacidade de estimular a produção de anticorpos neutralizantes, que são importantes para a neutralização viral. Nesses casos, pode-se inferir que, vacinas inativadas que não induzem anticorpos neutralizantes em níveis detectáveis provavelmente não são protetoras.

O tratamento químico ou físico, usado para inativação viral, pode destruir epítomos neutralizantes do vírus, por meio de degradação das proteínas, durante a inativação, resultando em uma fraca resposta de anticorpos neutralizantes e conseqüentemente baixa proteção (DELRUE et al., 2012; BURRELL et al., 2017). Embora existam estudos que comprovem que o BEI, na concentração 1mM é um inativador adequado de suspensão viral contendo BVDV (REFAIE et al., 2004), não pode-se descartar a possível influência desse agente inativador, na baixa soroconversão. Além disso, acredita-se que o mesmo processo de inativação e a massa antigênica possa ser inadequado para antígenos virais diferentes.

CONCLUSÃO

Nas condições do presente estudo, a maioria das vacinas comerciais demonstrou uma produção de anticorpos neutralizantes insatisfatória contra os vírus testados. Apenas uma vacina se destacou por induzir títulos neutralizantes satisfatórios contra o BoHV e as espécies de pestivírus bovino testadas. Além disso, o Emulsigen – DL90 (DDA) se mostrou mais eficaz para indução de anticorpos neutralizantes contra o BoHV-1. Diante disso, sugere-se que esse adjuvante possa ser incluído em formulações vacinais, otimizando-se parâmetros

como concentração de adjuvante, inativação viral e composição da vacina (proporção adjuvante:antígeno), em protocolo de emulsificação.

Agradecimentos.- Os autores são gratos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro, e pela bolsa de estudos de Evelyn K. Dotto (processo. 131310/2018-6). Eduardo F. Flores (processo 301414/2010-6) e Rudi Weiblen (processo 305867/2018-0) são bolsistas de produtividade em pesquisa do CNPq. Este estudo foi financiado em parte pela 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., et al. Serological response to bovine herpesvirus 1 and 5 and bovine viral diarrhea virus induced by commercial vaccines/Resposta sorológica aos herpesvirus bovino tipos 1 e 5 e vírus da diarreia viral bovina induzida por vacinas comerciais. **Cienc. Rural**, v.45, n.1, p.58-64. 2015.

ANZILIERO D., Santos C.M., Brum M.C., Weiblen R., Chowdhury S.I., Flores E.F., 2011. A recombinant bovine herpesvirus 5 defective in thymidine kinase and glycoprotein E is immunogenic for calves and confers protection upon homologous challenge and BoHV-1 challenge. **Vet Microbiol.** 154 (1-2): 14-22.

ASLAM B., HUSSAIN I., MAHMOOD M.S., KHAN A., 2013. Preparation and evaluation of Montanide ISA 206 adjuvanted bacterin of *Borrelia anserina* in laying chickens. **J. Appl. Poult. Res.** 22 (2): 196-203.

BAKER J.C., 1995. The clinical manifestations of bovine viral diarrhea infection. **Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.** 11 (3), 425-445.

BASTOLA R., NOH G., KEUM T., BASHYAL S., SEO J.E., CHOI J., OH Y., CHO Y., LEE S., 2017. Vaccine adjuvants: smart components to boost the immune system. **Arch. Pharm. Res.** 40 (11): 1238-1248.

BAUERMAN F.V., FLORES E.F., RIDPATH J.F., 2012. Antigenic relationships between Bovine viral diarrhea virus 1 and 2 and HoBi virus: possible impacts on diagnosis and control. **J. Vet. Diagn. Invest.** 24 (2): 253-261.

BAYRY J., PRABHUDAS K., GOPALAKRISHNA S., PATIL P.K., RAMAKRISHNA C., MISRA L.D., SURYANARAYANA V.V., 1999. Protective immune response to 16kDa

immunoreactive recombinant protein encoding the C-terminal VP1 portion of foot and mouth disease virus type Asia 1. **Microbiol. Immunol.** 43.(8): 765-771.

BIANCHI E., MARTINS M., WEIBLEN R., FLORES E.F., 2011. Genotypic and antigenic profile of bovine viral diarrhoea virus isolates from Rio Grande do Sul, Brazil (2000-2010). **Pesq. Vet. Bras.** 31 (8): 649-655.

BOLIN S.R., 1993. Immunogens of bovine viral diarrhoea virus. **Vet Microbiol.** 37 (3-4): 263-271.

BRASIL 2019a. Agropecuária brasileira em números (MAPA) (Brasília).

BRASIL 2019b. Lista de produtos registrados, lista cronológica de análise de registro inicial e atos da CPV. Produtos Veterinários, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (Brasília).

BURRELL C.J., HOWARD C.R., MURPHY F.A. 2017. Vaccines and Vaccination, p.155–167. In: Fenner and White's Medical Virology. 5th ed. Elsevier. United States.

CHASE C., 2007. Immunology review/refresher with emphasis on vaccinology. **Proceedings 40th Am. Assoc. Bov. Pract.** Vancouver, p.4-9.

COFFMAN R.L., SHER A., SEDER R.A., 2010. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunity* 33 (4): 492-503.

DAR P., KALAIIVANAN R., SIED N., MAMO B., KISHORE S., SURYANARAYANA V., KONDABATTULA G., 2013. Montanide ISATM 201 adjuvanted FMD vaccine induces improved immune responses and protection in cattle. **Vaccine** 31 (33): 3327-3332.

DEL MEDICO ZAJAC M.P., LADELFA M.F., KOTSIAS F., MUYLKENS B., THIRY J., THIRY E., ROMERA S.A., 2010. Biology of bovine herpesvirus 5. **Vet. J.** 184 (2): 138-145.

DELRUE I., VERZELE D., MADDER A., NAUWYNCK H.J., 2012. Inactivated virus vaccines from chemistry to prophylaxis: merits, risks and challenges. **Expert Rev. Vaccines.** 11 (6): 695-719.

DUMMER L.A., ARAUJO I.L., FINGER P.F., DOS SANTOS A.G., JR. DA ROSA M.C., CONCEICAO F.R., FISCHER G., VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK S., LEITE F.P., 2014. Immune responses of mice against recombinant bovine herpesvirus 5 glycoprotein D. **Vaccine** 32 (21): 2413-2419.

ENGELS M., ACKERMANN M., 1996. Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. **Vet. Microbiol.** 53 (1-2): 3-15.

FLORES E.F., CARGNELUTTI J.F., MONTEIRO F.L., BAUERMAN F.V., RIDPATH J.F., WEIBLEN R., 2018. A genetic profile of bovine pestiviruses circulating in Brazil (1998-2018). **Anim. Health Res. Rev.** 19 (2): 134-141.

FLORES E.F., DONIS R.O., 1995. Isolation of a mutant MDBK cell line resistant to bovine viral diarrhea virus infection due to a block in viral entry. **Virology** 208 (2): 565-575.

FLORES E.F., WEIBLEN R., VOGEL F.S.F., ROEHE P.M., ALFIERI A.A., PITUCO E.M., 2005. Bovine viral diarrhea virus (BVDV) infection in Brazil: history, current situation and perspectives. **Pesqui. Vet. Bras.** 25 (3): 125-134.

FULTON R.W., BURGE L.J., 2000. Bovine viral diarrhea virus types 1 and 2 antibody response in calves receiving modified live virus or inactivated vaccines. **Vaccine** 19 (2-3): 264-274.

GARG R., BABIUK L., VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK S., GERDTS V., 2017. A novel combination adjuvant platform for human and animal vaccines. **Vaccine** 35 (35): 4486-4489.

GUPTA R.K., 1998. Aluminum compounds as vaccine adjuvants. **Adv. Drug Deliv. Rev.** 32 (3): 155-172.

HANSEN B., SOKOLOVSKA A., HOGENESCH H., HEM S.L., 2007. Relationship between the strength of antigen adsorption to an aluminum-containing adjuvant and the immune response. **Vaccine** 25 (36): 6618-6624.

HISZCZYNSKA-SAWICKA E., LI H., XU J.B., OLEDZKA G., KUR J., BICKERSTAFFE R., STANKIEWICZ M., 2010. Comparison of immune response in sheep immunized with DNA vaccine encoding *Toxoplasma gondii* GRA7 antigen in different adjuvant formulations. **Exp Parasitol.** 124 (4): 365-372.

ICTV 2019. International Committee on Taxonomy of Viruses.

IOANNOU X.P., GRIEBEL P., HECKER R., BABIUK L.A., VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK S., 2002. The immunogenicity and protective efficacy of bovine herpesvirus 1 glycoprotein D plus Emulsigen are increased by formulation with CpG oligodeoxynucleotides. **J. Virol.** 76(18): 9002-9010.

JONES C., CHOWDHURY S., 2007. A review of the biology of bovine herpesvirus type 1 (BHV-1), its role as a cofactor in the bovine respiratory disease complex and development of improved vaccines. **Anim. Health Res. Rev.** 8 (2): 187-205.

JORGE S., DELLAGOSTIN O.A., 2017. The development of veterinary vaccines: a review of traditional methods and modern biotechnology approaches. **Biotechnology Research and Innovation** 1 (1): 6-13.

