

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

**ATENUAÇÃO E IMUNOGENICIDADE DE UMA CEPA
RECOMBINANTE DO HERPESVÍRUS BOVINO TIPO
5 DEFECTIVA NA GLICOPROTEÍNA *E* E ENZIMA
TIMIDINA QUINASE**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Deniz Anziliero

**Santa Maria, RS, Brasil
2010**

**ATENUAÇÃO E IMUNOGENICIDADE DE UMA CEPA
RECOMBINANTE DO HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 5
DEFECTIVA NA GLICOPROTEÍNA *E* E ENZIMA TIMIDINA
QUINASE**

por

Deniz Anziliero

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

Orientador: Prof. Rudi Weiblen

Santa Maria, RS, Brasil

2010

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

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

**ATENUAÇÃO E IMUNOGENICIDADE DE UMA CEPA RECOMBINANTE DO
HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 5 DEFECTIVA NA GLICOPROTEÍNA E E
ENZIMA TIMIDINA QUINASE**

Elaborada por
Deniz Anziliero

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

Comissão Examinadora

Rudi Weiblen, PhD, UFSM
(Presidente/orientador)

Fernando Rosado Spilki, Dr, FEEVALE

Charles Fernando Capinos Scherer, PhD, HIPRA

Santa Maria, 16 de agosto de 2010

AGRADECIMENTOS

Ao término desta etapa da minha formação acadêmica, é importante que eu agradeça a todos que participaram durante esta trajetória.

Inicialmente, agradeço imensamente aos meus pais Darci e Zelinda e meu irmão Fernando, pelo seu grande esforço em me proporcionar a possibilidade de realizar um curso superior. Agradeço também à Eduarda “Duda” pela compreensão, apoio e incentivo incondicional.

Aos professores que colaboraram com o conhecimento adquirido, e em especial ao meu sempre orientador e grande amigo Luiz Carlos Kreutz pela amizade, paciência, apoio e por despertar-me o interesse pelo fascinante mundo da pesquisa científica.

As pessoas que me oportunizaram grandes ensinamentos em especial aos professores Rudi Weiblen e Eduardo Furtado Flores, inicialmente pela oportunidade, confiança e credibilidade no meu trabalho, pela formação profissional e pessoal que oportunizaram, mas principalmente pela amizade.

Agradeço, também, a todos meus amigos e colegas que sempre estiveram ao meu lado me apoiando e dando força, e pelo companheirismo de sempre. Aos colegas e amigos do Setor de virologia por me receberem bem, pelo auxílio e pela amizade durante esse período.

Finalizando, agradeço a Deus por colocar pessoas maravilhosas em meu caminho, dando-me forças e me passando ensinamentos para que eu pudesse chegar a esta maravilhosa conquista.

RESUMO

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

ATENUAÇÃO E IMUNOGENICIDADE DE UMA CEPA RECOMBINANTE DO HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 5 DEFECTIVA NA GLICOPROTEÍNA E E ENZIMA TIMIDINA QUINASE

AUTOR: DENIZ ANZILIERO
ORIENTADOR: RUDI WEIBLEN
Santa Maria, 16 de agosto de 2010

O presente trabalho descreve a atenuação/virulência e imunogenicidade de uma cepa recombinante do herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) candidata a cepa vacinal. O recombinante BoHV-5gE/TK Δ foi construído a partir da cepa brasileira SV507/99 e contém deleções nos genes da glicoproteína E (gE) – como marcador antigênico - e da enzima timidina quinase (TK), para atenuação. No *capítulo 1*, investigou-se a atenuação e imunogenicidade do recombinante em bezerros. Bezerros com 80 a 90 dias de idade (n=6), inoculados pela via intranasal (IN) com o vírus recombinante (título de $10^{7,5}$ TCID₅₀) não apresentaram sinais clínicos, e excretaram títulos baixos de vírus nas secreções nasais. No dia 30 pós-infecção (pi), todos os animais possuíam anticorpos neutralizantes contra o BoHV-5, em títulos entre 4 e 8, permanecendo soronegativos para a gE. Administração de dexametasona (Dx) a quatro desses bezerros no dia 42 pi (0.1mg/kg/dia durante 5 dias) não resultou em excreção viral ou em aumento dos títulos de anticorpos, indicando ausência de reativação viral. Em um segundo experimento, vacinação intramuscular (IM) de bezerros com 8 meses de idade (n=9) com o recombinante ($10^{7,5}$ TCID₅₀/animal) não resultou em excreção viral ou em manifestações clínicas. Os animais vacinados desenvolveram anticorpos neutralizantes em títulos de 2 a 8 no dia 42 pós-vacinação (PV) e permaneceram negativos para anticorpos anti-gE. Finalmente, 21 bezerros (aproximadamente 10 meses de idade) foram vacinados com o recombinante ($10^{7,3}$ TCID₅₀) pela via IM. Todos os animais vacinados desenvolveram anticorpos neutralizantes em títulos de 2 a 16 no dia 30pv. Revacinação desses animais no dia 240 pv provocou uma resposta anamnésica rápida e intensa, resultando em títulos neutralizantes entre 16 e 256 no dia 14 pós-revacinação. O soro de todos os animais permaneceu negativo para anticorpos contra a gE. Amostras de soro dos animais vacinados apresentaram atividade neutralizante cruzada frente a nove isolados de BoHV-5 e oito de BoHV-1. O *capítulo 2* relata uma investigação sobre a imunogenicidade e proteção conferida

pelo vírus recombinante frente a desafio homólogo (BoHV-5) e heterólogo (BoHV-1). Para isso, nove bezerros soronegativos para o BoHV-5 foram vacinados pela via intramuscular com uma dose de $10^{7,5}$ DICC₅₀ do vírus recombinante e oito animais foram mantidos como controle. Todos os animais vacinados soroconverteram aos 14 dias pós-vacinação (pv), apresentando títulos de anticorpos neutralizantes entre 2 e 4. No dia 42 pós-vacinação (pv), os animais vacinados e os controles foram desafiados pela inoculação intranasal (IN) de isolados de BoHV-5 ou de BoHV-1. Após o desafio, a excreção de vírus pelos animais vacinados foi reduzida em comparação com os não vacinados, nos dois grupos (desafiados com BoHV-1 e BoHV-5). Os animais vacinados também não apresentaram sinais clínicos sistêmicos, respiratórios ou neurológicos pós desafio. Por outro lado, os animais controles inoculados com o BoHV-5 (n=4) desenvolveram doença neurológica severa e foram eutanasiados *in extremis* entre os dias 13 e 14 pós-desafio (pd). O desafio provocou uma resposta anamnésica intensa e rápida nos animais vacinados, induzindo títulos neutralizantes superiores aos animais não vacinados. Anticorpos contra a gE foram detectados apenas após o desafio, tanto nos vacinados quanto nos controles. Esses resultados indicam que o recombinante BoHV-5 gE/TKΔ é um candidato adequado a cepa vacinal com marcador antigênico, pois é atenuado e imunogênico para bezerros, confere proteção homóloga e também contra o BoHV-1.

Palavras-chave: BoHV-5, BoHV-1, doenças de bovinos, vírus recombinante, vacina diferencial.

ABSTRACT

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

ATTENUATION AND IMMUNOGENICITY OF A RECOMBINANT BOVINE HERPESVIRUS 5 DEFECTIVE IN GLYCOPROTEIN E AND THYMIDINE KINASE

AUTHOR: DENIZ ANZILIERO

ADVISER: RUDI WEIBLEN

Santa Maria, August, 16th, 2010.

The present study describes an investigation of the attenuation/virulence and immunogenicity of a recombinant BoHV-5, a candidate vaccine strain. The recombinant BoHV-5gE/TK Δ was constructed out of a Brazilian BoHV-5 strain (SV507/99) and contains deletions in glycoprotein E (gE) gene – as antigenic marker - and thymidine kinase (TK) gene for attenuation. In *Chapter 1*, we investigated the attenuation and immunogenicity of the recombinant in calves. Eighty-to-ninety days old calves (n=6) inoculated intranasally (IN) with the recombinant virus (titer of $10^{7.5}$ TCID₅₀) showed no clinical signs, and shed low titers of virus in nasal secretions. On day 30 post-infection (pi), all animals had neutralizing antibodies against BoHV-5, in titers from 4 to 8 and remained negative for antibodies to gE. Administration of dexamethasone (Dx) to four of these calves at day 42 pi (0.1mg/kg/day during 5 days) did not result in virus shedding or increase in antibody titers, indicating lack of viral reactivation. In a second experiment, intramuscular immunization (IM) of calves with 8 months of age (n=9) with the recombinant virus ($10^{7.5}$ TCID₅₀/animal) did not result in virus shedding or clinical signs. Vaccinated animals developed neutralizing antibodies in titers from 2 to 8 at day 42 post-vaccination (PV) and remained negative for gE antibodies. Finally, 21 calves (approximately 10 months old) were vaccinated IM with the recombinant virus ($10^{7.3}$ TCID₅₀). All vaccinated animals developed neutralizing antibodies in titers from 2 to 16 at day 30pv. A boost vaccination performed on those animals at day 240 pv resulted in a rapid and strong anamnestic antibody response, with VN titers reaching from 16 to 256 at day 14 post-booster. Serum samples of all animals remained negative for gE antibodies. Serum samples from vaccinated animals showed cross-neutralizing activity against nine field isolates of BoHV-5 and eight of BoHV-1. *Chapter 2* describes an investigation of the immunogenicity

and protection conferred by the recombinant virus against homologous (BoHV-5) heterologous challenge (BoHV-1). A group of nine calves seronegative for BoHV-5 were vaccinated IM in a dose of $10^{7.5}$ TCID₅₀ of the recombinant virus and eight animals were maintained as non vaccinated controls. All vaccinated animals seroconverted 14 days post-vaccination (pv), with neutralizing antibody titers from 2 to 4. At day 42 post-vaccination (pv), the vaccinated animals and controls were challenged by IN instillation of BoHV-5 or BoHV-1 isolates. After challenge, the length and magnitude of virus shedding was reduced in vaccinated animals compared to controls in both groups (challenged with BoHV-1 and BoHV-5). The vaccinated animals did not show systemic, respiratory or neurological clinical signs after challenge. Furthermore, the control animals challenged with BoHV-5 (n=4) developed severe neurological disease and were euthanized *in extremis* between days 13 and 14 post-challenge (pd). The challenge resulted in a strong and rapid anamnestic response in vaccinated animals, inducing neutralizing titers higher than in control animals. Antibodies to gE were detected only after challenge in both vaccinated and controls calves. These results indicate that recombinant BoHV-5 gE/TKΔ is an adequate candidate for a vaccine strain, with an antigenic marker, since it is attenuated and immunogenic for calves and provides homologous and heterologous (BoHV-1) protection.

Key words: BoHV-5, BoHV-1, cattle disease, recombinant virus, differential vaccine.

LISTA DE FIGURAS

2. CAPÍTULO 1

- FIGURA 1 (Fig.1) - Mean antibody titers to the homologous virus in sera of calves immunized with the recombinant virus and revaccinated 240 days later (Experiment 3). To calculate the means, VN titers were transformed in geometric mean titers (GMT)..... 40
- FIGURA 2 (Fig.2) - Virus neutralizing (VN) titers to homologous and heterologous viruses in selected sera of calves immunized with the recombinant virus (Experiment 3). Each figure represents the reactivity of serum of one animal. Titers are expressed in \log_2 . Left panel (A, B, C): VN titers to BoHV-5 isolates; right panel (D, E, F): VN titers to BoHV-1 isolates. In black are represented the titers to the homologous virus; in gray are shown the titers to the respective isolates..... 41

3. CAPÍTULO 2

FIGURA 1 (Fig.1) - Excreção viral nas secreções nasais após o desafio. As médias diárias dos títulos virais estão expressas em \log_{10} DICC₅₀/ml (Doses infectantes para 50 % dos cultivos celulares). A) Média da excreção viral nasal dos animais vacinados com o recombinante (Vac/BoHV-5) e grupo controle (Cont/BoHV-5) desafiados com isolados virulentos de BoHV-5. B) Média da excreção viral nos animais do grupo Vac/BoHV-1 e Cont/BoHV1 desafiados com isolados de BoHV-1..... 60

FIGURA 2 (Fig.2) – Títulos de anticorpos neutralizantes contra o herpesvírus bovino tipo 5 e 1 (BoHV-5 e BoHV-1) após a vacinação com o recombinante de herpesvírus tipo 5 com deleções nos genes da glicoproteína e (gE) e enzima timidina quinase (TK) (BoHV-5 gE/TK Δ) e desafio com isolados de BoHV-5 e BoHV-1. Uma seta indica o momento da vacinação (dia 0), duas setas indicam o momento do desafio (dia 42 pv). Os títulos de anticorpos neutralizantes estão expressos em Títulos médios geométricos (GMT)..... 61

LISTA DE TABELAS

2. CAPÍTULO 1

TABELA 1 (Table 1) - Virological and serological findings after intranasal inoculation of 80 to 90-days old calves with the recombinant virus BoHV-5gE/TKΔ (Experiment 1).....	37
TABELA 2 (Table 2) - Virological and serological findings after intramuscular inoculation of 8-months-old calves with the recombinant virus BoHV-5gE/TKΔ (Experiment 2).....	38
TABELA 3 (Table 3) - Serological response developed by calves vaccinated intramuscularly with the recombinant virus BoHV-5gE/TKΔ (Experiment 3).....	39

3. CAPÍTULO 2

TABELA 1 - Achados virológicos e sorológicos durante a fase aguda em bezerros vacinados com o herpesvírus bovino tipo 5 recombinante, com deleções nos genes da glicoproteína E (gE) e enzima timidina quinase (TK) (BoHV-5gE/TKΔ) e posteriormente desafiados com isolados virulentos de herpesvírus bovino tipo 5 e 1 (BoHV-5 e 1).....	59
---	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. CAPÍTULO 1. A RECOMBINANT BOVINE HERPESVIRUS 5 DEFECTIVE IN THYMIDINE KINASE AND GLYCOPROTEIN E IS ATTENUATED AND IMMUNOGENIC FOR CALVES	16
Abstract.....	17
1. Introduction.....	17
2. Materials and Methods.....	20
3. Results.....	23
4. Discussion.....	25
5. References.....	31
3. CAPÍTULO 2. IMUNOGENICIDADE DE UMA CEPA RECOMBINANTE DO HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 5 DEFECTIVA NA GLICOPROTEÍNA E E ENZIMA TIMIDINA QUINASE	42
Resumo.....	43
Abstract.....	44
Introdução.....	45
Material e Métodos.....	47
Resultados.....	48
Discussão.....	50
Referências.....	55
4. CONCLUSÃO	62
5. REFERÊNCIAS	63

1. INTRODUÇÃO

O herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) é um vírus envelopado, com genoma DNA de fita dupla com aproximadamente 138 quilobases (kb), pertencente à família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*, gênero *Varicellovirus* (ROIZMAN et al., 1992). O BoHV-5 é o agente etiológico da meningoencefalite herpética bovina, enfermidade de ocorrência mais frequente em animais jovens e submetidos a situações de estresse (SALVADOR et al., 1998; COLODEL et al., 2002; ELIAS et al., 2004; RISSI, et al., 2006). A doença é caracterizada por apatia profunda, tremores, andar cambaleante e/ou em círculos, bruxismo, protusão de língua, flexionamento do pescoço, opistótono, salivação excessiva, pressionamento da cabeça contra anteparos, ataxia, decúbito, convulsões e morte (RISSI et al., 2007). O agente já 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; SALVADOR et al., 1998; SILVA et al., 2007). O BoHV-5 possui aproximadamente 82% de identidade de aminoácidos com o BoHV-1, agente da rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) (DELHON et al., 2003). Devido a essa similaridade e à extensa reatividade sorológica cruzada, parte dos surtos envolvendo doença neurológica por herpesvírus foram atribuídos ao BoHV-1, o que contribui para a indefinição sobre a real prevalência e distribuição das infecções (DELHON et al., 2003).

A transmissão do BoHV-1 e 5 ocorre preferencialmente por contato direto ou indireto (ENGELS & ACKERMANN, 1996). O vírus penetra pelo trato respiratório superior, onde estabelece uma fase de replicação primária, após a qual, o vírus invade os neurônios sensoriais regionais, onde pode replicar ativamente ou estabelecer latência. A partir daí, a infecção pode progredir para o estabelecimento de infecção latente, sem replicação ou produção de progênie viral; ou o vírus pode invadir o sistema nervoso central (SNC), onde replica e dissemina-se causando meningoencefalite de curso frequentemente fatal (CHOWDHURY et al., 1997; SILVA et al., 1999; DIEL et al., 2005). Estudos realizados em bovinos e em coelhos tem demonstrado que a infecção do córtex pela via olfatória (bulbo olfatório) constitui-se a principal via de acesso do vírus ao SNC. Dessa forma, duas vias parecem ser importantes para a neuroinvasão, uma vez que, o transporte pela via trigeminal permite ao vírus alcançar o gânglio trigêmeo e estabelecer infecção latente (CHOWDHURY et al., 1997; LEE et al., 1999; DIEL et al., 2005).

A vacinação representa a estratégia mais eficaz no controle de infecções causadas por herpesvírus bovino e, tem sido amplamente utilizada no controle e erradicação destas infecções (VAN OIRSCHOT, 1999). Em geral, as vacinas para os herpesvírus podem ser inativadas ou atenuadas, e convencionais ou diferenciais (VAN OIRSCHOT et al., 1996a; VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, 2007). As vacinas convencionais, inativadas ou atenuadas, tem sido amplamente utilizadas no controle e erradicação do BoHV-1 em vários países (VAN OIRSCHOT, 1999; JONES & CHOWDHURY, 2007; VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, 2007). As vacinas inativadas estimulam preferencialmente a resposta humoral, induzem resposta imune em níveis moderados e passageiros e geralmente necessitam reforços para induzir proteção adequada (VAN OIRSCHOT, 1999; JONES & CHOWDHURY, 2007; VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, 2007). Por outro lado, as vacinas atenuadas estimulam tanto a resposta humoral quanto celular, e induzem uma imunidade de maior magnitude e duração (VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, 2007). Uma importante restrição às vacinas convencionais, inativadas ou atenuadas, é a impossibilidade da diferenciação sorológica entre animais vacinados e infectados naturalmente (VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, 2006).

As vacinas diferenciais, inativadas ou atenuadas, 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., 1996b). Há alguns anos, vacinas diferenciais para o BoHV-1 e PRV vem sendo utilizadas em vários países como medida de controle e erradicação destas enfermidades (VAN OIRSCHOT, 1999; ACKERMANN & ENGELS, 2006).

O BoHV-5 possui mais de dez glicoproteínas no envelope, que desempenham importantes funções na biologia do vírus, pela mediação da penetração nas células, fusão, disseminação direta entre células e interação com o sistema imunológico do hospedeiro (SCHWYZER & ACKERMANN, 1996). As glicoproteínas podem ser classificadas em *essenciais*, quando são necessárias para replicação viral produtiva em células de cultivo, e *não-essenciais*, se são dispensáveis para a multiplicação viral *in vitro* (SCHWYZER & ACKERMANN, 1996; METTENLEITER, 2003).

Deleções em alguns genes dos alfa herpesvírus vem sendo realizadas para o estudo da função dos produtos gênicos na replicação viral. Essas deleções tem resultado em atenuação do vírus, tanto nos hospedeiros naturais como em modelos experimentais (METTENLEITER, 2003). Nos herpesvírus bovino, vários genes são candidatos potenciais à deleção para fins de atenuação e de marcação antigênica. Em especial, as glicoproteínas não

essenciais do envelope são candidatas adequadas para essa finalidade. Assim, várias glicoproteínas de envelope dos herpesvírus já foram deletadas e, os vírus resultantes, testados como cepas vacinais (KAASHOEK et al., 1998; VAN OIRSCHOT, 1999). Uma dessas glicoproteínas, a glicoproteína E (gE), desempenha importante papel na neurovirulência e neuroinvasividade do BoHV-5. Deleções na glicoproteína E limitam o transporste viral ao longo dos neurônios, restringindo assim, a infecção viral de neurônios de segunda e terceira ordem, conseqüentemente reduzindo a disseminação do vírus no sistema nervoso central (CHOWDHURY et al., 1999). Utilizando o BoHV-1 e o herpesvírus suíno (vírus da pseudorraiva, PRV) como modelos, a deleção da glicoproteína gE resultou em redução significativa da neurovirulência. No entanto, somente a deleção da gE parece não ser suficiente para a atenuação dos herpesvírus bovinos 1 e 5 (KAASHOEK et al., 1998; CHOWDHURY et al., 2000; AL-MUBARAK et al., 2004; SILVA et al., 2010). Assim, a atenuação completa de cepas dos herpesvírus bovino para uso em vacinas pode requerer deleção/inativação de genes adicionais. Nesse sentido, outros genes não essenciais, como o gene que codifica a enzima timidina quinase (TK) tem sido alvo de deleção com fins de atenuação de herpesvírus bovino e do PRV (CHOWDHURY, 1996; FERRARI et al., 2000; CHEN et al., 2004). A deleção da enzima timidina quinase promove a redução da virulência do herpesvírus, uma vez que, essa enzima está relacionada com a fosforilação de nucleotídeos necessários à síntese de DNA viral em células que não sofrem divisão, como os neurônios (MITAL, FIELD, 1989). Dessa forma, cepas vacinais do BoHV-1 e PRV frequentemente contêm deleção/inativação do gene de uma glicoproteína não essencial (geralmente a gE) como marcador antigênico, além de uma deleção adicional (frequentemente a TK) para conferir atenuação adequada (KAASHOEK et al., 1996).

Várias vacinas nacionais e/ou importadas contendo antígenos inativados do BoHV-1 estão atualmente disponíveis no mercado brasileiro. Contudo, vários laboratórios nacionais iniciaram o desenvolvimento de novas vacinas, tanto pela constante restrição da importação de imunobiológicos, bem como, pela necessidade de se incluir isolados locais de BoHV-1 e 5 nas formulações vacinais. Algumas dessas vacinas hoje disponíveis foram avaliadas quanto a imunogenicidade em bovinos e, foi demonstrado que grande parte não induz níveis satisfatórios de anticorpos neutralizantes contra o BoHV-1 e BoHV-5 (VOGEL et al., 2002; SILVA et al., 2007).

Recentemente foi relatada a construção e caracterização de três cepas recombinantes do BoHV-5 defectivas nos genes da gE, TK e ambos. A caracterização *in vitro* dos três recombinantes (BoHV-5 gE Δ ; BoHV-5 TK Δ ; BoHV-5 gE/TK Δ) demonstrou que as deleções

não alteram a capacidade de replicação em cultivo celular, demonstrando a viabilidade dos recombinantes e, sua possível utilização em formulações vacinais (BRUM, 2009). Esses recombinantes também foram avaliados com relação a sua atenuação em um modelo experimental em coelhos (SILVA et al., 2010). Este trabalho demonstrou que somente a deleção na gE não foi suficiente para a atenuação do BoHV-5, uma vez que, alguns animais inoculados com o BoHV-5 gE Δ desenvolveram doença neurológica grave.