- KAUR M., SAXENA A., RAI A., BHATNAGAR R., 2010. Rabies DNA vaccine encoding lysosome-targeted glycoprotein supplemented with Emulsigen-D confers complete protection in preexposure and postexposure studies in BALB/c mice. **FASEB J.** 24 (1): 173-183.
- KORSHOLM K.S., ANDERSEN P.L., CHRISTENSEN D., 2012. Cationic liposomal vaccine adjuvants in animal challenge models: overview and current clinical status. **Expert Rev Vaccines.** 11 (5): 561-577.
- KOVACS-NOLAN J., MAPLETOFT J.W., LAWMAN Z., BABIUK L.A., VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK S., 2009. Formulation of bovine respiratory syncytial virus fusion protein with CpG oligodeoxynucleotide, cationic host defence peptide and polyphosphazene enhances humoral and cellular responses and induces a protective type 1 immune response in mice. **J. Gen. Virol.** 90 (8): 1892-1905.
- LEE S., NGUYEN M.T., 2015. Recent advances of vaccine adjuvants for infectious diseases. **Immune Netw.** 15 (2): 51-57.
- LI X., ALDAYEL A.M., CUI Z., 2014. Aluminum hydroxide nanoparticles show a stronger vaccine adjuvant activity than traditional aluminum hydroxide microparticles. **J. Control. Release.** 173: 148-157.
- LI Y.P., KANG H.N., BABIUK L.A., LIU Q., 2006. Elicitation of strong immune responses by a DNA vaccine expressing a secreted form of hepatitis C virus envelope protein E2 in murine and porcine animal models. **World J. Gastroenterol.** 12 (44): 7126-7135.
- LIANG R., VAN DEN HURK J.V., BABIUK L.A., VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK S., 2006. Priming with DNA encoding E2 and boosting with E2 protein formulated with CpG oligodeoxynucleotides induces strong immune responses and protection from Bovine viral diarrhoea virus in cattle. **J. Gen. Virol.** 87 (10): 2971-2982.
- MACEDO L.B., LOBATO Z.I.P., FIALHO S.L., VIOTT A.M., GUEDES R.M.C., SILVA-CUNHA A., 2013. Evaluation of different adjuvants formulations for bluetongue vaccine. **Braz. Arch. Biol. Technol.** 56 (6): 932-941.
- MCVEY S., SHI J., 2010. Vaccines in veterinary medicine: a brief review of history and technology. **Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.** 40 (3): 381-392.
- MEEUSEN E.N., WALKER J., PETERS A., PASTORET P.P., JUNGENSEN G., 2007. Current status of veterinary vaccines. **Clin. Microbiol. Rev.** 20 (3) 489-510.
- MOREIN F., BENGTSSON K.L., 1998. Functional aspects of iscoms. **Immunol. Cell Biol.** 76 (4): 295-299.
- NEWCOMER B.W., CHAMORRO M.F., WALZ P.H., 2017. Vaccination of cattle against bovine viral diarrhoea virus. **Vet. Microbiol.** 206: 78-83.

- NIEDERHAUSER S., BRUEGGER D., ZAHNO M.L., VOGT H.R., PETERHANS E., ZANONI R., BERTONI G., 2008. A synthetic peptide encompassing the G5 antigenic region of the rabies virus induces high avidity but poorly neutralizing antibody in immunized animals. **Vaccine**. 26 (52): 6749-6753.
- ORESKOVIC Z., NECHVATALOVA K., KREJCI J., KUMMER V., FALDYNA M., 2019. Aspects of intradermal immunization with different adjuvants: The role of dendritic cells and Th1/Th2 response. **PloS One** 14 (2): e0211896 1-18.
- POSPISIL Z., KREJCI J., JINEK P., LANY P., ZENDULKOVA D., CIHAL P., 1996. Development of a disease control programme based on the use of an inactivated vaccine against infectious bovine rhinotracheitis. **Vet. Microbiol.** 53 (1-2): 199-206.
- REFAIE F.M., ESMAT A.Y., MOHAMED A.F., MOHAMED W.A., 2004. The effect of chemical inactivation of bovine viral diarrhea virus with beta-propiolactone and binary ethyleneimine on plasma proteins and coagulation factors. **Egypt. J. Immunol.** 11 (2): 9-20.
- RESENDE F.C.B., PASSOLD J., FERREIRA S.I.A.C., ZANETTI C.R., LIMA H.C., 2003. Adjuvantes de vacinas: possibilidades de uso em seres humanos ou animais. **Rev. Bras. Alerg. Immunopatol.** 27: 116-124.
- RIDPATH J.F., 2013. Immunology of BVDV vaccines. **Biologicals.** 41 (1): 14-19.
- RUIZ-SAENZ J., JAIME J., VERA V., 2009. Vacunas contra el Herpesvirus bovino-1: una mirada desde el pasado hacia el futuro de la inmunización. **Acta Biol. Colomb.** 14 (2): 3-19.
- SHAMS H., 2005. Recent developments in veterinary vaccinology. **Vet. J.** 170 (3): 289-299.
- SNIDER M., GARG R., BROWNLIE R., VAN DEN HURK J.V., VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK S., 2014. The bovine viral diarrhea virus E2 protein formulated with a novel adjuvant induces strong, balanced immune responses and provides protection from viral challenge in cattle. **Vaccine** 32 (50): 6758-6764.
- SPICKLER A.R., ROTH J.A., 2003. Adjuvants in veterinary vaccines: modes of action and adverse effects. **J. Vet. Intern. Med.** 17 (3): 273-281.
- THRUSFIELD M., 1986. Diagnostic testing. p421-456. In: **Veterinary epidemiology**. 4th ed. London, United Kingdom.
- VAN DONKERSGOED J., MCCARTNEY D., VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK S., 1996. Efficacy of an experimental BHV-1 subunit gIV vaccine in beef calves challenged with BHV-1 in aerosol. **Can. J. Vet. Res.** 60 (1): 55-58.
- VAN ROOIJ E.M., GLANSBEEK H.L., HILGERS L.A., TE LINTELO E.G., DE VISSER Y.E., BOERSMA W.J., HAAGMANS B.L., BIANCHI A.T., 2002. Protective antiviral

immune responses to pseudorabies virus induced by DNA vaccination using dimethyldioctadecylammonium bromide as an adjuvant. **J. Virol.** 76 (20) 10540-10545.

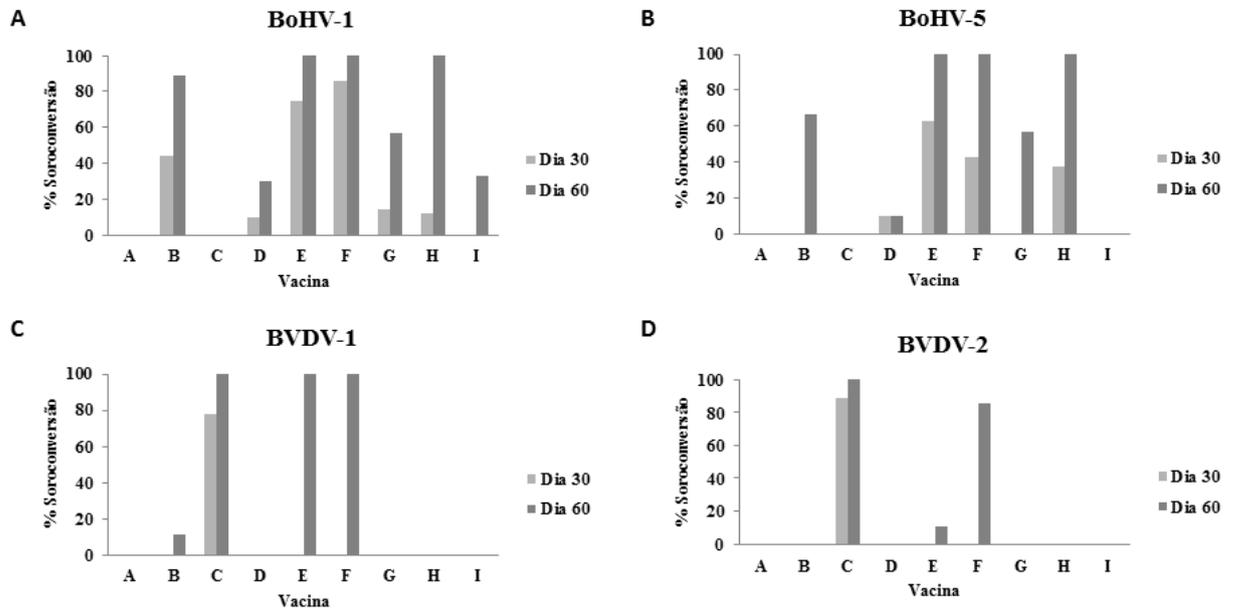
VARELA A.P., HOLZ C.L., CIBULSKI S.P., TEIXEIRA T.F., ANTUNES D.A., FRANCO A.C., ROEHE L.R., OLIVEIRA M.T., CAMPOS F.S., DEZEN D., CENCI A., BRITO W.D., ROEHE P.M., 2010. Neutralizing antibodies to bovine herpesvirus types 1 (BoHV-1) and 5 (BoHV-5) and its subtypes. **Vet. Microbiol.** 142 (3-4): 254-260.

VOGEL F.R., 2000. Improving vaccine performance with adjuvants. **Clin. Infect. Dis.** 30 (Suppl 3): S266-270.

VOGEL F.S.F., FLORES E.F., WEIBLEN R., KUNRATH C.F., 2002. Neutralizing activity to bovine herpesvirus types 1 (BHV-1) and 5 (BHV-5) in sera of cattle immunized with vaccines against BHV-1. **Cienc. Rural** 32 (5): 881-883.

WEISS M., BRUM M.C., ANZILIERO D., WEIBLEN R., FLORES E.F., 2015. A glycoprotein E gene-deleted bovine herpesvirus 1 as a candidate vaccine strain. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 48 (9): 843-851.

Figura 1. Frequência de soroconversão (%) contra herpesvírus e pestivírus bovino em animais imunizados com diferentes vacinas comerciais.



O soro de animais vacinados foi testado pela técnica de VN contra as seguintes cepas: A) BoHV-1(Cooper); B) BoHV-5 (SV507/99); C) BVDV-1 (Singer); D) BVDV-2 (VS-253).