Quando avaliada a imunogenicidade do recombinante BoHV-5gE/TK Δ , numa formulação de uma vacina inativada oleosa, todos os animais soroconverteram após a administração da segunda dose vacinal. A sorologia realizada com as amostras de soro destes animais frente a isolados heterólogos de BoHV-1 demonstrou uma reatividade sorológica similar as obtidas frente a isolados homólogos de BoHV-5. Utilizando-se um kit ELISA anti-BoHV-1 gE foi possível de se avaliar a propriedade de marcador sorológico da vacina, onde todos os animais vacinados permaneceram soronegativos para gE até o fim do experimento (BRUM et al., 2010).

Os resultados obtidos até o momento demonstraram que o recombinante BoHV-5 gE/TK Δ apresentou-se como um candidato potencial para uso em formulações vacinais, uma vez que demonstrou ser atenuado em coelhos e com boa capacidade imunogênica em bezerros.

O presente trabalho descreve dois experimentos realizados com o recombinante BoHV-5 gE/TK Δ em bezerros. No capítulo I estão descritos experimentos realizados para investigar a atenuação/virulência do recombinante BoHV-5 gE/TK Δ em bezerros inoculados pela via intranasal (IN) e intramuscular (IM) e a sua imunogenicidade. Esse trabalho também avaliou a reatividade sorológica dos animais vacinados frente a isolados homólogos e heterólogos de BoHV-5 e BoHV-1, respectivamente. No capítulo II são descritos os resultados do experimento para investigar a capacidade de conferir proteção frente a desafio com isolados de BoHV-1 e BoHV-5.

2. CAPÍTULO 1

A recombinant bovine herpesvírus 5 defective in thymidine kinase and glycoprotein E is attenuated and immunogenic for calves

Deniz Anziliero¹, Cyndia M. B. dos Santos¹, Fernando V. Bauermann¹, Mário C. S. Brum²,
Rudi Weiblen¹ & Eduardo Furtado Flores^{1*}

(Artigo a ser submetido ao periódico *Veterinary Microbiology* – 2010)

¹Setor de Virologia, Departamento de Microbiologia e Parasitologia e Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

² Universidade Federal do Pampa, Campus Uruguaiiana, BR 472, km 592, Caixa Postal 118. Curso de Medicina Veterinária, Hospital Veterinário 97500-970 - Uruguaiiana, RS – Brasil, Telefone: (55) 34134321

*Correspondence to: E.F. Flores, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil, CEP 97105-900. Fone/fax + (55) 55 3220-8034.
E-mail: flores@ccr.ufsm.br

Abstract

We herein report an investigation on the attenuation and immunogenicity of a recombinant bovine herpesvirus 5 (BoHV-5), defective in glycoprotein E (gE) and thymidine kinase (tk) genes (BoHV-5gE/TK Δ) constructed out of a Brazilian strain. First, 80 to 90-days-old seronegative calves (n=6) inoculated intranasally with the recombinant ($10^{7.5}$ TCID₅₀) shed virus in low titers for up to 6 days, and did not develop clinical signs. At day 30 post-infection (pi) all calves had virus-neutralizing (VN) antibodies in titers of 4 to 8 and were negative for anti-gE antibodies. Administration of dexamethasone (0.1mg/kg/day during 5 days) at day 42 pi did not result in virus shedding or increase in VN titers. Secondly, a group of 8 months-old calves (n=9) vaccinated intramuscularly (IM) with the recombinant virus ($10^{7.5}$ TCID₅₀) did not shed virus in nasal secretions, remained healthy and developed VN titers from 2 to 8 post-vaccination (pv). Lastly, 21 calves maintained under field conditions vaccinated IM with the recombinant virus ($10^{7.3}$ TCID₅₀) developed VN titers from 2 to 16 at day 30 pv. A boost vaccination performed at day 240 pv resulted in a rapid and strong anamnestic antibody response (titers from 16 to 256). Selected serum samples from vaccinated animals showed a broad VN activity against nine BoHV-5 and eight BoHV-1 field isolates. These results show that the recombinant virus is attenuated and immunogenic for calves, and induces an antibody response differentiable from that induced by natural infection. Thus, the recombinant BoHV-5gE/TK Δ is an adequate candidate strain for a modified live vaccine.

Keywords:-bovine herpesvirus 5, recombinant, differential vaccine.

1.Introduction

Bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) is the agent of meningoencephalitis in cattle and is closely related to bovine herpesvirus 1 (BoHV-1), a virus associated with respiratory (infectious bovine rhinotracheitis, IBR), reproductive disease (vulvovaginitis/balanopostitis

IPV/IBP) and abortions in cattle (Studdert, 1990; Kahrs, 2001). BoHV-1 and BoHV-5 are enveloped, double stranded DNA viruses, belonging to the subfamily *Alphaherpesvirinae*, genus *Varicellovirus* (Roizman, 1992). Following primary infection, these viruses establish lifelong latency in neurons of the trigeminal ganglia (TG) or central nervous system (CNS) (Rock, 1994; Vogel et al., 2003). Latently infected animals are the main reservoirs of infection in nature, from which the virus can be periodically reactivated and transmitted to susceptible animals (Rock, 1994; Engels & Ackermann, 1996).

Bovine herpesviruses 1 and 5 share a high antigenic similarity and display an extensive serological cross-reactivity. As a consequence, these viruses can not be distinguished by routine serological/immunodiagnostic tests (Bratanich et al., 1991; Vogel et al., 2002; Holtz et al., 2009). These agents are widespread among South American cattle and are associated with important losses to the livestock industry. BoHV-5 infection seems to be particularly prevalent in Argentina and Brazil where numerous outbreaks are reported every year (Carrillo et al., 1983; Salvador et al., 1998; Colodel et al., 2002; Rissi et al., 2007).

Vaccination represents an efficient strategy to control bovine herpesvirus infections in the field (Ackermann & Engels, 2006; Van Drunen-Littel van den Hurk, 2006). The main goal of vaccination is to prevent or reduce the severity of clinical disease and reduce/prevent virus shedding and transmission (Ackermann & Engels, 2006; Van Drunen-Littel van den Hurk, 2006). Several BoHV-1 vaccines are commercially available in South America, most of them based on conventional inactivated viruses and, at least one, containing a temperature-sensitive, modified live virus (MLV) (Flores, E.F. unpublished). Few vaccines contain BoHV-5 antigens in their formulations, none of them based on live virus. Nonetheless, the antigenic similarity and serological cross-reactivity between BoHV-1 and -5 have led to the concept that vaccines containing either virus could be of value to control infection by the homologous and also by the heterologous virus (Bratanich et al., 1991; Vogel et al., 2002; Del Médico

Zajac et al., 2006; Brum et al., 2010b). In any case, an important restriction for the use of conventional vaccines – either inactivated or live - is the impossibility of differentiation between vaccinated and naturally, latently infected animals (Van Oirschot et al., 1996). This restriction assumes special importance considering scenarios of control/eradication programs either at herd or at country level (Van Oirschot et al., 1996; Ackermann & Engels, 2006; Van Drunen-Littel van den Hurk, 2006).

Differential vaccines (DIVA, for “differentiating infected from vaccinated animals”), usually produced by gene deletion, are based on the capacity of the vaccine virus to induce a serological response differentiable from that induced by natural infection (Van Oirschot et al., 1996). Such vaccines have been widely used to control pseudorabies virus (PRV) and BoHV-1 infections in several countries (Van Oirschot et al., 1996; Van Drunen-Littel van den Hurk, 2006). A gE-deleted BoHV-1 recombinant strain has been previously constructed out a Brazilian BoHV-1.2 isolate (Franco et al., 2002a), but is not yet commercially available.

The non-essential viral envelope glycoprotein E (gE) is considered the most suitable antigenic marker for the production of BoHV-1 differential vaccines (Van Oirschot et al., 1996; Kaashoek et al., 1996; 1998). In addition to provide an antigenic marker, gE deletion from BoHV-1 and BoHV-5 genomes contributes for virus attenuation (Van Engelenburg et al., 1994; Kaashoek et al., 1996; 1998; Franco et al., 2002b; Silva et al., 2010). Nevertheless, the sole deletion of gE from BoHV-5 genome does not result in complete attenuation, and additional gene (s) deletion (s) may be required to produce fully attenuated vaccine strains (Chowdhury et al., 2000; Silva et al., 2010). In this sense, the deletion of thymidine kinase (tk) gene has shown to significantly contribute for attenuation of BoHV-1 vaccine candidate strains (Kit et al., 1985; Van Engelenburg et al., 1994; Kaashoek et al., 1996). A tk-deleted recombinant BoHV-5 was shown to be fully attenuated in a rabbit model (Silva et al., 2010).

Our group described the construction and *in vitro* characterization of a double mutant BoHV-5 lacking both gE and tk genes (BoHV-5gEΔTKΔ) out of a highly neurovirulent Brazilian BoHV-5 strain (Brum et al., 2010a). The experiments described in the present article investigated: i. The virulence/attenuation of the recombinant strain in calves following intranasal (IN) and intramuscular (IM) inoculation; ii. The ability of the recombinant to reactivate latent infection and, iii. Its immunogenicity in calves following primary and booster immunizations. Iv. In addition, the spectrum of serological reactivity of BoHV-5gEΔTKΔ was assayed by testing sera from immunized calves against several BoHV-1 and BoHV-5 field isolates.

2. Material and methods

Experimental design

Three independent experiments were conducted to investigate the virulence/attenuation and immunogenicity of the recombinant strain BoHV-5 gE/TKΔ for calves. In the first experiment (*Exp. 1*), six calves were inoculated intranasally (IN) and the acute infection was monitored in virological, clinical and serological aspects. At day 42 pi, an attempt to reactivate latent infection was performed by inoculating the calves with dexamethasone (Dx). The second experiment (*Exp. 2*) consisted of intramuscular (IM) vaccination of nine calves with the recombinant virus, followed by virological, clinical and serological monitoring. In the third experiment (*Exp. 3*), 21 calves were vaccinated IM and revaccinated 240 days later; serology was performed after vaccination and after booster. Post-inoculation/vaccination sera from all groups were tested by virus neutralizing (VN) assays and selected samples were also assayed for gE antibodies.

Cells and viruses

All procedures of virus amplification, quantitation, isolation and VN assays used a MDBK-derived cell line named CRIB (Flores & Donis, 1995). Cells were cultured in minimal essential medium (MEM), containing ampicillin (1.6mg/L), streptomycin (0.4mg/L), amphotericin (2mg/L), supplemented with 10% fetal bovine serum (Cultilab, Brazil). The construction and characterization *in vitro* of the double mutant BoHV-5 gE/TKΔ have been previously described (Brum et al., 2010a). The viruses used for cross-VN assays were the parental BoHV-5 strain (SV-507/99), nine BoHV-5 and eight BoHV-1 Brazilian isolates previously characterized by Silva et al. (2007). Virus stocks of all viruses were produced in CRIB cells, aliquoted and stored at -80°C.

Animals, virus inoculation and monitoring

Experiment 1: six Holstein male calves, aging 80 – 90 days, seronegative to BoHV-1 and BoHV-5 by VN were used for virus inoculation. The animals were inoculated by IN instillation of a virus suspension containing $10^{7.5}$ TCID₅₀ of the recombinant virus (passage 5). During 20 days, the animals were monitored clinically twice a day: body temperature, nasal and respiratory signs, systemic and/or neurological signs. Nasal swabs collected on a daily basis were submitted to virus isolation. Blood for serology was collected at day 0 and 32 pi. At day 42 pi, the calves were submitted to Dx administration (Decadronal) in a regimen of five daily dosis of 0.1mg/kg/day by the IM route. After Dx inoculation, the animals were monitored daily up to day 15 pDx as described during acute infection. Nasal swabs were collected for virus isolation and quantitation; serum samples were collected for serology.