Tabela 1. Vacinas comerciais avaliadas no presente estudo

Vacina	Tipo	Composição	Dose/ via de administração
A	Inativada	BoHV-1, BoHV-5, BVDV-1, BVDV-2, cepas de <i>Leptospira</i> spp., cepas de <i>Campylobacter</i> spp., 10mg selenato de sódio, hidróxido de alumínio 10% e timerosal.	5mL/SC
B	Inativada	BoHV-1, BVDV-1, BVDV-2, cepas de <i>Campylobacter</i> spp., cepas de <i>Leptospira</i> spp., <i>Haemophilus somnus</i> , e hidróxido de alumínio	5mL/SC
C	Viva	BVDV-1 ncp, e BVDV-2 ncp	2mL/IM
D	Inativada	BoHV-1, BoHV-5, BVDV-1, BVDV-2, cepas de <i>Leptospira</i> spp., cepas de <i>Campylobacter</i> spp, selenato de sódio 10 mg/dose e hidróxido de alumínio 10%	5mL/SC/IM
E	Viva / Inativada	Cepas liofilizadas de BoHV-1, PI3, BRSV. Solução líquida contendo BVDV-1, BVDV-2 ncp e cp inativados, cepas de <i>Leptospira</i> spp. e hidróxido de alumínio	5mL/IM
F	Viva / Inativada	Cepas liofilizadas de BoHV-1, PI3, BRSV. Solução líquida contendo BVDV-1, BVDV-2 inativados, cepas de <i>Leptospira</i> spp. e adjuvante ISCOM com Amphigen.	5mL/SC
G	Inativada	BoHV, BVDV, PI3, BRSV, cepas de <i>Leptospira</i> spp., cepas de <i>Campylobacter</i> spp., hidróxido de alumínio , selenato de sódio 4,8 mg/mL e timerosal.	5mL/SC
H	Inativada	BoHV-1, BoHV-5, BVDV-1, BVDV-2, cepas de <i>Leptospira</i> spp e emulsão de óleo mineral	5mL/SC
I	Inativada	BoHV, BVDV, cepas de <i>Leptospira</i> spp., hidróxido de alumínio, selenato de sódio 4,8 mg/mL e timerosal.	5mL/SC

BVDV-1 = vírus da diarreia viral bovina 1; BVDV-2 = vírus da diarreia viral bovina 2; BoHV-1 = alfa herpesvírus bovino 1; BoHV-5 = alfa herpesvírus bovino 5; PI3 = parainfluenza bovina tipo 3; BRSV = vírus respiratório sincicial bovino; ncp = não citopático; cp = citopático.

Tabela 2. Adjuvantes e composição utilizados na formulação das vacinas experimentais

Adjuvante	Tipo	Composição vacinal	Referência	Dose
Emulsigen - DL 90 (DDA)	Adjuvante oleoso (o/a) ¹ com adição de nanopartículas	20% de Emulsigen - DL 90 (DDA) mais 80% de suspensão viral	http://mvpadjuvants.com/wp-content/uploads/2017/10/PH-IB-17018-Adjuvants-Bulletin_Emulsigen-DL90.pdf	2.5mL
Hidróxido de alumínio + saponina	Adjuvante aquoso baseado em hidróxido de alumínio com adição de saponina	20% de hidróxido de alumínio + saponina mais 80% suspensão viral	Formulação Biovet	2.5mL
Montanide ISA 201	Adjuvante oleoso (a/o/a) ²	50 % de Montanide ISA 201 mais 50% de suspensão viral	https://www.seppic.com/montanide-isa-w-o-w	4mL
Montanide ISA 660 VG	Adjuvante oleoso (a/o) ³	60% de Montanide ISA 660 VG mais 40% de suspensão viral	Adjuvante experimental – Biovet	5mL
Oleosa Biovet + saponina	Adjuvante oleoso (a/o) ³ - formulação baseada em óleo mineral com adição de saponina	80% de Oleosa Biovet + saponina mais 20% de suspensão viral	Formulação Biovet	5mL
Polygen (CpG ODN)	Adjuvante aquoso baseado em polímeros	10% de Polygen (CpG) mais 90% de suspensão viral	http://mvpadjuvants.com/wp-content/uploads/2017/10/PH-IB-17018-Adjuvants-Bulletin_Polygen.pdf	2.2mL

¹ O/A = óleo-em-água;² A/O/A = água-em-óleo-em-água;³ A/O = água-em-óleo;

Tabela 3. Resposta sorológica neutralizante 60 dias após a primeira dose vacinal contra BoHV-1 e BoHV-5 em animais imunizados com vacinas comerciais

Vacina	BoHV-1			BoHV-5		
	Reagentes	Títulos (n° animais)	GMT*	Reagentes	Títulos (n° animais)	GMT*
A	0/8	<2(8)	-	0/8	<2(8)	-
B	8/9	<2(1); 2(3); 4 (3); 8 (2)	4	6/9	<2(3); 2(3); 4(2); 8(1)	3
C	0/9	<2 (9)	-	0/9	<2 (9)	-
D	3/10	<2(7); 2(2); 4(1)	3	1/10	<2(9); 4(1)	-
E	8/8	4(1); 8(4); 16(2); 64(1)	11	8/8	4(2); 8(4); 16(2)	8
F	7/7	16(3); 64(2); 128(2)	43	7/7	16(1); 32(3); 64(2); 128(1)	43
G	4/7	<2(3); 4(3); 8(1)	5	4/7	<2(3); 2(2); 4(2)	3
H	8/8	2(3); 4(1); 8(2); 16(1); 32(1)	6	8/8	2(3); 8(2); 16(2); 32(1)	7
I	2/6	<2(4); 2(1); 4(1)	3	0/6	<2)(6)	-

*GMT = título médio geométrico. O GMT foi calculado por grupo vacinal no dia 60 após a primeira dose vacinal.

Tabela 4. Resposta sorológica neutralizante 60 dias após a primeira dose vacinal contra o BVDV-1 e BVDV-2 de animais imunizados com vacinas comerciais

Vacina	BVDV-1			BVDV-2		
	Reagentes	Títulos (n° animais)	GMT*	Reagentes	Títulos (n° animais)	GMT*
A	0/8	<5(8)	-	0/8	<5(8)	-
B	1/9	<5(8); 20(1)	-	0/9	<5(9)	-
C	9/9	10(1); 20(1); 40(2); 80(4); 320(1)	54	9/9	80(3); 160(2); 320(2); 640(2)	202
D	0/10	<5(10)	-	0/10	<5(10)	-
E	8/8	5(1); 10(1); 20(2); 40(3); 80(1)	24	1/8	<5(7); 5(1)	-
F	7/7	10(1); 20(2); 40(1); 80(3)	36	6/7	<5(1); 20(1); 40(1); 80(2); 160(1); 320(1)	80
G	0/7	<5(7)	-	0/7	<5(7)	-
H	0/8	<5(8)	-	0/8	<5(8)	-
I	0/6	<5(6)	-	0/6	<5(6)	-

*GMT = título médio geométrico. O GMT foi calculado por grupo vacinal no dia 60 após a primeira dose vacinal.

Tabela 5. Resposta sorológica neutralizante 60 dias após a primeira dose vacinal utilizando vacinas experimentais com cepas de BoHV-1 e BVDV-1 associadas com diferentes adjuvantes

Adjuvante	BoHV-1			BVDV-1		
	Reagentes	Títulos (n° animais)	GMT	Reagentes	Títulos (n° animais)	GMT
Emulsigen - DL 90 (DDA)	9/9	16(6); 32(3)	20	0/9	<5 (9)	-
Hidróxido de alumínio saponina	7/10	<2(3); 2(4); 4(3)	3	0/10	<5 (10)	-
Montainde 201 ISA	3/10	<2(7); 2(3)	2	0/10	<5 (10)	-
Montanide 660 VG ISA	9/9	2(2); 4(2); 8(2); 16(1); 32(2)	7	0/9	<5 (9)	-
Oleosa Biovet saponina	9/10	<2(1); 2(1); 4(2); 8(3); 32(2); 128(1)	11	0/10	<5 (10)	-
Polygen ODN (CpG)	9/10	<2(1); 4(3); 8(4); 16(2)	7	0/10	<5 (10)	-

4 CONCLUSÃO

Nas condições do presente estudo, foi possível observar que a maioria das vacinas comerciais demonstrou uma produção de anticorpos neutralizantes insatisfatória contra os vírus testados. Apenas uma vacina se destacou por induzir títulos neutralizantes satisfatórios contra o BoHV e as espécies de pestivírus bovino testadas.

O Emulsigen – DL90 (DDA) se mostrou mais eficaz para indução de anticorpos neutralizantes contra BoHV-1. Diante disso, sugere-se que esse adjuvante possa ser incluído em formulações vacinais, otimizando-se parâmetros como concentração de adjuvante, inativação viral e composição da vacina (proporção adjuvante:antígeno), em protocolo de emulsificação.

5 REFERÊNCIAS

- ACKERMANN, M.; M. ENGELS. Pro and contra IBR-eradication. **Vet. Microbiol.**, v.113, n.3-4, p.293-302. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16337098>>. Acesso em: 2 jun. 2019. doi: 10.1016/j.vetmic.2005.11.043.
- AGAPOV, E. V., et al. Uncleaved NS2-3 is required for production of infectious bovine viral diarrhoea virus. **J. Virol.**, v.78, n.5, p.2414-25. 2004. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14963137>>. Acesso em. doi: 10.1128/jvi.78.5.2414-2425.2004.
- AGUIRRE, I. M., et al. Genotypic characterization of Chilean llama (*Lama glama*) and alpaca (*Vicugna pacos*) pestivirus isolates. **Vet. Microbiol.**, v.168, n.2-4, p.312-7. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24388633>>. Acesso em 20 jun. 2019. doi: 10.1016/j.vetmic.2013.11.031.
- ANZILIERO, D., et al. Serological response to bovine herpesvirus 1 and 5 and bovine viral diarrhoea virus induced by commercial vaccines/Resposta sorológica aos herpesvirus bovino tipos 1 e 5 e vírus da diarréia viral bovina induzida por vacinas comerciais. **Cienc. Rural**, v.45, n.1, p.58-64. 2015. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/v45n1/0103-8478-cr-45-01-00058.pdf>>. Acesso em 15 dez. 2019. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20130167>.
- ANZILIERO, D., et al. A recombinant bovine herpesvirus 5 defective in thymidine kinase and glycoprotein E is immunogenic for calves and confers protection upon homologous challenge and BoHV-1 challenge. **Vet. Microbiol.**, v.154, n.1-2, p.14-22. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22019288>>. Acesso em 15 dez. 2019. doi: 10.1016/j.vetmic.2011.03.019.
- ASLAM, B., et al. Preparation and evaluation of Montanide ISA 206 adjuvanted bacterin of *Borrelia anserina* in laying chickens. **J. Appl. Poult. Res.**, v.22, n.2, p.196-203. 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1056617119306944>>. Acesso em: 16 dez 2019. doi: <https://doi.org/10.3382/japr.2012-00571>.
- BACHOFEN, C., et al. Co-existence of genetically and antigenically diverse bovine viral diarrhoea viruses in an endemic situation. **Vet. Microbiol.**, v.131, n.1-2, p.93-102. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18424020>>. Acesso em 16 jul. 2019. doi: 10.1016/j.vetmic.2008.02.023.
- BAKER, J. C. The clinical manifestations of bovine viral diarrhoea infection. **Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.**, v.11, n.3, p.425-45. 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8581856>>. Acesso em 17 jul. 2019. doi: [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30460-6](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30460-6).
- BARANOWSKI, E., et al. Structural and functional analysis of bovine herpesvirus 1 minor glycoproteins. **Vet. Microbiol.**, v.53, n.1-2, p.91-101. 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9011001>>. Acesso em 13 dez. 2019. doi: 10.1016/s0378-1135(96)01237-0.

- BARBOSA, A. C. V. C., et al. Soroprevalência e fatores de risco para a infecção pelo herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1) no Estado de Goiás, Brasil. **Cienc. Rural**, v.35, n.6, p.1368-1373. 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-84782005000600022&script=sci_abstract&tlng=pt>. Acesso em 14 dez. 2019. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782005000600022>.
- BASTOLA, R., et al. Vaccine adjuvants: smart components to boost the immune system. **Arch. Pharm. Res.**, v.40, n.11, p.1238-1248. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29027637>>. Acesso em 2 dez. 2019. doi: 10.1007/s12272-017-0969-z.
- BAUERMAN, F. V., et al. Antigenic relationships between Bovine viral diarrhea virus 1 and 2 and HoBi virus: possible impacts on diagnosis and control. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v.24, n.2, p.253-61. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22379042>>. Acesso em 20 jul. 2019. doi: 10.1177/1040638711435144.
- BAYRY, J., et al. Protective immune response to 16kDa immunoreactive recombinant protein encoding the C-terminal VP1 portion of foot and mouth disease virus type Asia 1. **Microbiol. Immunol.**, v.43, n.8, p.765-771. 1999. Disponível em: <https://www.jstage.jst.go.jp/article/mandi1977/43/8/43_8_765/pdf/-char/ja>. Acesso em: 12 dez. 2019. doi: 10.1111/j.1348-0421.1999.tb02468.x.
- BECHER, P., et al. Phylogenetic analysis of pestiviruses from domestic and wild ruminants. **J. Gen. Virol.**, v.78 (Pt 6), p.1357-66. 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9191930>>. Acesso em 14 jul. 2019. doi: 10.1099/0022-1317-78-6-1357.
- BECHER, P.; N. TAUTZ. RNA recombination in pestiviruses: cellular RNA sequences in viral genomes highlight the role of host factors for viral persistence and lethal disease. **RNA Biol.**, v.8, n.2, p.216-24. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21358277>>. Acesso em 20 out. 2019. doi: 10.4161/rna.8.2.14514.
- BIANCHI, E., et al. Genotypic and antigenic profile of bovine viral diarrhea virus isolates from Rio Grande do Sul, Brazil (2000-2010). **Pesqui. Vet. Bras.**, v.31, n.8, p.649-655. 2011. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/pvb/v31n8/a03v31n8.pdf>>. Acesso em: 04 dez. 2019. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2011000800003>
- BISWAS, S., et al. Bovine herpesvirus-1 (BHV-1) - a re-emerging concern in livestock: a revisit to its biology, epidemiology, diagnosis, and prophylaxis. **Vet. Q.**, v.33, n.2, p.68-81. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23802762>>. Acesso em 20 dez. 2019. doi: 10.1080/01652176.2013.799301.
- BOLIN, S. R. Immunogens of bovine viral diarrhea virus. **Vet. Microbiol.**, v.37, n.3-4, p.263-71. 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7509538>>. Acesso em 20 jul. 2019. doi: 10.1016/0378-1135(93)90028-6.
- BRASIL. Agropecuária brasileira em números (MAPA). Brasília 2019a.

BRASIL. Lista de produtos registrados, lista cronológica de análise de registro inicial e atos da CPV. Produtos Veterinários, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Brasília 2019b.

BROWNLIE, J., et al. Experimental production of fatal mucosal disease in cattle. **Vet. Rec.**, v.114, n.22, p.535-6. 1984. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6087539>>. Acesso em 15 set. 2019. doi: 10.1136/vr.114.22.535.

BURAKOVA, Y., et al. Adjuvants for Animal Vaccines. **Viral Immunol.**, v.31, n.1, p.11-22. 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28618246>>. Acesso em 13 dez. 2019. doi: 10.1089/vim.2017.0049.

BURRELL, C. J., et al. Vaccines and Vaccination. In: (Ed.). **Fenner and White's Medical Virology**: Elsevier, v.5, 2017. Vaccines and Vaccination, p.155–167.

CARRILLO, B. J., et al. Meningoencephalitis caused by IBR virus in calves in Argentina. **Zentralbl. Veterinarmed. B.**, v.30, n.5, p.327-32. 1983. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6310913>>. Acesso em 16 dez. 2019. doi: 10.1111/j.1439-0450.1983.tb01852.x.

CHASE, C. Immunology review/refresher with emphasis on vaccinology. **Am. Assoc. Bov. Pract.**, v.40, p.4-9. 2007. Disponível em: <<http://www.dairyweb.ca/Resources/AABP2007/Chase.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2019.

CIACCI-ZANELLA, J., et al. The latency-related gene of bovine herpesvirus 1 inhibits programmed cell death. **J. Virol.**, v.73, n.12, p.9734-40. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10559283>>. Acesso em 19 dez. 2019.

CLAUS, M. P., et al. Herpesvírus bovino tipo 5 e meningoencefalite herpética bovina. **Semina: Ciências Agrárias**, v.23, n.1, p.131-141. 2002. Disponível em: <<file:///C:/Users/usuario/Downloads/2086-6786-1-PB.pdf>>. Acesso em 19 dez. 2019.

COFFMAN, R. L., et al. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. **Immunity**, v.33, n.4, p.492-503. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21029960>>. Acesso em 3 jan. 2020. doi: 10.1016/j.immuni.2010.10.002.

COLITTI, B., et al. Complete Genome Sequence of Bovine Viral Diarrhea Virus Subgenotype 2a Strain CN10.2015.821, Isolated in Piedmont, Italy. **Genome Announc.**, v.6, n.11. 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29545302>>. Acesso em 6 out. 2019. doi: 10.1128/genomeA.00170-18.

CRUMP, C. M., et al. Alphaherpesvirus glycoprotein M causes the relocalization of plasma membrane proteins. **J. Gen. Virol.**, v.85, n.Pt 12, p.3517-27. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15557225>>. Acesso em 28 dez. 2019. doi: 10.1099/vir.0.80361-0.

DAR, P., et al. Montanide ISA™ 201 adjuvanted FMD vaccine induces improved immune responses and protection in cattle. **Vaccine**, v.31, n.33, p.3327-3332. 2013. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X13006932?via%3Dihub>>. Acesso em: 13 dez 2019. doi: 10.1016/j.vaccine.2013.05.078.

DEL MEDICO ZAJAC, M. P., et al. Biology of bovine herpesvirus 5. **Vet. J.**, v.184, n.2, p.138-45. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19409823>>. Acesso em 26 nov. 2019. doi: 10.1016/j.tvjl.2009.03.035.

DELHON, G., et al. Genome of bovine herpesvirus 5. **J. Virol.**, v.77, n.19, p.10339-47. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12970418>>. Acesso em 26 nov. 2019. doi: 10.1128/jvi.77.19.10339-10347.2003.

DELRUE, I., et al. Inactivated virus vaccines from chemistry to prophylaxis: merits, risks and challenges. **Expert. Rev. Vaccines**, v.11, n.6, p.695-719. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22873127>>. Acesso em 6 jan. 2020. doi: 10.1586/erv.12.38.

DEREGT, D. Infectious bovine rhinotracheitis and bovine viral diarrhoea: repercussions for animal health and international trade. **Animal Diseases Research Institute (OIE Reference Laboratory for Infectious Bovine Rhinotracheitis)**. Canada: 137-146 p. 1998. Disponível em: <<https://www.oie.int/doc/ged/D5645.PDF>>. Acesso em 6 dez. 2019.

DIAS, R. K., et al. Antigenic diversity of Brazilian isolates of HoBi-like pestiviruses. **Vet. Microbiol.**, v.203, p.221-228. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28619148>>. Acesso em 19 jul. 2019. doi: 10.1016/j.vetmic.2017.03.021.

DONIS, R. O. Molecular biology of bovine viral diarrhoea virus and its interactions with the host. **Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.**, v.11, n.3, p.393-423. 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8581855>>. Acesso em 17 jul. 2019. doi: 10.1016/s0749-0720(15)30459-x.

DONOFRIO, G., et al. Recombinant bovine herpesvirus 4 (BoHV-4) expressing glycoprotein D of BoHV-1 is immunogenic and elicits serum-neutralizing antibodies against BoHV-1 in a rabbit model. **Clin. Vaccine Immunol.**, v.13, n.11, p.1246-54. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16928886>>. Acesso em 10 dez. 2019. doi: 10.1128/CVI.00200-06.

DUMMER, L. A., et al. Immune responses of mice against recombinant bovine herpesvirus 5 glycoprotein D. **Vaccine**, v.32, n.21, p.2413-9. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24657716>>. Acesso em 10 dez. 2019. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.03.011.

ENGELS, M.; M. ACKERMANN. Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. **Vet. Microbiol.**, v.53, n.1-2, p.3-15. 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9010994>>. Acesso em 24 nov. 2019. doi: 10.1016/s0378-1135(96)01230-8.

FLORES, E. F., et al. A genetic profile of bovine pestiviruses circulating in Brazil (1998-2018). **Anim. Health Res. Rev.**, v.19, n.2, p.134-141. 2018. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30683172>>. Acesso em 8 dez. 2019. doi: 10.1017/S1466252318000130.

FLORES, E. F.; R. O. DONIS. Isolation of a mutant MDBK cell line resistant to bovine viral diarrhea virus infection due to a block in viral entry. **Virology**, v.208, n.2, p.565-75. 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7747428>>. Acesso em 19 jul. 2019. doi: 10.1006/viro.1995.1187.

FLORES, E. F., et al. Phylogenetic analysis of Brazilian bovine viral diarrhea virus type 2 (BVDV-2) isolates: evidence for a subgenotype within BVDV-2. **Virus Res.**, v.87, n.1, p.51-60. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12135789>>. Acesso em 19 jul. 2019. doi: 10.1016/s0168-1702(02)00080-1.

FLORES, E. F., et al. Bovine viral diarrhea virus (BVDV) infection in Brazil: history, current situation and perspectives. **Pesqui. Vet. Bras.**, v.25, n.3, p.125-134. 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2005000300002&lng=pt&tlng=pt>. Acesso em 19 jul. 2019. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2005000300002>.