Experiment 2: nine calves approximately 8 months-old, of both genders, weighing around 160 kg and tested negative for BoHV-1 and BoHV-5 antibodies were used. The animals were inoculated IM with a virus suspension containing $10^{7.5}$ TCID₅₀ of the

recombinant virus. Clinical examination and collection of nasal secretions for virus isolation were performed on a daily basis up to day 15 pi. Blood for serology was collected at day 0, 14, 21 and 42 pi.

Experiment 3: 24 calves of both genders, approximately 10 months-old, weighing around 140-160kg and tested negative for BoHV-1 and BoHV-5 antibodies were vaccinated IM with a virus suspension containing the recombinant virus ($10^{7.3}$ TCID₅₀) and revaccinated (IM, same viral dose) at day 240 post vaccination (pv). Blood for serology was collected at days 30, 70 and 240 pv and day 14 post-booster (254 days pv).

Sample processing

Virus isolation and quantitation - Nasal swabs collected from inoculated animals were submitted to virus isolation. The swabs were vortexed vigorously, low-speed centrifuged. The supernatants were inoculated onto CRIB cells monolayers grown on 24-well plates and submitted to three passages of five days each. The infectivity of the samples that were positive for virus was subsequently quantified by limiting dilution. Virus titers were calculated according to Reed & Muench (1938) and expressed as log₁₀TCID₅₀/mL.

Serology - Serum samples were submitted to a standard VN assay, testing two-fold dilutions of sera against a fixed dose (100-200TCID₅₀) of the recombinant virus. Serum samples collected from selected animals in Experiment # 3 were tested by VN against nine BoHV-5 and eight BoHV-1 isolates (Figure 1). The virus-sera mixtures were incubated 2h, following by addition of a suspension of CRIB cells; test readings were conducted after 72h of incubation. The antibody titers, expressed as the reciprocal of the highest dilution of sera that prevented the production of cytopathic effect (CPE) in the monolayers, were transformed in GMT (*geometric mean titer* [Thrusfield, 1986]) for the

calculation of the mean antibody titers of each group. Selected serum samples of animals from all groups were also submitted to a gE-specific ELISA (IDEXX Inc.).

All procedures of animal handling and experimentation were conducted under veterinary supervision and according to recommendations by the Brazilian Committee of Animal Experimentation (COBEA, law #6.638 of May, 8th, 1979). The experiment was approved by an Institutional Animal Ethics Committee (UFSC, approval # 48/2006).

3. Results

Experiment 1 - Intranasal inoculation of BoHV-5gE/TKΔ in young calves -

Even though an eventual live vaccine using the recombinant strain would be designed for parenteral administration, we initially investigated its virulence/attenuation for calves upon IN instillation. Inoculation of a virus suspension containing the recombinant virus (titer of $10^{7.5}$ TCID₅₀) in the nose of young calves was followed by virus replication and shedding from day 1 to 6pi (Table 1). Virus shedding titers peaked at $10^{4.8}$ TCID₅₀/ml at day 4pi and then progressively declined (not shown). No infectivity was detected in swabs collected after day 6pi. Inoculated animals did not present any systemic or neurological sign of infection; only a mild nasal secretion was observed in two calves between days 2 and 4pi. All inoculated animals seroconverted to BoHV-5 after acute infection. VN titers to the homologous virus ranged from 4 to 8 at day 32 pi. Despite of being VN positive, at day 32pi all calves remained negative for gE antibodies (Table 1).

Attempts to reactivate latent infection at day 42pi in four animals through Dx administration failed to induce virus shedding or increase in VN titers (Table 1). Likewise, Dx-treated calves did not develop local or systemic signs of infection after treatment.

Again, calves inoculated with the recombinant and inoculated with Dx remained negative for gE antibodies at day 30 pDx.

These results demonstrate that the recombinant virus is attenuated for 3-months-old calves upon IN instillation – even in a considerably high titer – yet replicates in the nose as to induce a measurable VN response. Further, the failure to recover virus and to detect increase in VN titers after Dx administration indicates that the recombinant virus is not readily reactivated from latency. Lastly, inoculated calves did not produce anti-gE antibodies.

Taken together, these results demonstrate the attenuation and immunogenicity of the recombinant virus for 3-months-old calves. Previously, we have demonstrated the attenuation of BoHV-5gE/TK Δ strain for rabbits, an experimental model for BoHV-5 neurological disease (Silva et al., 2010).

Experiment 2 - Intramuscular vaccination of 8-months-old calves with BoHV-5gE/TK Δ – Next, we inoculated calves with the recombinant virus by the IM route to investigate its ability to replicate and to induce a VN response upon parenteral administration. None of the calves inoculated IM with the vaccine candidate strain (titer of $10^{7.5}$ TCID₅₀) shed virus in nasal secretions or presented systemic signs of infection in the days following inoculation (Table 2; not shown). VN tests performed with sera collected at day 14, 21 and 42 pv revealed neutralizing titers from 2 to 4 to the homologous virus. All calves were negative for gE antibodies in the anti-gE-specific ELISA performed at day 42 pv (Table 2).

Experiment 3 - Intramuscular vaccination of 10-months-old calves with BoHV-5gE/TK Δ – The last experiment was designed to evaluate the VN serological response to vaccination in 24 calves after IM vaccination and following a boost immunization performed 8 months later. Primary immunization resulted in detectable VN

titers in 15/21 animals, in titers ranging from 2 to 8 at day 30 pv (Table 3). The vaccinated calves were maintained further, and VN tests performed with sera collected at day 240 pv revealed a slight reduction in mean titers. (Table 3, Figure 1). A boost immunization performed at day 240 pv resulted in a strong anamnestic response in all animals, with VN titers reaching from 16 to 256 at day 14 post-revaccination. Even animals harboring low VN titers at day 240 responded effectively to the booster immunization (Table 3).

Selected serum samples collected at different time points after immunization (VN titers of 4, 8, 16 and 32 against the homologous virus) reacted with a range of BoHV-5 and BoHV-1 isolates in VN tests (Figure 2). In general, VN titers against BoHV-5 isolates were identical, one dilution above or below that to the homologous virus. When tested against BoHV-1 isolates, the three sera reacted in identical dilution, one or two dilutions below that against the recombinant. A serum sample with VN titer of 4 to the homologous virus showed VN titer of 8 against one BoHV-1 isolate (SV 1313/93) and > 2 against the other BoHV-1 isolates (not shown). These results show the broad spectrum of reactivity of the antisera produced in response to immunization with the recombinant BoHV-5gE/TKΔ.

4. Discussion

The experiments described herein demonstrate the attenuation and immunogenicity for calves of the recombinant BoHV-5 gE/TKΔ, a candidate vaccine strain. The attenuation was initially demonstrated by IN inoculation of a high virus titer in young, highly susceptible calves. Attenuation was also demonstrated in a group of 8-months-old calves inoculated IM, a route routinely used for administration of MLV vaccines. The immunogenicity of the recombinant was further demonstrated in a third group of calves (vaccinated by the IM route) by the induction of a VN response of adequate magnitude in most animals. In addition, VN antibodies developed by vaccinated

animals showed a broad spectrum of reactivity with BoHV-5 and BoHV-1 field isolates. Lastly, vaccinated/inoculated animals of all three experimental groups remained negative for gE antibodies. Taken together, these results are promising towards the use of the recombinant virus in vaccine formulations.

The need for a safe, effective and antigenically marked vaccine has led to the development of recombinant vaccines to be used in Brazil and other South American countries. A gE-deleted BoHV-1 recombinant strain was constructed out a Brazilian BoHV-1.2 isolate (Franco et al., 2002a). The recombinant was attenuated for cattle and induced protection against BoHV-1 by intranasal (Franco et al., 2002b) and genital challenge (Weiss et al., 2010). Recently, a double deletion mutant, defective in the glycoprotein (gE) and thymidine kinase (tk) genes was constructed out of a neurovirulent, well characterized Brazilian BoHV-5 strain (Brum et al., 2010a). Although other herpesvirus glycoproteins have been targeted for deletion (Flores et al., 1993; Van Oirschot et al., 1996; Kaashoek et al., 1998), gE has shown to be a suitable antigenic marker (Van Oirschot et al., 1996; Kaashoek et al., 1996; 1998; Franco et al., 2002a; Van Drunen Little-van den Hurk, 2006).

Bovine herpesvirus 1 and PRV gE- negative vaccines have been now used for years in several European countries, the US and Japan (Van Oirschot et al., 1996; Van Drunen Littel-van den Hurk et al., 2006). A few studies investigating the effect of gE deletion on BoHV-5 virulence indicate that the sole gE deletion may not suffice to produce adequate attenuation, at least in the rabbit model (Chowdhury et al., 2000; Silva et al., 2010). Thus, we introduced an additional deletion in the viral genome, targeting the gene encoding the enzyme thymidine kinase (tk) (Brum et al., 2010a). Bovine herpesvirus tk-deletion mutants have been shown to be attenuated, probably due to a defective

replication in neurons (Kit et al., 1985; Whetstone et al., 1992; Van Engelenburg et al., 1994; Kaashoek et al., 1996; Silva et al., 2010).

The attenuation of the recombinant BoHV-5gE/TK Δ was previously demonstrated in a rabbit model (Silva et al., 2010). Weanling rabbits inoculated IN with the double mutant replicated and shed much less virus, and for a shorter period than rabbits inoculated with the parental virus, and remained healthy during acute infection (Silva et al., 2010). In addition, the recombinant virus was not reactivated from latent infection upon Dx administration (Silva et al., 2010). In the present study, highly susceptible calves inoculated IN with a high virus titer shed virus in low to moderate titers for a short period; did not present systemic or local signs during acute infection; and did not shed virus upon Dx inoculation. . The period of excretion and titres detected in nasal swabs were comparable to other reports of experimental infections with BHV-5. Using a group of 5 animals (60-90 days old) our group have observed that the calves inoculated with the same amount of wt virus the calves shed virus for an average time of 10.8 days (data not show). In other studies, calves were inoculated intranasally with the same isolate (wild type SV 507/99) and virus shed in nasal secretion was detected up to 21 days in some animals (VOGEL et al., 2003, 2004).

As an eventual MLV vaccine would be designed for parenteral use, the safety of the recombinant virus was further investigated by IM inoculation of 8-months-old calves (Experiment 2). Inoculated animals did not shed virus in secretions and remained healthy during the clinical monitoring. Reactivation of latent infection was not attempted in these animals. Regardless, the failure to recover virus after Dx administration of IN-inoculated calves strongly suggested that virus reactivation in IM-inoculated animals would be very unlikely. Although latency may be established, reactivation and shedding of BoHV-1 and BoHV-5 strains after IM administration has not been demonstrated (Jones et al., 2000).

Furthermore, gE gene-deleted BoHV-1 and BoHV-5 strains are not shed upon Dx treatment (even after IN inoculation), probably reflecting a deficiency in anterograde transneuronal transport (Kaashoek et al., 1998; Mars et al., 2000; Franco et al., 2002b; Liu et al., 2008; Brum et al., 2009). Taken together, these results demonstrate the attenuation and safety of the recombinant BoHV-5gE/TK Δ for young calves, a highly desired property of a virus strain designed to be used in MLV vaccines.

A previous study demonstrated that the double deletion did not affect adversely the immunogenicity of the recombinant virus upon use in an inactivated, aluminum hydroxide-adjuvanted vaccine formulation (Brum et al., 2010b). On the other hand, the replication efficiency of the recombinant virus was markedly reduced in the rabbit model (Silva et al., 2010). Since the immunogenicity of a bovine herpesvirus is strongly dependent upon the replication efficiency (Kaashoek et al., 1996; 1998), a deficient replication in the host would compromise its potential use in MLV formulations. Fortunately, our data support that the replication of the recombinant strain was sufficient to induce an adequate VN response in most animals, either after IN (Exp. 1, Table 1) or IM administration (Exp. 2 and 3, Tables 2 and 3, respectively). In a group of calves observed longer (Exp. 3), VN titers induced by vaccination remained almost unaltered for up to 8 months. Furthermore, a booster vaccination performed 240 days after the first dose triggered a prompt and strong anamnestic serological response, confirming the adequate immunization/priming by primovaccination. Even though cell-mediated immune response is believed to play a predominant role in protection against herpesvirus infections, VN antibody levels are indicators of the immune response and likely contribute for protection as well (Babiuk et al., 1996).

The high antigenic similarity and cross-neutralization between BoHV-1 and BoHV-5 *in vitro* (Bratanich et al., 1991; Vogel et al., 2002; Holtz et al., 2009) have

suggested that proper immunization with one of these viruses would afford heterologous protection (Del Médico Zajac et al., 2006; Brum et al., 2010b). Nonetheless, immunization of rabbits and calves with a gE-deleted BoHV-1 recombinant conferred insufficient protection upon challenge with a high BoHV-5 titer (Silva et al., 2006). Although cross-protection was not addressed in the present study, serum samples collected from vaccinated animals (Exp. 3) showed a broad spectrum of neutralizing activity against several homologous (BoHV-5) and heterologous (BoHV-1) viruses (Figure 2). Furthermore, preliminary data from protection studies demonstrated homologous (BoHV-5) and heterologous (BoHV-1) protection in calves vaccinated with the recombinant BoHV-5gE/TK Δ (Anziliero et al. manuscript in preparation). Based on these and previous data (Belknap et al., 1994; Del Médico Zajac et al., 2006), we propose that proper immunization of cattle with the recombinant BoHV-5gE/TK Δ may confer protection to BoHV-5 and BoHV-1 as well.

It is expected that Brazil and other South American countries will follow the North American and European trends of using antigenically marked bovine herpesvirus vaccines in control/eradication programs either at herd or at regional/national levels. In this sense, the results presented herein are promising towards the use of the double mutant in a DIVA vaccine. None of the vaccinated/inoculated animals produced antibodies to gE, even when tested a long time after vaccination, and also after a boost immunization. In contrast, most calves vaccinated IM with an inactivated vaccine containing the parental virus (Brum et al., 2010b) or immunized/inoculated with the live parental virus or with a gE-deleted BoHV-1 seroconverted to gE after 30 or 40 days (Brum et al., 2010b; Weiss et al., 2010; Santos et al. manuscript in preparation). Thus, the serological response induced by the recombinant virus is gE-ELISA differentiable from that induced by infection or immunization with the whole, inactivated or live virus.

In summary, the results presented herein demonstrate that the recombinant BoHV-5gE/TK Δ is attenuated and immunogenic for calves, induces a serological response differentiable from that derived from infection and, thus, may represent a valuable tool for use in vaccine formulations for the control/prevention of BoHV-1/BoHV-5 infections.

References

- Anziliero D., Santos C.M.B., Bauermann F.B., Brum M.C.S., Weiblen R., Flores E.F. 2010. Immunization of calves with a recombinant bovine herpesvirus 5 defective in thymidine kinase and glycoprotein E confers protection against BoHV-5 and BoHV-1 challenge. (manuscript in preparation).
- Ackermann M, & Engels M. 2006. Pro and contra IBR eradication. *Vet. Microbiol.* 113(3/4), 293-302.
- Babiuk L.A., Van Drunen Littel-van den Hurk S., Tikoo S.K. 1996. Immunology of bovine herpesvirus 1 infection. *Vet. Microbiol.* 53:31-42.
- Bratanich A.C., Sardi A.I., Smitsäart E.N., Schudel A.A. 1991. Comparative studies of BHV-1 variants by *in vivo* and *in vitro* tests. *J. Vet. Med. B.* 38, 41-48.
- Brum M.C., Coats C., Sangena R.B., Doster A., Jones C., Chowdhury S.I. 2009. Bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1) anterograde neuronal transport from trigeminal ganglia to nose and eye requires glycoprotein E. *J. Neurovirol.* 15, 196-201.
- Brum M.C., Weiblen R., Flores E.F., Chowdhury S.I. 2010a. Construction and growth properties of bovine herpesvirus type 5 recombinants defective in the glycoprotein E or thymidine kinase gene or both. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 43, 217-224.
- Brum M.C.S., Caron L., Chowdhury S.I., Weiblen R., Flores E.F. 2010b. Immunogenicity of an inactivated bovine herpesvirus type 5 strain defective in thymidine kinase and glycoprotein E. *Pesq. Vet. Bras.* 30, 57-62.
- Belknap E.B., Collins J.K., Ayers V.K. & Schultheiss P.C. 1994. Experimental infection of neonatal calves with neurovirulent bovine herpesvirus type-5 (BHV-5). *Vet. Pathol.* 31, 358-365.

- Caron L., Flores E.F., Weiblen R., Scherer C.F.C., Irigoyen L.F., Roehe P.M., Odeon A. & Sur J-H. 2002. Latent infection by bovine herpesvirus type-5 in experimentally infected rabbits: virus reactivation, shedding and recrudescence of neurological disease. *Vet. Microbiol.* 84, 285-295.
- Carrillo B.J., Ambrogí A., Schudel A.A., Vazquez M., Dahme E. & Pospischil A. 1983. Meningoencephalitis caused by IBR virus in calves in Argentina. *Zbl. Vet. Med. B.* 30, 327-332.
- Chowdhury S.I., Lee B.J., Ozkul A., Weiss M.L. 2000. Bovine herpesvirus 5 glycoprotein E is important for neuroinvasiveness and neurovirulence in the olfactory pathway of the rabbit. *J. Virol.* 74, 2094-2106.
- Colodel E.M., Nakazato L., Weiblen R., Mello R.M., Silva R.R.P., Souza M.A., Filho J.A.O. & Caron L. 2002. Meningoencefalite necrosante em bovinos causada por herpesvírus bovino no estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Ciência Rural.* 32, 293-298.
- Delhon G., Moraes M.P., Lu Z., Afonso C.L., Flores E.F., Weiblen R., Kutish G.F. & Rock D.L. 2003. Genome of bovine herpesvirus 5. *J. Virol.* 77, 10339-10347.
- Del Médico Z.M.P., Puntel M., Zamorano P.I., Sadir A.M. & Romera S.A. 2006. BHV-1 vaccine induces cross-protection against BHV-5 disease in cattle. *Res. Vet. Sci.* 81, 327-34.
- Engels M., Ackermann M. 1996. Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. *Vet. Microbiol.* 53, 3-15.
- Flores E.F., Osorio F.A., Zanella E.L., Kit S., Kit M. 1993. Efficacy of a deletion mutant bovine herpesvirus-1 (BHV-1) vaccine that allows serologic differentiation of vaccinated from naturally infected animals. *J. Vet. Diagn. Invest.* 5, 534-540.
- Flores E.F. & Donis R. 1995. Isolation of a mutant MDBK cell line resistant to bovine virus diarrhea virus (BVDV) due to a block in viral entry. *Virol.* 208, 565-575.

Franco A.C., Rijsewijk F.A.M., Flores E.F., Weiblen R., Roehe P.M. 2002a. Construction and characterization of a glycoprotein E deletion mutant of bovine herpesvirus type 1.2 strain isolated in Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 33, 274-278.

Franco A.C., Spilki F.R., Esteves P.A., Lima M., Weiblen R., Flores E.F., Rijsewijk F.A.M., Roehe P.M. 2002b. A Brazilian glycoprotein E-negative bovine herpesvirus type 1.2a (BHV-1.2a) mutant is attenuated for cattle and induces protection against wild-type virus challenge. *Pesq. Vet. Bras.* 22, 135-140.

Holz C.L., Cibulski S.P., Teixeira T.F., Batista H.B.C.R., Campos, F.S., Silva R.S., Varela AP., M. Cenci A., Franco, AC., Roehe PM. 2009. Soroprevalência de herpesvírus bovinos tipos 1 e/ou 5 no Estado do Rio Grande do Sul. *Pesq. Vet. Bras.* 29, 767-773.

Jones C., Newby T.J., Holt T., Doster A., Stone M., Ciacci-Zanella J., Webster C.J., Jackwood MW. 2000. Analysis of latency in cattle after inoculation with a temperature sensitive mutant of bovine herpesvirus 1 (RLB106). *Vaccine.* 18, 3185-3195.

Kaashoek M.J., Van Engelenburg F.A., Moerman A., Gielkens A.L., Rijsewijk F.A., Van Oirschot JT. 1996. Virulence and immunogenicity in calves of thymidine kinase and glycoprotein E-negative bovine herpesvirus 1 mutants. *Vet. Microbiol.* 48, 143-153.

Kaashoek M.J., Rijsewijk F.A., Ruuls R.C., Keil G.M., Thiry E., Pastoret P.P., Van Oirschot J.T. 1998. Virulence, immunogenicity and reactivation of bovine herpesvirus 1 mutants with a deletion in the gC, gG, gI, gE, or in both the gI and gE gene. *Vaccine.* 16, 802-809.

Kahrs R.F. Infectious bovine rhinotrachitis and infectious pustular vulvovaginitis. In: Kahrs, R.F., *Viral disease of cattle.* Iowa State University Press, Ames, 2001. p.159-170.

Kit S., Qavi H., Gaines J.D., Billingsley P., McConnell S. 1985. Thymidine kinase-negative bovine herpesvirus type 1 mutant is stable and highly attenuated in calves. *Arch. Virol.* 86, 63-83.

Liu Z.F., Brum M.C.S., Doster A., Jones C., Chowdhury S.I. 2008. A Bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) mutant virus specifying a carboxyl terminal truncation of glycoprotein E (gE) is defective in anterograde neuronal transport in rabbits and calves. *J. Virol.* 82, 7432-7442.

Mars M.H., de Jong M.C., van Oirschot J.T. 2000. A gE-negative bovine herpesvirus 1 vaccine strain is not re-excreted nor transmitted in an experimental cattle population after corticosteroid treatments. *Vaccine.* 18, 1975-1981.

Rissi D.R., Rech R.R., Flores E.F., Kommers G.D. & Barros CL. 2007. Meningoencephalitis by bovine herpesvirus-5. *Pesq. Vet. Bras.* 27, 251-260.

Rock D.L. 1994. Latent infection with bovine herpesvirus type 1. *Sem. Virol.* 5, 233-240.

Roizman B. 1992. The family *Herpesviridae*: an update. *Arch. Virol.* 123, 425-449.

Reed L, Muench H.A. 1938. Simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Hyg.* 27, 493-497.

Salvador S.W.C., Lemos R.A.A., Riet-Correa F., Roehe P.M. & Osorio A.L.A.R. 1998. Meningoencefalite em bovinos causada por herpesvírus bovino-5 no Mato Grosso do Sul e São Paulo. *Pesq. Vet. Bras.* 18, 76-83.