FREITAS, E. J. P., et al. Frequência de anticorpos contra o herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) em bovinos de corte não vacinados. **Semina: Ciências Agrárias**, v.35, n.3, p.1301-1310. 2014. Disponível em: <<http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/14129/14533>>. Acesso em 5 jan. 2020. doi: <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2014v35n3p1301>.

FRENCH, E. L. Relationship between infectious bovine rhinotracheitis (IBR) virus and a virus isolated from calves with encephalitis. **Aust. Vet. J.**, v.38, n.11, p.555-556. 1962a. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1751-0813.1962.tb04029.x>>. Acesso em: 16 dez. 2019. doi: 10.1111/j.1751-0813.1962.tb04029.x.

FRENCH, E. L. A specific virus encephalitis in calves: isolation and characterization of the causal agent. **Aust. Vet. J.**, v.38, n.4, p.216-221. 1962b. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1751-0813.1962.tb16043.x>>. Acesso em: 15 dez. 2019. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1962.tb16043.x>.

FULTON, R. W.; L. J. BURGE. Bovine viral diarrhea virus types 1 and 2 antibody response in calves receiving modified live virus or inactivated vaccines. **Vaccine**, v.19, n.2-3, p.264-74. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10930681>>. Acesso em 3 ago. 2019. doi: 10.1016/s0264-410x(00)00168-7.

FULTON, R. W., et al. Evaluation of diagnostic tests used for detection of bovine viral diarrhea virus and prevalence of subtypes 1a, 1b, and 2a in persistently infected cattle entering a feedlot. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.228, n.4, p.578-84. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16478438>>. Acesso em 16 dez. 2019. doi: 10.2460/javma.228.4.578.

GABEV, E., et al. Glycoprotein D of bovine herpesvirus 5 (BoHV-5) confers an extended host range to BoHV-1 but does not contribute to invasion of the brain. **J. Virol.**, v.84, n.11,

p.5583-93. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20219909>>. Acesso em 16 dez. 2019. doi: 10.1128/JVI.00228-10.

GARG, R., et al. A novel combination adjuvant platform for human and animal vaccines. **Vaccine**, v.35, n.35 Pt A, p.4486-4489. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28599794>>. Acesso em 7 jan. 2019. doi: 10.1016/j.vaccine.2017.05.067.

GEISER, V., et al. The latency-related gene of bovine herpesvirus-1 can inhibit the ability of bICP0 to activate productive infection. **J. Gen. Virol.**, v.83, n.Pt 12, p.2965-71. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12466472>>. Acesso em 28 nov. 2019. doi: 10.1099/0022-1317-83-12-2965.

GERDTS, V., et al. Pseudorabies virus expressing bovine herpesvirus 1 glycoprotein B exhibits altered neurotropism and increased neurovirulence. **J. Virol.**, v.74, n.2, p.817-27. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10623744>>. Acesso em 29 nov. 2019. doi: 10.1128/jvi.74.2.817-827.2000.

GOENS, S. D. The evolution of bovine viral diarrhea: a review. **Can. Vet. J.**, v.43, n.12, p.946-54. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12561689>>. Acesso em 19 jul. 2019.

GONG, X., et al. Molecular investigation of bovine viral diarrhea virus infection in yaks (*Bos grunniens*) from Qinghai, China. **Virol. J.**, v.11, p.29. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24524442>>. Acesso em 19 jul. 2019. doi: 10.1186/1743-422X-11-29.

GU, B., et al. The RNA helicase and nucleotide triphosphatase activities of the bovine viral diarrhea virus NS3 protein are essential for viral replication. **J Virol**, v.74, n.4, p.1794-800. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10644352>>. Acesso em 18 jul. 2019. doi 10.1128/jvi.74.4.1794-1800.2000.

GUPTA, R. K. Aluminum compounds as vaccine adjuvants. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v.32, n.3, p.155-172. 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10837642>>. Acesso em 4 jan. 2020. doi: 10.1016/s0169-409x(98)00008-8.

HANSEN, B., et al. Relationship between the strength of antigen adsorption to an aluminum-containing adjuvant and the immune response. **Vaccine**, v.25, n.36, p.6618-24. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17681647>>. Acesso em 4 jan. 2020. doi: 10.1016/j.vaccine.2007.06.049.

HILTON, L., et al. The NPro product of bovine viral diarrhea virus inhibits DNA binding by interferon regulatory factor 3 and targets it for proteasomal degradation. **J. Virol.**, v.80, n.23, p.11723-32. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16971436>>. Acesso em 10 jul. 2019. doi: 10.1128/JVI.01145-06.

HISZCZYNSKA-SAWICKA, E., et al. Comparison of immune response in sheep immunized with DNA vaccine encoding *Toxoplasma gondii* GRA7 antigen in different adjuvant formulations. **Exp. Parasitol.**, v.124, n.4, p.365-72. 2010. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19962376>>. Acesso em 15 nov. 2019. doi: 10.1016/j.exppara.2009.11.015.

HOUE, H., et al. Test strategies in bovine viral diarrhoea virus control and eradication campaigns in Europe. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v.18, n.5, p.427-36. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17037609>>. Acesso em 19 nov. 2019. doi: 10.1177/104063870601800501.

HOWARD, C. J. Immunological responses to bovine virus diarrhoea virus infections. **Ver. Sci. Tech.**, v.9, n.1, p.95-103. 1990. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1966728>>. Acesso em 16 jul. 2019. doi 10.20506/rst.9.1.488.

ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. 2019. Disponível em: <<https://talk.ictvonline.org/>>. Acesso em: 28 dez. 2019.

IOANNOU, X. P., et al. The immunogenicity and protective efficacy of bovine herpesvirus 1 glycoprotein D plus Emulsigen are increased by formulation with CpG oligodeoxynucleotides. **J. Virol.**, v.76, n.18, p.9002-10. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12186884>>. Acesso em 19 dez. 2019. doi: 10.1128/jvi.76.18.9002-9010.2002.

JONES, C.; S. CHOWDHURY. A review of the biology of bovine herpesvirus type 1 (BHV-1), its role as a cofactor in the bovine respiratory disease complex and development of improved vaccines. **Anim. Health Res. Rev.**, v.8, n.2, p.187-205. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18218160>>. Acesso em 10 dez. 2019. doi: 10.1017/S146625230700134X.

JONES, C., et al. Analysis of the transcriptional promoter which regulates the latency-related transcript of bovine herpesvirus 1. **J. Virol.**, v.64, n.3, p.1164-70. 1990. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2154601>>. Acesso em 20 dez. 2019.

JORGE, S.; O. A. DELLAGOSTIN. The development of veterinary vaccines: a review of traditional methods and modern biotechnology approaches. **Biotechnology Research and Innovation**, v.1, n.1, p.6-13. 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2452072117300667>>. Acesso em: 15 jan 2020. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biori.2017.10.001>.

KALAYCIOGLU, A. T. Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) diversity and vaccination. A review. **Vet. Q.**, v.29, n.2, p.60-7. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17663212>>. Acesso em 15 jan. 2020. doi: 10.1080/01652176.2007.9695228.

KALTHOFF, D., et al. The UL49 gene product of BoHV-1: a major factor in efficient cell-to-cell spread. **J. Gen. Virol.**, v.89, n.Pt 9, p.2269-74. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18753236>>. Acesso em 3 jan. 2020. doi: 10.1099/vir.0.2008/000208-0.

KAUR, G.; M. CHANDRA. Herpesvirus in Bovines: Importance of Bovine Herpesvirus Type 1. **Herpesviridae**, p.219. 2016. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/books/herpesviridae/herpesvirus-in-bovines-importance-of-bovine-herpesvirus-type-1>>. Acesso em 14 jan. 2020. doi: 10.5772/63157.

KAUR, M., et al. Rabies DNA vaccine encoding lysosome-targeted glycoprotein supplemented with Emulsigen-D confers complete protection in preexposure and postexposure studies in BALB/c mice. **FASEB J.**, v.24, n.1, p.173-83. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19741168>>. Acesso em 21 dez. 2019. doi: 10.1096/fj.09-138644.

KHATTAR, S. K., et al. Identification and characterization of a bovine herpesvirus-1 (BHV-1) glycoprotein gL which is required for proper antigenicity, processing, and transport of BHV-1 glycoprotein gH. **Virology**, v.219, n.1, p.66-76. 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8623555>>. Acesso em 21 dez. 2019. doi: 10.1006/viro.1996.0223.

KHODAKARAM-TAFTI, A.; G. H. FARJANIKISH. Persistent bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection in cattle herds. **Iran J. Vet. Res.**, v.18, n.3, p.154-163. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29163643>>. Acesso em 12 out. 2019.

KIM, S. G., et al. Genotyping and phylogenetic analysis of bovine viral diarrhoea virus isolates from BVDV infected alpacas in North America. **Vet. Microbiol.**, v.136, n.3-4, p.209-16. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19059738>>. Acesso em 18 out. 2019. doi: 10.1016/j.vetmic.2008.10.029.

KORSCHOLM, K. S., et al. Cationic liposomal vaccine adjuvants in animal challenge models: overview and current clinical status. **Expert. Rev. Vaccines**, v.11, n.5, p.561-77. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22827242>>. Acesso em 20 dez. 2019. doi: 10.1586/erv.12.22.

KOVACS-NOLAN, J., et al. Formulation of bovine respiratory syncytial virus fusion protein with CpG oligodeoxynucleotide, cationic host defence peptide and polyphosphazene enhances humoral and cellular responses and induces a protective type 1 immune response in mice. **J. Gen. Virol.**, v.90, n.Pt 8, p.1892-905. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19386785>>. Acesso em 20 dez. 2019. doi: 10.1099/vir.0.011684-0.

LACKNER, T., et al. Temporal modulation of an autoprotease is crucial for replication and pathogenicity of an RNA virus. **J. Virol.**, v.78, n.19, p.10765-75. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15367643>>. Acesso em 19 jul. 2019. doi: 10.1128/JVI.78.19.10765-10775.2004.

LACKNER, T., et al. Dissection of a viral autoprotease elucidates a function of a cellular chaperone in proteolysis. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v.103, n.5, p.1510-5. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16432213>>. Acesso em 19 jul. 2019. doi: 10.1073/pnas.0508247103.