Santos C.M.B., Anziliero D., Bauermann F.B., Brum M.C.S., Weiblen R., Flores E.F. 2010. Experimental infection of calves with bovine herpesvirus 5 recombinants defective in the genes encoding glycoprotein E, thymidine kinase or both. (manuscript in preparation).

Silva A.D., Spilki F.R., Franco A.C., Esteves P.A., Hübner S.O., Driemeier D., Oliveira A.P., Rijsewijk F.A.M. & Roehe P.M. 2006. Vaccination with a gE-negative bovine herpesvirus type 1 vaccine confers insufficient protection to a bovine herpesvirus type 5 challenge. *Vaccine.* 24, 3313-3320.

Silva M.S., Brum M.C.S., Loreto E.L., Weiblen R. & Flores E.F. 2007. Molecular and antigenic characterization of Brazilian bovine herpesvirus type 1 isolates recovered from the brain of cattle with neurological disease. *Virus Res.* 129, 191-199.

Silva, S.C., Brum M.C., Weiblen R., Flores E.F., Chowdhury S.I. 2010. A bovine herpesvirus 5 recombinant defective in the thymidine kinase (TK) gene and a double mutant lacking TK and the glycoprotein E gene are fully attenuated for rabbits. *Braz. J. of Med. and Biol. Res.* 43, 150-159.

Studdert M.J. 1990. Bovine encephalitis herpesvirus. *Vet. Rec.* 126: 21-22.

Thrusfield M. Serological epidemiology, p.175-186. In: ____ (ed.), *Veterinary epidemiology.* Butterworths, London. 1986, 280p.

Van Drunen Littel-van den Hurk S. 2006. Rationale and perspectives on the success of vaccination against bovine herpesvirus-1. *Vet. Microbiol.* 113, 275-282.

Van Engelenburg F.A.C, Kaashoek M.J, Rijsewijk F.A.M, Van den Burg L., Moerman A, Gielkens A.L.J, van Oirschot J.T. 1994. A glycoprotein E deletion mutant of bovine herpesvirus 1 is avirulent in calves. *J. Gen. Virol.* 75, 2311-2318.

Van Oirschot J.T, Kaashoek M.J, Rijsewijk F.A, Stegeman J.A. 1996. The use of marker vaccines in eradication of herpesviruses. *J. Biotechnol.* 44, 75-81.

Vogel F.S.F., Flores E.F., Weiblen R. & Kunrath C.F. 2002. Atividade neutralizante anti-herpesvírus bovino tipos 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5) no soro de bovinos imunizados com vacinas contra o BHV-1. *Ciência Rural.* 32, 881-883.

Vogel F.S.F., Caron L., Flores E.F., Weiblen R., Winkelmann E.R., Mayer S.V. & Bastos R.G. 2003. Distribution of bovine herpesvirus type 5 DNA in the central nervous systems of latently, experimentally infected calves. *J. Clin. Microbiol.* 41, 4512-4520.

Vogel F.S.F., Lima M., Flores E.F., Weiblen R., Winkemann R., Mayer S.V., Mazzutti K.C., Arenhart S. 2004. Viral replication and shedding during acute infection and after

dexamethasone induced reactivation of latency in calves inoculated with bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) and 5 (BHV-5). *Ciência Rural* 34:1619-1621.

Whetstone C.A., Miller J.M., Seal B.S., Bello L.J., Lawrence W.C. 1992. Latency and reactivation of a thymidine kinase-negative bovine herpesvirus 1 deletion mutant. *Arch. Virol.* 122, 207-214.

Weiss M., Vogel F.S.F., Martins M., Weiblen R., Roehe P.M., Franco A.C., Flores E.F. 2010. Genital immunization of heifers with a glycoprotein E-deleted, recombinant bovine herpesvirus 1 strains confers protection upon challenge with a virulent isolate. *Pesq. Vet. Bras.* 30, 42-50.

Table 1. Virological and serological findings after intranasal inoculation of 80 to 90-days old calves with the recombinant virus BoHV-5gE/TKΔ (Experiment 1).

Animal	Acute infection			Post Dx administration (pDx) ^b			
	Virus shedding (days)	VN antibodies (day 32pi) ^a	ELISA gE (day 32pi)	VN antibodies (day 42 pi)	Virus shedding	VN antibodies (day 30pDx)	ELISA gE (day 30pDx)
44	1-6	8	- ^c	4	- ^d	4	- ^c
45	1-6	8	-	8	-	8	-
3276	1-6	4	-	8	nt ^e	nt	nt
3278	1-6	4	-	4	nt	nt	nt
3280	1-6	4	-	4	-	4	-
4324	1-6	8	-	8	-	4	-

^a All animals were seronegative at the day of virus inoculation (VN titers < 2);

^b Dexamethasone treatment started at day 42 pi (see Material & Methods);

^c Negative in the anti-gE ELISA;

^d Nasal swabs were negative for virus up to day 20 pi and up to day 15 pDx;

^e Calves 3276 and 3278 were not submitted to Dx administration.

Table 2. Virological and serological findings after intramuscular inoculation of 8-months-old calves with the recombinant virus BoHV-5gE/TKΔ (Experiment 2).

Animal	Virus shedding	Clinical signs	Virus neutralizing titers ^c			ELISA gE day 42 pi
			day 14 pi	day 21 pi	day 42 pi	
162	- ^a	n/a ^b	4	4	4	- ^d
193	-	n/a	4	4	2	-
188	-	n/a	2	4	2	-
101	-	n/a	2	4	2	-
194	-	n/a	2	2	2	-
191	-	n/a	4	4	4	-
130	-	n/a	2	4	2	-
164	-	n/a	4	2	2	-
192	-	n/a	4	2	2	-

^a Nasal swabs were negative for virus up to day 15 pi;

^b No clinical signs were observed during monitoring;

^c All animals were seronegative at the day of virus administration (VN titers < 2);

^d Negative in the anti-gE ELISA.

Table 3. Serological response developed by calves vaccinated intramuscularly with the recombinant virus BoHV-5gE/TKΔ (Experiment 3).

Animal	Virus neutralizing titers ^a				ELISA gE day 14 pb (254pv)
	Post vaccination (pv)			Post booster (pb)	
	day 30 pv	day 70 pv	day 240 pv	day 14 pb (254pv)	
108	2	2	2	32	- ^c
134	nt ^b	2	2	256	-
101	4	2	2	32	-
111	2	4	4	64	-
121	2	4	2	64	-
149	2	8	4	64	-
117	4	4	4	32	-
096	2	4	2	64	-
144	2	4	2	128	-
100	2	8	2	16	-
115	4	8	2	128	-
122	2	8	2	64	-
137	8	2	2	64	-
130	2	<2	4	256	-
139	<2	4	4	128	-
133	<2	2	4	128	-
116	<2	<2	2	128	-
118	<2	<2	4	256	-
131	4	4	16	64	-
148	4	4	2	128	-
141	<2	<2	2	256	-
138	<2	2	4	256	-
120	<2	<2	2	128	-
147	<2	<2	2	64	-

^a All animals were seronegative at the day of vaccination (VN titers < 2);

^b Non-tested;

^c Negative in the anti-gE ELISA.

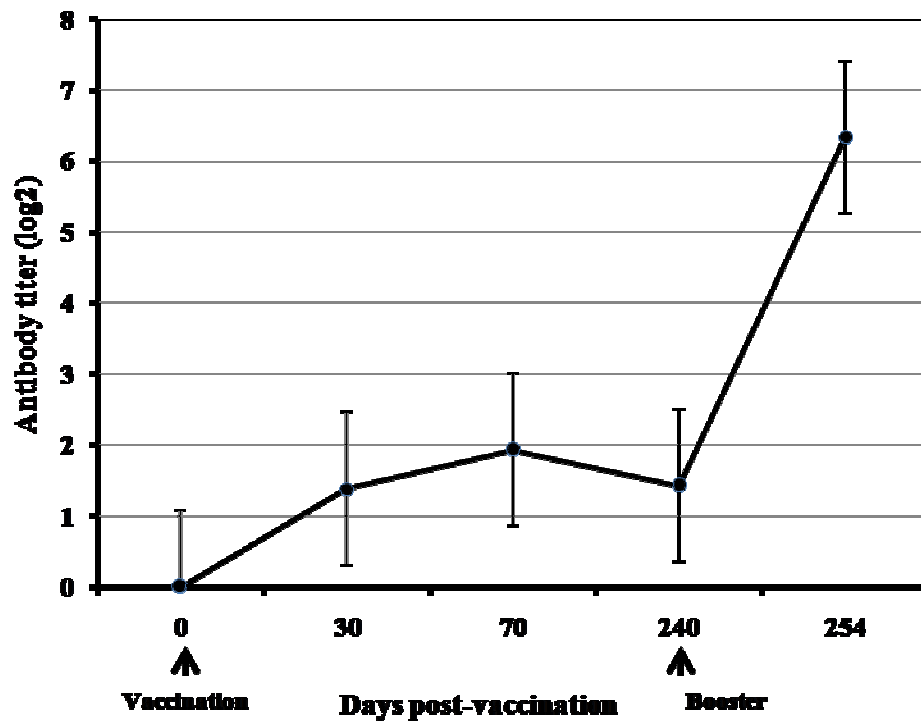


Figure 1. Mean antibody titers to the homologous virus in sera of calves immunized with the recombinant virus and revaccinated 240 days later (Experiment 3). To calculate the means, virus neutralization (VN) titers were transformed in geometric mean titers (GMT). The standard error is indicated by error bars.