LANYON, S. R., et al. Bovine viral diarrhoea: pathogenesis and diagnosis. **Vet. J.**, v.199, n.2, p.201-9. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24053990>>. Acesso em 19 jul. 2019. doi: 10.1016/j.tvjl.2013.07.024.

LEE, S.; M. T. NGUYEN. Recent advances of vaccine adjuvants for infectious diseases. **Immune Netw.**, v.15, n.2, p.51-7. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25922593>>. Acesso em 16 dez. 2019. doi: 10.4110/in.2015.15.2.51.

LEROUX-ROELS, G. Unmet needs in modern vaccinology: adjuvants to improve the immune response. **Vaccine**, v.28 Suppl 3, p.C25-36. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20713254>>. Acesso em 18 dez. 2019. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.07.021.

LI, X., et al. Aluminum hydroxide nanoparticles show a stronger vaccine adjuvant activity than traditional aluminum hydroxide microparticles. **J. Control Release**, v.173, p.148-57. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24188959>>. Acesso em 18 dez. 2019. doi: 10.1016/j.jconrel.2013.10.032.

LI, Y., et al. Glycoprotein Bb, the N-terminal subunit of bovine herpesvirus 1 gB, can bind to heparan sulfate on the surfaces of Madin-Darby bovine kidney cells. **J. Virol.**, v.70, n.3, p.2032-7. 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8627732>>. Acesso em 20 nov. 2019.

LI, Y., et al. Characterization of cell-binding properties of bovine herpesvirus 1 glycoproteins B, C, and D: identification of a dual cell-binding function of gB. **J. Virol.**, v.69, n.8, p.4758-68. 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7609042>>. Acesso em 20 nov. 2019.

LI, Y. P., et al. Elicitation of strong immune responses by a DNA vaccine expressing a secreted form of hepatitis C virus envelope protein E2 in murine and porcine animal models. **World J. Gastroenterol.**, v.12, n.44, p.7126-35. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17131474>>. Acesso em 8 dez. 2019. doi: 10.3748/wjg.v12.i44.7126.

LIANG, R., et al. Priming with DNA encoding E2 and boosting with E2 protein formulated with CpG oligodeoxynucleotides induces strong immune responses and protection from Bovine viral diarrhoea virus in cattle. **J. Gen. Virol.**, v.87, n.Pt 10, p.2971-82. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16963756>>. Acesso em 19 dez. 2019. doi: 10.1099/vir.0.81737-0.

LIU, L., et al. Phylogeny, classification and evolutionary insights into pestiviruses. **Virology**, v.385, n.2, p.351-7. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19167739>>. Acesso em 25 ago. 2019. doi: 10.1016/j.virol.2008.12.004.

LUZZAGO, C., et al. Extended genetic diversity of bovine viral diarrhoea virus and frequency of genotypes and subtypes in cattle in Italy between 1995 and 2013. **Biomed. Res. Int.**, v.2014, p.147145. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25045658>>. Acesso em 19 ago. 2019. doi: 10.1155/2014/147145.

- MACEDO, L. B., et al. Evaluation of different adjuvants formulations for bluetongue vaccine. **Braz. Arch. Biol. Techn.**, v.56, n.6, p.932-941. 2013. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1516-89132013000600007&script=sci_arttext>. Acesso em 29 dez. 2019. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132013005000002>
- MCVEY, S.; J. SHI. Vaccines in veterinary medicine: a brief review of history and technology. **Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.**, v.40, n.3, p.381-92. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20471523>>. Acesso em 29 dez. 2019. doi: 10.1016/j.cvsm.2010.02.001.
- MEEUSEN, E. N., et al. Current status of veterinary vaccines. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.20, n.3, p.489-510, table of contents. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17630337>>. Acesso em 18 dez. 2019. doi: 10.1128/CMR.00005-07.
- MEYER, G., et al. Identification and characterization of bovine herpesvirus type 5 glycoprotein H gene and gene products. **J. Gen. Virol.**, v.80 (Pt 11), p.2849-59. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10580046>>. Acesso em 6 dez. 2019. doi: 10.1099/0022-1317-80-11-2849.
- MILLER, J. M., et al. Determination of ability of a thymidine kinase-negative deletion mutant of bovine herpesvirus-1 to cause abortion in cattle. **Am. J. Vet. Res.**, v.52, n.7, p.1038-43. 1991a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1654031>>. Acesso em 07 dez. 2019.
- MILLER, J. M., et al. Abortifacient property of bovine herpesvirus type 1 isolates that represent three subtypes determined by restriction endonuclease analysis of viral DNA. **Am. J. Vet. Res.**, v.52, n.3, p.458-61. 1991b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1852144>>. Acesso em 07 dez. 2019.
- MOREIN, F.; K. L. BENGTTSSON. Functional aspects of iscoms. **Immunol. Cell Biol.**, v.76, n.4, p.295-9. 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9723770>>. Acesso em 5 jan. 2020. doi: 10.1046/j.1440-1711.1998.00756.x.
- MUYLKENS, B., et al. Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. **Vet. Res.**, v.38, n.2, p.181-209. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17257569>>. Acesso em 29 nov. 2019. doi: 10.1051/vetres:2006059.
- NAKAMICHI, K., et al. Bovine herpesvirus 1 glycoprotein G is necessary for maintaining cell-to-cell junctional adherence among infected cells. **Virology**, v.294, n.1, p.22-30. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11886262>>. Acesso em 18 dez. 2019. doi: 10.1006/viro.2001.1264.
- NANDI, S., et al. Bovine herpes virus infections in cattle. **Anim. Health Res. Rev.**, v.10, n.1, p.85-98. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19558751>>. Acesso em 29 nov. 2019. doi: 10.1017/S1466252309990028.

NEWCOMER, B. W., et al. Vaccination of cattle against bovine viral diarrhea virus. **Vet. Microbiol.**, v.206, p.78-83. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28400145>>. Acesso em 18 nov. 2019. doi: 10.1016/j.vetmic.2017.04.003.

NIEDERHAUSER, S., et al. A synthetic peptide encompassing the G5 antigenic region of the rabies virus induces high avidity but poorly neutralizing antibody in immunized animals. **Vaccine**, v.26, n.52, p.6749-53. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18955098>>. Acesso em 14 dez. 2019. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.10.020.

OLAFSON, P., et al. An apparently new transmissible disease of cattle. **Cornell Vet.**, v.36, p.205-13. 1946. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20995890>>. Acesso em 13 jul. 2019.

OLIVEIRA, M. T., et al. Detection of bovine herpesvirus 1 and 5 in semen from Brazilian bulls. **Theriogenology**, v.75, n.6, p.1139-45. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21247624>>. Acesso em 17 dez. 2019. doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.11.025.

ORESKOVIC, Z., et al. Aspects of intradermal immunization with different adjuvants: The role of dendritic cells and Th1/Th2 response. **PLoS One**, v.14, n.2, p.e0211896. 2019. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30742635>>. Acesso em 28 dez. 2019. doi: 10.1371/journal.pone.0211896.

OWEN, N. V., et al. Bovine Fetal Lesions Experimentally Produced by Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus. **Am. J. Vet. Res.**, v.25, p.1617-26. 1964. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14227160>>. Acesso em 13 jul. 2019.

PASQUALOTTO, W., et al. Incidência de Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR), Diarreia Viral Bovina (BVD) e Leptospirose em Bovinos Leiteiros da Região Oeste de Santa Catarina-Brasil. **R. A. M. A.**, v.8, n.2, p.249-270. 2015. Disponível em: <<https://periodicos.unicesumar.edu.br/index.php/rama/article/view/3034/2595>>. Acesso em 1 dez. 2019. doi: <https://doi.org/10.17765/2176-9168.2015v8n2p249-270>.

PEDRERA, M., et al. Quantification and determination of spread mechanisms of bovine viral diarrhoea virus in blood and tissues from colostrum-deprived calves during an experimental acute infection induced by a non-cytopathic genotype 1 strain. **Transbound Emerg. Dis.**, v.59, n.5, p.377-84. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22151958>>. Acesso em 27 nov. 2019. doi: 10.1111/j.1865-1682.2011.01281.x.

PEREZ, S. E., et al. [Retrospective analysis of cases with a diagnosis of cerebrocortical necrosis and its relation with type 5 bovine herpesvirus]. **Rev. Argent. Microbiol.**, v.35, n.2, p.69-73. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12920986>>. Acesso em 16 dez. 2019.

PETROVSKY, N.; J. C. AGUILAR. Vaccine adjuvants: current state and future trends. **Immunol. Cell Biol.**, v.82, n.5, p.488-96. 2004. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15479434>>. Acesso em 10 jan. 2020. doi: 10.1111/j.0818-9641.2004.01272.x.

PINIOR, B., et al. A systematic review of financial and economic assessments of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) prevention and mitigation activities worldwide. **Prev. Vet. Med.**, v.137, n.Pt A, p.77-92. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28040270>>. Acesso em 20 jun 2019. doi: 10.1016/j.prevetmed.2016.12.014.

PIOVESAN, M., et al. Anticorpos contra o herpesvírus bovino tipo 1, vírus da diarréia viral bovina e vírus da leucose enzoótica bovina na região da campanha do estado do Rio Grande do Sul. **Science and Animal Health**, v.1, n.1, p.38-49. 2013. Disponível em: <<https://periodicos.ufpel.edu.br/ojs2/index.php/veterinaria/article/view/2609/2448>>. Acesso em 29 dez. 2019. doi: <http://dx.doi.org/10.15210/sah.v1i1.2609>.

POSPISIL, Z., et al. Development of a disease control programme based on the use of an inactivated vaccine against infectious bovine rhinotracheitis. **Vet. Microbiol.**, v.53, n.1-2, p.199-206. 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9011012>>. Acesso em 8 jan. 2020. doi: 10.1016/s0378-1135(96)01248-5.

RAAPERI, K., et al. Epidemiology and control of bovine herpesvirus 1 infection in Europe. **Vet. J.**, v.201, n.3, p.249-56. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24954868>>. Acesso em 7 jan. 2020. doi: 10.1016/j.tvjl.2014.05.040.

REBORDOSA, X., et al. Glycoprotein E of bovine herpesvirus type 1 is involved in virus transmission by direct cell-to-cell spread. **Virus Res.**, v.45, n.1, p.59-68. 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8896241>>. Acesso em 7 jan. 2020. doi: 10.1016/0168-1702(96)01353-6.

REFAIE, F. M., et al. The effect of chemical inactivation of bovine viral diarrhoea virus with beta-propiolactone and binary ethyleneimine on plasma proteins and coagulation factors. **Egypt J. Immunol.**, v.11, n.2, p.9-20. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16734113>>. Acesso em 9 jan. 2020.

REICHEL, M. P., et al. Perspectives on Current Challenges and Opportunities for Bovine Viral Diarrhoea Virus Eradication in Australia and New Zealand. **Pathogens**, v.7, n.1. 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29361748>>. Acesso em 16 jul. 2019. doi: 10.3390/pathogens7010014.

RESENDE, F. C. B., et al. Adjuvantes de vacinas: possibilidades de uso em seres humanos ou animais. **Rev. Bras. Alergia Immunopatol.**, v.27, n.3, p.116-124. 2003. Disponível em: <[file:///C:/Users/usuario/Downloads/Adjuvantes de vacinas possibilidades de uso em ser.pdf](file:///C:/Users/usuario/Downloads/Adjuvantes%20de%20vacinas%20possibilidades%20de%20uso%20em%20ser.pdf)>. Acesso em: 4 dez 2019.

RICHTER, V., et al. A systematic worldwide review of the direct monetary losses in cattle due to bovine viral diarrhoea virus infection. **Vet. J.**, v.220, p.80-87. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28190502>>. Acesso em 14 jul. 2019. doi: 10.1016/j.tvjl.2017.01.005.

RIDPATH, J. The contribution of infections with bovine viral diarrhoea viruses to bovine respiratory disease. **Vet. Clin. North Am. Food. Anim. Pract.**, v.26, n.2, p.335-48. 2010a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20619188>>. Acesso em 20 nov. 2019. doi: 10.1016/j.cvfa.2010.04.003.

RIDPATH, J. F. Bovine viral diarrhoea virus: global status. **Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.**, v.26, n.1, p.105-21, table of contents. 2010b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20117546>>. Acesso em 20 nov. 2019. doi: 10.1016/j.cvfa.2009.10.007.

RIDPATH, J. F. Immunology of BVDV vaccines. **Biologicals**, v.41, n.1, p.14-9. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22883306>>. Acesso em 13 dez. 2019. doi: 10.1016/j.biologicals.2012.07.003.

RISSI, D. R., et al. Neurological disease in cattle in southern Brazil associated with Bovine herpesvirus infection. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v.20, n.3, p.346-9. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18460624>>. Acesso em 12 dez. 2019. doi: 10.1177/104063870802000315.

RISSI, D. R., et al. Meningoencefalite por herpesvírus bovino-5. **Pesqui. Vet. Bras.**, v.27, n.7, p.251-260. 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2007000700001>. Acesso em: 17 dez 2019. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2007000700001>

ROBINSON, K. E., et al. The essential and non-essential genes of Bovine herpesvirus 1. **J Gen. Virol.**, v.89, n.Pt 11, p.2851-63. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18931083>>. Acesso em 17 dez. 2019. doi: 10.1099/vir.0.2008/002501-0.

ROCK, D. L. The molecular basis of latent infections by alphaherpesviruses. **Semin. Virol.**, Elsevier, 1993. p.157-165. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1044577383710115>> Acesso em 17 dez. 2019. doi: <https://doi.org/10.1006/smvy.1993.1011>.

ROIZMANN, B., et al. The family Herpesviridae: an update. The Herpesvirus Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. **Arch. Virol.**, v.123, n.3-4, p.425-49. 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1562239>>. Acesso em 18 dez. 2019. doi: 10.1007/bf01317276.

RUIZ-SAENZ, J., et al. Vacunas contra el Herpesvirus bovino-1: una mirada desde el pasado hacia el futuro de la inmunización. **Acta Biolo. Colomb.**, v.14, n.2, p.3-19. 2009. Disponível em: <<https://www.redalyc.org/pdf/3190/319027883001.pdf>>. Acesso em: 16 dez 2019.

SANTOS, M. R., et al. Antibodies against Bovine herpesvirus 1 in dairy herds in the state of Espírito Santo, Brasil. **Rev. Ceres**, v.61, n.2, p.280-283. 2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-737X2014000200017>. Acesso em 17 dez. 2019. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-737X2014000200017>.

SCHANG, L. M., et al. The latency-related gene of bovine herpesvirus 1 encodes a product which inhibits cell cycle progression. **J. Virol.**, v.70, n.6, p.3807-14. 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8648716>>. Acesso em 17 dez. 2019.

SCHUDEL, A. A., et al. Infections of calves with antigenic variants of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) and neurological disease. **Zentralbl. Veterinarmed. B.**, v.33, n.4, p.303-10. 1986. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2428188>>. Acesso em 16 dez. 2019. doi: 10.1111/j.1439-0450.1986.tb00036.x.

SCHYNTS, F., et al. The structures of bovine herpesvirus 1 virion and concatemeric DNA: implications for cleavage and packaging of herpesvirus genomes. **Virology**, v.314, n.1, p.326-35. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14517085>>. Acesso em 16 dez. 2019. doi: 10.1016/s0042-6822(03)00437-9.

SEAGO, J., et al. The Npro product of classical swine fever virus and bovine viral diarrhoea virus uses a conserved mechanism to target interferon regulatory factor-3. **J. Gen. Virol.**, v.88, n.Pt 11, p.3002-6. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17947522>>. Acesso em 17 dez. 2019. doi: 10.1099/vir.0.82934-0.

SHAMS, H. Recent developments in veterinary vaccinology. **Vet. J.**, v.170, n.3, p.289-99. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16266843>>. Acesso em 19 dez. 2019. doi: 10.1016/j.tvjl.2004.07.004.

SILVA, M. S., et al. Identification and differentiation of herpesvirus types 1 and 5 isolated from clinical samples in central-southern Brazil, Argentina and Uruguay (1987-2006). **Pesqui. Vet. Bras.**, v.27, n.10, p.403-408. 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-736X2007001000003&script=sci_arttext&tlng=es>. Acesso em 13 dez. 2019. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2007001000003>

SILVEIRA, S., et al. Genetic Diversity of Brazilian Bovine Pestiviruses Detected Between 1995 and 2014. **Transbound Emerg. Dis.**, v.64, n.2, p.613-623. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26415862>>. Acesso em 20 nov. 2019. doi: 10.1111/tbed.12427.

SMITH, D. B., et al. Proposed revision to the taxonomy of the genus Pestivirus, family Flaviviridae. **J. Gen. Virol.**, v.98, n.8, p.2106-2112. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28786787>>. Acesso em 13 out. 2019. doi: 10.1099/jgv.0.000873.

SMITH, K. C. Herpesviral abortion in domestic animals. **Vet. J.**, v.153, n.3, p.253-68. 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9232116>>. Acesso em 13 out. 2019. doi: 10.1016/s1090-0233(97)80061-5.

SNIDER, M., et al. The bovine viral diarrhoea virus E2 protein formulated with a novel adjuvant induces strong, balanced immune responses and provides protection from viral challenge in cattle. **Vaccine**, v.32, n.50, p.6758-64. 2014. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25454860>>. Acesso em 14 out. 2019. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.10.010.

SPICKLER, A. R.; J. A. ROTH. Adjuvants in veterinary vaccines: modes of action and adverse effects. **J.Vet. Intern. Med.**, v.17, n.3, p.273-81. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12774966>>. Acesso em 13 dez. 2019. doi: 10.1111/j.1939-1676.2003.tb02448.x.

SPIILKI, F. R., et al. Comparative pathogenicity of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) subtypes 1 (BHV-1.1) and 2a (BHV-1.2 a). **Pesqui. Vet. Bras.**, v.24, n.1, p.43-49. 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2004000100010>. Acesso em 12 dez. 2019. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2004000100010>

TAUTZ, N., et al. The Molecular Biology of Pestiviruses. **Adv. Virus Res.**, v.93, p.47-160. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26111586>>. Acesso em 20 jul. 2019. doi: 10.1016/bs.aivir.2015.03.002.

THIRY, J., et al. Ruminant alphaherpesviruses related to bovine herpesvirus 1. **Vet. Res.**, v.37, n.2, p.169-90. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16472518>>. Acesso em 1 dez. 2019. doi: 10.1051/vetres:2005052.

THRUSFIELD, M. Serological epidemiology. In: (Ed.). **Veterinary epidemiology**. . London, United Kingdom, v.4, 1986. Serological epidemiology, p.421-456.

VAN DONKERSGOED, J., et al. Efficacy of an experimental BHV-1 subunit gIV vaccine in beef calves challenged with BHV-1 in aerosol. **Can. J. Vet. Res.**, v.60, n.1, p.55-8. 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8825995>>. Acesso em 29 out. 2019.

VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S. Rationale and perspectives on the success of vaccination against bovine herpesvirus-1. **Vet. Microbiol.**, v.113, n.3-4, p.275-82. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16330163>>. Acesso em 26 out. 2019. doi: 10.1016/j.vetmic.2005.11.002.

VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S., et al. Bovine herpesvirus-1 vaccines. **Immunol. Cell Biol.**, v.71 (Pt 5), p.405-20. 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8270270>>. Acesso em 3 jan. 2020. doi: 10.1038/icb.1993.47.

VAN OIRSCHOT, J. T., et al. Advances in the development and evaluation of bovine herpesvirus 1 vaccines. **Vet. Microbiol.**, v.53, n.1-2, p.43-54. 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9010997>>. Acesso em 3 jan. 2020. doi: 10.1016/s0378-1135(96)01233-3.

VAN ROOIJ, E. M., et al. Protective antiviral immune responses to pseudorabies virus induced by DNA vaccination using dimethyldioctadecylammonium bromide as an adjuvant. **J. Virol.**, v.76, n.20, p.10540-5. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12239334>>. Acesso em 3 jan. 2020. doi: 10.1128/jvi.76.20.10540-10545.2002.