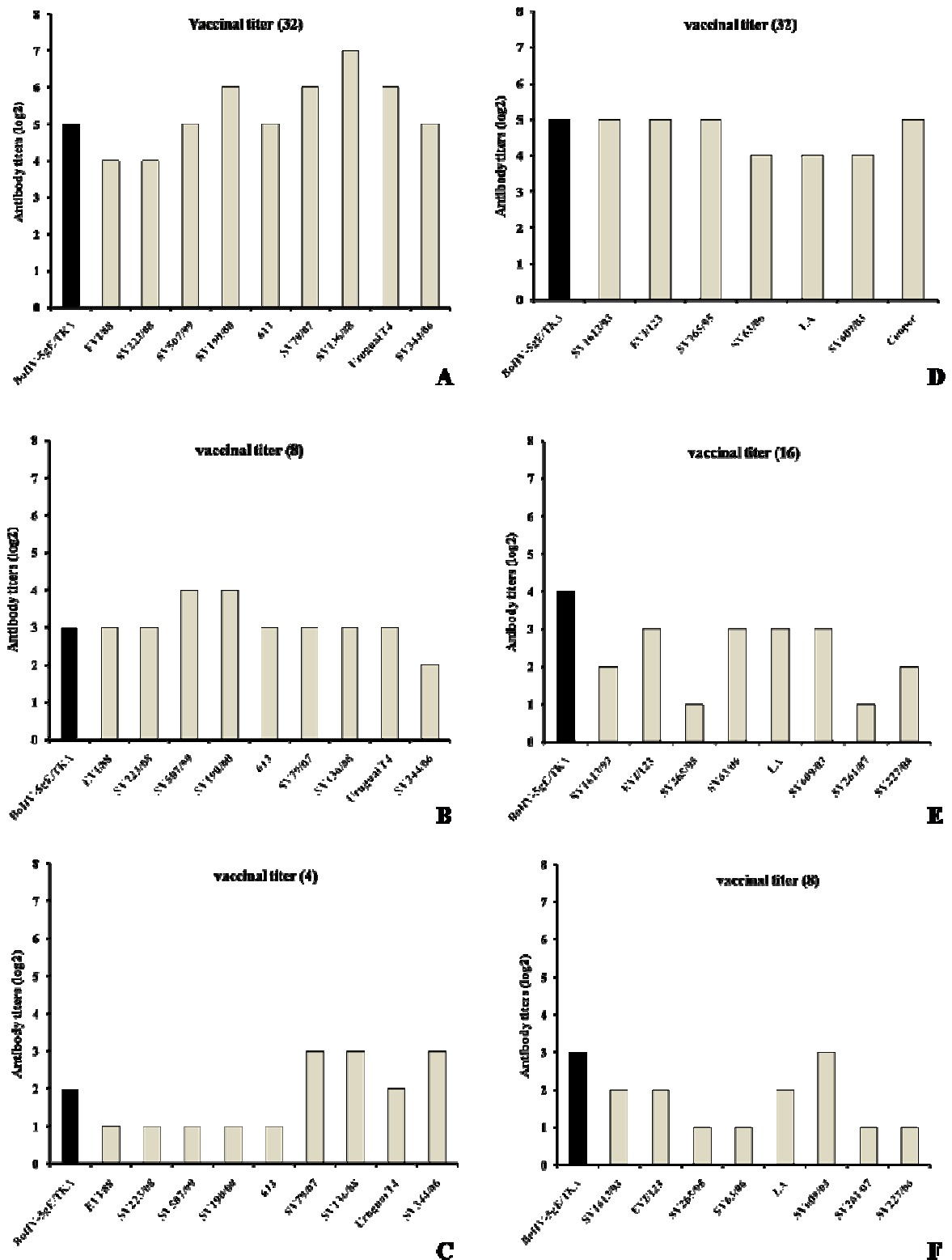


Figure 2. Virus neutralizing (VN) titers to homologous and heterologous viruses in selected sera of calves immunized with the recombinant virus (Experiment 3). Each figure represents the reactivity of serum of one animal. Titers are expressed in log₂. Left panel (A, B, C): VN titers to BoHV-5 isolates; right panel (D, E, F): VN titers to BoHV-1 isolates.

3. CAPÍTULO 2

Imunogenicidade de uma cepa recombinante do herpesvírus bovino tipo 5 defectiva na glicoproteína E e enzima timidina quinase

Deniz Anziliero¹, Cyndia M. B. dos Santos¹, Fernando V. Bauermann¹, Mário C. S. Brum²,
Rudi Weiblen¹ & Eduardo Furtado Flores^{1*}

(Artigo nas normas da revista *Ciência Rural* – 2010)

¹Setor de Virologia, Departamento de Microbiologia e Parasitologia e Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

²Universidade Federal do Pampa, Campus Uruguaiana, BR 472, km 592, Caixa Postal 118. Curso de Medicina Veterinária, Hospital Veterinário 97500-970 - Uruguaiana, RS – Brasil, Telefone: (55) 34134321

* Autor para correspondência: E.F. Flores, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil, CEP 97105-900. Fone/fax + (55) 55 3220-8034. E-mail: flores@ccr.ufsm.br

RESUMO

Os herpesvírus bovino tipos 1 e 5 (BoHV-1 e BoHV-5) são agentes antígenicamente relacionados e se constituem em importantes patógenos em bovinos. A construção e caracterização *in vitro* de um recombinante do BoHV-5 com deleções nos genes da glicoproteína E (gE) e da enzima timidina quinase (TK) como candidato a cepa vacinal (BoHV-5gE/TKΔ) foi relatada (BRUM, 2009). O presente trabalho avaliou a atenuação e imunogenicidade conferida por este recombinante em bovinos. Nove bezerros soronegativos para o BoHV-5 foram vacinados pela via intramuscular com uma dose de $10^{7,5}$ DICC₅₀ (Doses infectantes para 50% dos cultivos celulares) do vírus recombinante e oito animais foram mantidos como controles não vacinados. Os bezerros vacinados não apresentaram sinais clínicos e não excretaram o vírus nas secreções nasais nos dias seguintes a vacinação. No dia 42 pós-vacinação (pv), os animais vacinados e os controles foram desafiados pela inoculação intranasal (IN) de isolados de BoHV-5 (grupos Vac/BoHV-5, Cont/BoHV-5) e de BoHV-1 (grupos Vac/BoHV-1 e Cont/BoHV-1). Após o desafio, a excreção de vírus pelos animais vacinados foi reduzida em magnitude e duração em comparação com os animais não vacinados. Os animais vacinados não apresentaram sinais clínicos sistêmicos, respiratórios ou neurológicos após o desafio. Por outro lado, os animais controles desafiados com o BoHV-5 (n=4) desenvolveram doença neurológica severa e foram eutanasiados *in extremis* entre os dias 13 e 14 pós-desafio (pd). Já os bezerros controles desafiados com o BoHV-1 desenvolveram apenas sinais leves da infecção respiratória. Todos os animais vacinados soroconverteram aos 14 dias pv, apresentando títulos de anticorpos neutralizantes entre 2 e 4. Após o desafio, os animais vacinados apresentaram uma resposta anamnésica rápida e intensa, atingindo títulos neutralizantes superiores aos animais não vacinados. A vacinação não induziu anticorpos contra a gE porém, após o desafio tanto os animais vacinados quanto

os controles desenvolveram anticorpos contra essa glicoproteína. Esses resultados indicam que o recombinante BoHV-5 gE/TK Δ é um candidato adequado a cepa vacinal com marcador antigênico, pois é atenuado e imunogênico para bovinos.

Palavras-chave: herpesvírus bovino, marcador antigênico, vacina diferencial, recombinante.

ABSTRACT

Bovine herpesviruses 1 and 5 (BoHV-1, BoHV-5) are antigenically closely related and are important pathogens of bovines. The construction and characterization *in vitro* of a BoHV-5 recombinant deleted in the glycoprotein E (gE) and thymidine kinase (TK) genes (BoHV-5gE/TK Δ) as a vaccine candidate strain has been reported (BRUM, 2009). The present study evaluated the virulence and immunogenicity conferred by this recombinant in cattle. Nine BoHV-5 seronegative calves were vaccinated intramuscularly with the recombinant virus in a dose of $10^{7.5}$ TCID₅₀ (50% tissue culture infective dose) and eight calves were maintained as non-vaccinated controls. Vaccinated calves did not develop signs of disease or shed virus in secretions in the days following vaccination. At day 42 post-vaccination (pv), both vaccinated and control calves were challenged by intranasal (IN) inoculation of virulent isolates of BoHV-5 (groups Vac/BoHV-5, Cont/BoHV-5) and BoHV-1 (Vac/BoHV-1, Cont/BoHV-1). After challenge, the length and magnitude of virus shedding was reduced in vaccinated animals compared to controls. No systemic clinical signs, respiratory or neurologic signs were observed in vaccinated animals after challenge. On the other hand, all control calves challenged with BoHV-5 (n=4) developed severe neurological disease and were euthanized *in extremis* between days 13 and 14 post-challenge (pc). Control calves challenged with BoHV-1 showed only mild clinical signs of respiratory infection. All vaccinated calves seroconverted at 14 days pv, developing virus neutralizing titers from 2 to

4. After challenge, vaccinated animals showed a prompt and intense anamnestic response, an increase in VN titres, reaching titres higher than non-vaccinated animals. The vaccination did not induce antibodies to gE. However, after challenge both vaccinated and control calves seroconverted to this glycoprotein. These results showed that the recombinant BoHV-5 gE/TK Δ is a good candidate for a differential vaccine strain, is attenuated and immunogenic for calves.

Key words: bovine herpesvirus, antigenic marker, differential vaccine, recombinant.

INTRODUÇÃO

O herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) é o agente da meningoencefalite herpética bovina. O BoHV-5 é um vírus envelopado, com genoma DNA de cadeia dupla com aproximadamente 138kb, pertencente a subfamília *Alphaherpesvirinae*, gênero *Varicellovirus* (ROIZMAN et al., 1992). O BoHV-5 possui similaridade genética e antigênica com o BoHV-1, agente da rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) (ENGELS & ACKERMANN, 1996). A doença causada pelo BoHV-5 é caracterizada por tremores, andar em círculos, bruxismo, protusão de língua, opistótono, pressionamento da cabeça contra anteparos, incoordenação motora, decúbito seguido por convulsões, movimentos de pedalagem e morte (RISSI et al., 2007). O agente vem sendo identificado em vários Estados brasileiros e em outros países da América do Sul (CARRILLO et al., 1983; SALVADOR et al., 1998; SILVA et al., 2007b). Assim como outros herpesvírus, após a infecção aguda, o BoHV-5 estabelece infecção latente em neurônios de gânglios sensoriais (CHOWDHURY et al., 1997).

O BoHV-5 possui mais de dez glicoproteínas no envelope, que desempenham importante papel no ciclo replicativo, mediando a penetração e disseminação dos vírions entre células, além de serem alvos da resposta imunológica do hospedeiro (SCHWYZER & ACKERMANN, 1996). Vários genes que codificam estas glicoproteínas tem sido utilizados

para deleção, conferindo atenuação e servindo como marcador antigênico para uso em vacinas (VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, 2006).

A vacinação contra os herpesvírus animais pode ser utilizada para minimizar os sinais clínicos além de contribuir para a redução da disseminação viral nos rebanhos, ou até mesmo, para a erradicação da infecção em nível populacional. Essa medida continua sendo a mais eficaz e econômica para o controle de infecções associadas aos herpesvírus bovino (VAN OIRSCHOT, 1996). Apesar da extensa reatividade sorológica cruzada entre o BoHV-5 e BoHV-1, ainda não existe um consenso sobre o papel da proteção cruzada das vacinas utilizadas para o BoHV-1 no controle da meningoencefalite pelo BoHV-5 (CASCIO et al., 1999; SPILKI et al., 2004). Grande parte das vacinas convencionais utilizadas para o controle do BoHV-1 são multivalentes, atenuadas ou inativadas (VAN OIRSCHOT et al., 1996).

No mercado brasileiro, várias vacinas nacionais e importadas contendo antígenos inativados do BoHV-1 estão em uso, além de uma vacina contendo vírus vivo atenuado (SILVA et al., 2007a). A vacinação tradicional, contudo, interfere na identificação sorológica de animais positivos, tornando impossível a diferenciação entre animais vacinados e infectados naturalmente. Nos últimos anos foram desenvolvidas vacinas com marcadores antigênicos, que quando associadas com testes diagnósticos específicos, permitem a diferenciação entre animais vacinados e infectados naturalmente (VAN OIRSCHOT et al., 1996). Vacinas diferenciais contra o BoHV-1 e vírus da pseudorraiva (PRV) já vem sendo utilizadas em diferentes países para o controle e erradicação destas enfermidades (VAN OIRSCHOT et al., 1996; ACKERMANN & ENGELS, 2006). No Brasil, vários laboratórios iniciaram o desenvolvimento de vacinas contra os herpesvírus bovino tipo 1 e 5 (FLORES, E. F. comunicação pessoal).

A construção e caracterização *in vitro* de um recombinante do BoHV-5, com deleções nos genes da glicoproteína E (gE) e timidina quinase (TK) (BoHV-5 gE/TK Δ), para eventual

uso como cepa vacinal foi descrita (BRUM, 2009). O objetivo do presente trabalho foi investigar a atenuação e imunogenicidade deste recombinante em bezerros, assim como a capacidade de diferenciação sorológica entre animais vacinados e infectados.