- VARELA, A. P., et al. Neutralizing antibodies to bovine herpesvirus types 1 (BoHV-1) and 5 (BoHV-5) and its subtypes. **Vet. Microbiol.**, v.142, n.3-4, p.254-60. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19926411>>. Acesso em 12 dez. 2019. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.10.016.
- VOGEL, F. R. Improving vaccine performance with adjuvants. **Clin. Infect. Dis.**, v.30 Suppl 3, p.S266-70. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10875797>>. Acesso em 20 out. 2019. doi: 10.1086/313883.
- VOGEL, F. S. F., et al. Neutralizing activity to bovine herpesvirus types 1 (BHV-1) and 5 (BHV-5) in sera of cattle immunized with vaccines against BHV-1. **Cienc. Rural**, v.32, n.5, p.881-883. 2002. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/v32n5/11881.pdf>>. Acesso em: 04 dez. 2019. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782002000500022>
- WANG, F. I., et al. Structures and Functions of Pestivirus Glycoproteins: Not Simply Surface Matters. **Viruses**, v.7, n.7, p.3506-29. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26131960>>. Acesso em 16 dez. 2019. doi: 10.3390/v7072783.
- WEBER, M. N., et al. Clinical Presentation Resembling Mucosal Disease Associated with 'HoBi'-like Pestivirus in a Field Outbreak. **Transbound Emerg. Dis.**, v.63, n.1, p.92-100. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24735072>>. Acesso em 17 dez. 2019. doi: 10.1111/tbed.12223.
- WEISS, M., et al. A glycoprotein E gene-deleted bovine herpesvirus 1 as a candidate vaccine strain. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.48, n.9, p.843-51. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26200229>>. Acesso em 16 dez. 2019. doi: 10.1590/1414-431X20154243.
- WISKERCHEN, M.; M. S. COLLETT. Pestivirus gene expression: protein p80 of bovine viral diarrhoea virus is a proteinase involved in polyprotein processing. **Virology**, v.184, n.1, p.341-50. 1991. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1651596>>. Acesso em 16 dez. 2019. doi: 10.1016/0042-6822(91)90850-b.
- YATES, W. D. A review of infectious bovine rhinotracheitis, shipping fever pneumonia and viral-bacterial synergism in respiratory disease of cattle. **Can. J. Comp. Med.**, v.46, n.3, p.225-63. 1982. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6290011>>. Acesso em 18 dez. 2019.
- YESILBAG, K., et al. Variability and Global Distribution of Subgenotypes of Bovine Viral Diarrhoea Virus. **Viruses**, v.9, n.6. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28587150>>. Acesso em 20 jul. 2019. doi: 10.3390/v9060128.
- YOSHITAKE, N., et al. Identification and characterization of bovine herpesvirus-1 glycoproteins E and I. **J. Gen. Virol.**, v.78 (Pt 6), p.1399-403. 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9191936>>. Acesso em 16 dez. 2019. doi: 10.1099/0022-1317-78-6-1399.

ANEXO A – Grupos imunizados com nove vacinas comerciais e valores individuais na neutralização viral no D60.

(Continua)

Nº	Brinco	Grupo Vacinal	Dia 60				
			BVDV - 1 (singer)	BVDV- 2 (VS253)	HoBi (357/03)	BoHV-1 (Cooper)	BoHV-5 (507/99)
1	7006	A	<5	<5	<5	<2	<2
2	7014	A	<5	<5	<5	<2	<2
3	7015	A	<5	<5	<5	<2	<2
4	7045	A	<5	<5	<5	<2	<2
5	7050	A	<5	<5	<5	<2	<2
6	7093	A	<5	<5	<5	<2	<2
9	7141	A	<5	<5	<5	<2	<2
10	7150	A	<5	<5	<5	<2	<2
11	7017	B	20	<5	<5	8	8
12	7023	B	<5	<5	<5	<2	<2
13	7070	B	<5	<5	<5	4	2
14	7074	B	<5	<5	<5	2	<2
15	7079	B	<5	<5	<5	2	2
16	7090	B	<5	<5	<5	8	4
17	7106	B	<5	<5	<5	2	<2
18	7130	B	<5	<5	<5	4	4
19	7172	B	<5	<5	<5	4	2
20	7036	C	320	>640	160	<2	<2
21	7040	C	80	80	40	<2	<2
22	7042	C	40	80	40	<2	<2
23	7044	C	10	80	5	<2	<2
24	7076	C	80	160	40	<2	<2
25	7097	C	80	320	40	<2	<2
26	7120	C	40	160	40	<2	<2
27	7127	C	20	320	10	<2	<2
28	7175	C	80	>640	160	<2	<2
29	7033	D	<5	<5	<5	<2	<2
30	7064	D	<5	<5	<5	<2	<2
31	7066	D	<5	<5	<5	<2	<2
32	7075	D	<5	<5	<5	4	4
33	7077	D	<5	<5	<5	<2	<2
34	7084	D	<5	<5	<5	<2	<2
35	7121	D	<5	<5	<5	<2	<2
36	7126	D	<5	<5	<5	<2	<2
37	7134	D	<5	<5	<5	2	<2
38	7166	D	<5	<5	<5	2	<2
39	7028	E	5	<5	<5	4	4

(conclusão)

N°	Brinco	Grupo Vacinal	Dia 60				
			BVDV - 1 (singer)	BVDV- 2 (VS253)	HoBi (357/03)	BoHV-1 (Cooper)	BoHV-5 (507/99)
40	7030	E	80	<5	20	8	4
41	7043	E	40	<5	10	64	16
42	7058	E	40	<5	10	8	8
43	7099	E	40	<5	20	16	16
44	7110	E	10	<5	5	16	8
45	7118	E	20	<5	10	8	8
46	7145	E	20	5	10	8	8
47	7007	F	80	<5	80	16	32
48	7038	F	20	20	10	64	64
49	7051	F	20	40	10	64	32
50	7089	F	10	80	5	16	32
51	7128	F	80	160	160	128	64
52	7164	F	80	320	10	128	128
53	7165	F	40	80	20	16	16
54	7020	G	<5	<5	<5	<2	2
55	7025	G	<5	<5	<5	<2	<2
56	7052	G	<5	<5	<5	4	4
57	7069	G	<5	<5	<5	4	2
58	7095	G	<5	<5	<5	4	<2
59	7156	G	<5	<5	<5	8	4
60	7158	G	<5	<5	<5	<2	<2
61	7031	H	<5	<5	<5	8	16
62	7072	H	<5	<5	<5	2	2
63	7082	H	<5	<5	<5	4	16
64	7086	H	<5	<5	<5	8	8
65	7094	H	<5	<5	<5	2	2
66	7102	H	<5	<5	<5	32	32
67	7133	H	<5	<5	<5	2	2
68	7142	H	<5	<5	<5	16	8
69	7037	I	<5	<5	<5	<2	<2
70	7107	I	<5	<5	<5	<2	<2
71	7112	I	<5	<5	<5	<2	<2
72	7113	I	<5	<5	<5	<2	<2
73	7124	I	<5	<5	<5	4	<2
74	7136	I	<5	<5	<5	2	<2

ANEXO B - Grupos imunizados com seis vacinas experimentais associadas com diferentes adjuvantes e valores individuais da neutralização viral no D60.

(Continua)

Nº	Grupo	Brinco	D60 pós imunização	
			BoHV-1	BVDV-1
1	Emulsigen - DL 90 (DDA)	7108	32	<5
2	Emulsigen - DL 90 (DDA)	7114	16	<5
3	Emulsigen - DL 90 (DDA)	7135	16	<5
4	Emulsigen - DL 90 (DDA)	7138	16	<5
5	Emulsigen - DL 90 (DDA)	7146	16	<5
6	Emulsigen - DL 90 (DDA)	7156	32	<5
7	Emulsigen - DL 90 (DDA)	7160	16	<5
8	Emulsigen - DL 90 (DDA)	7162	16	<5
9	Emulsigen - DL 90 (DDA)	7172	32	<5
10	Hidróxido de alumínio + Saponina	7104	0	<5
11	Hidróxido de alumínio + Saponina	7112	2	<5
12	Hidróxido de alumínio + Saponina	7115	2	<5
13	Hidróxido de alumínio + Saponina	7121	4	<5
14	Hidróxido de alumínio + Saponina	7129	2	<5
15	Hidróxido de alumínio + Saponina	7136	0	<5
16	Hidróxido de alumínio + Saponina	7153	2	<5
17	Hidróxido de alumínio + Saponina	7154	0	<5
18	Hidróxido de alumínio + Saponina	7166	4	<5
19	Hidróxido de alumínio + Saponina	7188	4	<5
20	Montanide ISA 201	7101	0	<5
21	Montanide ISA 201	7116	2	<5
22	Montanide ISA 201	7120	0	<5
23	Montanide ISA 201	7123	0	<5
24	Montanide ISA 201	7127	2	<5
25	Montanide ISA 201	7137	0	<5
26	Montanide ISA 201	7140	0	<5
27	Montanide ISA 201	7150	0	<5
28	Montanide ISA 201	7178	2	<5
29	Montanide ISA 201	7195	0	<5
30	Montanide ISA 660 VG	7133	2	<5
31	Montanide ISA 660 VG	7151	16	<5
32	Montanide ISA 660 VG	7163	4	<5
33	Montanide ISA 660 VG	7164	8	<5
34	Montanide ISA 660 VG	7168	32	<5
35	Montanide ISA 660 VG	7170	4	<5
36	Montanide ISA 660 VG	7174	32	<5
37	Montanide ISA 660 VG	7181	8	<5
38	Montanide ISA 660 VG	7184	2	<5

(Conclusão)

Nº	Grupo	Brinco	D60 pós imunização	
			BoHV-1	BVDV-1
39	Oleosa Biovet + Saponina	7109	4	<5
40	Oleosa Biovet + Saponina	7118	4	<5
41	Oleosa Biovet + Saponina	7134	0	<5
42	Oleosa Biovet + Saponina	7141	32	<5
43	Oleosa Biovet + Saponina	7142	32	<5
44	Oleosa Biovet + Saponina	7144	8	<5
45	Oleosa Biovet + Saponina	7158	128	<5
46	Oleosa Biovet + Saponina	7171	8	<5
47	Oleosa Biovet + Saponina	7185	8	<5
48	Oleosa Biovet + Saponina	7186	2	<5
49	Polygen (CpG)	7107	16	<5
50	Polygen (CpG)	7111	8	<5
51	Polygen (CpG)	7117	4	<5
52	Polygen (CpG)	7122	4	<5
53	Polygen (CpG)	7128	8	<5
54	Polygen (CpG)	7149	0	<5
55	Polygen (CpG)	7152	4	<5
56	Polygen (CpG)	7159	8	<5
57	Polygen (CpG)	7176	8	<5
58	Polygen (CpG)	7177	16	<5