MATERIAL E MÉTODOS

Experimentação animal. Foram utilizados bezerros com idade entre 8 e 10 meses, de raça mista de corte, soronegativos para o BoHV-1 e 5. Nove animais foram vacinados com o vírus recombinante (BoHV-5 gE/TKΔ) pela via intramuscular (IM) e oito permaneceram como controles não-vacinados. No dia 42 pós-vacinação (pv), os animais vacinados foram divididos em dois grupos e juntamente animais não vacinados foram desafiados com o BoHV-5 (n=5) ou BoHV-1 (n=4) pela via intranasal (IN) seguido de monitoramento clínico e virológico.

Células e vírus. Células da linhagem de rim bovino CRIB foram utilizadas para a amplificação e quantificação viral, isolamento viral de secreções nasais e testes de soroneutralização (SN). As células foram cultivadas em meio essencial mínimo Eagle^a (MEM) suplementado com 10% de soro bovino fetal^b, penicilina (1,6mg/L) e estreptomicina (0,4mg/L). O recombinante contendo deleções nos genes da gE/TK foi obtido a partir da cepa SV507/99 utilizando a técnica de recombinação homóloga (BRUM, 2009). Os isolados EVI-88 e 613 utilizados no desafio foram isolados de doença neurológica, o isolado EVI-123 foi isolado de um surto de doença respiratória (D'ARCE et al., 2002).

Vacinação e desafio. Os animais foram vacinados pela via IM com $10^{7,5}$ DICC₅₀ (doses infectantes para 50% dos cultivos celulares) da cepa recombinante. O desafio realizado aos 42 dias pv constituiu-se da inoculação IN de suspensões virais de BoHV-5 ou BoHV-1 contendo $10^{7,6}$ DICC₅₀ do respectivo vírus.

Avaliação clínica. Os animais foram submetidos a monitoramento clínico diário durante os 14 dias subsequentes a vacinação e ao desafio. Escores clínicos foram determinados, atribuindo-se valores (0 a 3) de acordo com a severidade para cada parâmetro clínico (KAASHOEK et al., 1996).

Pesquisa de vírus. Suabes nasais coletados diariamente entre os dias 0 e 14 pv e pós-desafio (pd) foram submetidos a isolamento viral em cultivos de células CRIB, com realização de três passagens. A infectividade dos suabes positivos foi quantificada por diluição limitante; os títulos foram calculados de acordo com REED & MUENCH (1938) e expressos em $\log_{10}DICC_{50}/mL$.

Sorologia. Amostras de soro coletadas nos dias 0, 21, 42 pv e dias 0, 14, 30 e 70 pd foram submetidas ao teste de SN realizado de acordo com BRUM (2009) frente ao vírus recombinante e aos vírus utilizados no desafio. As médias dos títulos de anticorpos neutralizantes foram expressas em títulos médios geométricos (GMT) segundo THRUSFIELD (1986). As amostras de soro coletadas a determinados intervalos foram submetidas a um teste ELISA comercial anti-BoHV-1 gE^c.

Análise estatística. Os títulos virais encontrados pós-desafio foram submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando o teste-t para comparação entre médias com o uso do programa ASSISTAT^d 7.5 beta (2010) ao nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Monitoramento pós-vacinação. Não foram observados sinais clínicos nos animais imunizados com o vírus recombinante. No período pós-vacinal as tentativas de isolamento viral das secreções nasais desses animais também foram negativas. Anticorpos neutralizantes foram inicialmente detectados no dia 14 pv em 8 de 9 animais, e em todos os grupos no dia 21

pv. Todos os animais vacinados foram negativos no teste anti-BoHV-1 gE ELISA no dia 42pv (Tabela 1).

Achados virológicos e clínicos pós-desafio. Todos os animais desafiados excretaram o vírus nas secreções nasais por períodos variáveis. Os bezerros dos grupos Vac/BoHV-5 e Vac/BoHV-1 apresentaram um período de excreção viral inferior aos dos grupos controle (Cont/BoHV-5 e Cont/BoHV-1, respectivamente). Os títulos virais excretados pelos animais vacinados também foram inferiores aos excretados pelos grupos controle ($P < 0,01$ /Figura 1). O pico de excreção viral pelos animais dos grupos controle (Cont/BoHV-5 e Cont/BoHV-1) ocorreu entre os dias 3 e 5 pd, com títulos máximos de $10^{7,8}$ DICC₅₀/mL e $10^{7,9}$ DICC₅₀/mL, respectivamente. Já nos animais vacinados (grupos Vac/BoHV-5 e Vac/BoHV-1), os títulos virais máximos foram de $10^{7,8}$ DICC₅₀/mL e $10^{7,6}$ DICC₅₀/mL, respectivamente (Figura 1). Nos dias 3 e 5 e 7pd o grupo vacinado (Vac/BoHV-5) apresentou uma redução significativa nos títulos virais excretados, quando comparado com o grupo controle ($P < 0,01$). O grupo vacinado com o recombinante (Vac/BoHV-1) e desafiado com o BoHV-1 apresentou redução significativa na excreção viral nos dia 5 e 9 pd, se comparado ao grupo não vacinado desafiado com o BoHV-1 ($P < 0,05$).

Os quatro animais controles desafiados com o BoHV-5 (Cont/BoHV-5) desenvolveram doença neurológica grave durante a infecção aguda. Os sinais clínicos apresentados foram anorexia, apatia, protusão de língua, hipersalivação, dificuldade respiratória, andar cambaleante, pressionamento da cabeça contra anteparos. A manifestação dos sinais teve início ao redor do dia 11 pd e todos os animais deste grupo foram eutanasiados *in extremis* nos dias 14 e 15 pd.

Os animais do grupo controle desafiados com o BoHV-1 (Cont/BoHV-1) apresentaram sinais respiratórios leves (secreção nasal serosa, levemente aumentada). Já os animais vacinados e desafiados com o BoHV-1 ou BoHV-5 não apresentaram sinais clínicos.

Sorologia. As médias dos títulos de anticorpos desenvolvidos pelos animais durante o período pós-vacinal e pós-desafio expressas em GMT estão apresentadas na figura 2. Todos os animais vacinados apresentavam anticorpos neutralizantes já no dia 14 pv, em títulos que variaram de 2 a 4. No dia 42 pv, os animais vacinados apresentavam títulos entre 2 e 8. Já os animais do grupo controle (Cont/BoHV-5 e Cont/BoHV-1) permaneceram soronegativos até o dia do desafio. Neste dia (42 pv), todos os animais foram negativos no teste de ELISA anti-BoHV-1 gE.

Após o desafio, o grupo de animais vacinados desenvolveu uma rápida resposta secundária, detectada no dia 14 pd, com títulos neutralizantes de até 256, superiores aos títulos desenvolvidos pelos animais controle (entre 16 e 128). Estes títulos permaneceram estáveis nos animais vacinados até o dia 30 pd (Figura 2). Nos animais não vacinados (Cont/BoHV-1) ocorreu uma pequena variação nos títulos neutralizantes, porém a resposta humoral permaneceu com magnitude inferior a dos vacinados.

DISCUSSÃO

Vários países europeus têm empregado programas de vacinação contra o BoHV-1 utilizando vacinas diferenciais, com deleções no gene da glicoproteína E (MUYLKENS, 2006). Essas vacinas, inativadas ou atenuadas, quando utilizadas juntamente com um teste sorológico que detecta anticorpos anti-gE, permitem a diferenciação entre animais vacinados e infectados naturalmente. Essa capacidade de diferenciação tem sido essencial para o sucesso de programas de erradicação dessa infecção em vários países europeus (VAN OIRSCHOT, 1996).

A vacinação continua sendo a estratégia mais efetiva e economicamente viável para o controle de infecções por herpesvírus bovino. No Brasil, estudos demonstrando a baixa

imunogenicidade das vacinas disponíveis no mercado, aliados à dificuldade de importação de imunobiológicos de boa qualidade, assim como, as perdas econômica relativas ao BoHV-5, levaram diversos grupos de pesquisa ao desenvolvimento de novas vacinas, entre estas, vacinas com marcadores antigênicos (FRANCO et al., 2002; BRUM, 2009).

A cepa recombinante do BoHV-5 contendo a dupla deleção (BoHV-5 gE/TK Δ) desenvolvida a partir do isolado brasileiro SV507/99 já havia sido anteriormente caracterizada *in vitro* (BRUM, 2009) e em coelhos (SILVA et al., 2010). O recombinante apresentou completa atenuação em coelhos após inoculação IN. Apesar de o recombinante apresentar uma replicação menos eficiente quando comparada com o vírus parental, foi capaz de induzir a produção de anticorpos neutralizantes (SILVA et al., 2010). Dando continuidade a estes trabalhos, o presente estudo teve como objetivo estender essas observações, investigando a imunogenicidade e proteção dessa cepa nos hospedeiros naturais.

No presente trabalho, a imunização IM de bezerros com o recombinante BoHV-5 gE/TK Δ apresentou resultados satisfatórios no que se refere à atenuação, imunogenicidade e proteção. Os resultados demonstram que a dupla deleção (gE/TK) conferiu atenuação adequada ao vírus, pois os animais vacinados não desenvolveram sinais clínicos no período pós-vacinal. Em um estudo paralelo, a atenuação desse recombinante também foi demonstrada em bezerros de 80 a 90 dias de idade, inoculados com altos títulos pela via IN (SANTOS et al., 2010; dados não publicados). Esses resultados confirmam observações anteriores de que recombinantes defectivos na gE e TK são suficientemente atenuados e, assim, candidatos potenciais para uso em vacinas vivas (KAASHOEK et al., 1996). Por outro lado, deleções apenas na gE parecem não ser suficientes para conferir atenuação adequada ao BoHV-5 e BoHV-1 (KAASHOEK et al., 1996; SILVA et al., 2010).

No presente estudo, não foi investigado o possível estabelecimento de latência pelo recombinante. No entanto, estudos em coelhos (SILVA et al., 2010) e em experimentos em

andamento em bezerros (SANTOS et al., 2010; dados não publicados) demonstraram que este recombinante não estabelece e/ou não reativa a infecção latente com eficiência após inoculação IN. Dessa forma, o recombinante apresenta-se atenuado durante a infecção/replicação aguda e é defectivo no estabelecimento e/ou na reativação de latência, características altamente desejáveis em cepas vacinais de herpesvírus.

A sorologia demonstrou que, aos 21 dias pv, 8 de 9 animais já apresentavam anticorpos neutralizantes e, que aos 42 dias pv todos os animais apresentavam títulos de anticorpos neutralizantes entre 2 e 8. Em um estudo paralelo, quando os animais foram inoculados pela via IN com o recombinante, aos 30 dias pós-inoculação, os animais também apresentaram títulos entre 2 e 8 (SANTOS et al., 2010; dados não publicados). Após o desafio, os animais vacinados apresentaram uma resposta secundária de grande magnitude, detectada inicialmente aos 14 dias pd, com títulos de até 256. Em contraste, os animais não-vacinados, apresentaram uma resposta inferior, com títulos de anticorpos entre 2 e 128. A propriedade de marcador antigênico do recombinante foi demonstrada pelo teste de ELISA anti-BoHV-1 gE, em que nenhum animal vacinado desenvolveu anticorpos anti-gE aos 42 dias pós-vacinação (dia do desafio). Aos 14 e 30 dias pd todos os animais apresentaram anticorpos anti-gE, quando testados pelo teste de ELISA. Estes resultados indicam que o recombinante induz uma resposta sorológica capaz de se diferenciável da infecção natural pelo uso de um teste sorológico específico.

Utilizando o mesmo vírus recombinante em uma vacina inativada em bovinos, BRUM (2009) obteve títulos de anticorpos comparáveis aos obtidos com a utilização da cepa parental. Assim pode-se inferir que, a deleção nos genes da gE e da TK não afetou negativamente a imunogenicidade do vírus. No presente trabalho, embora os títulos de anticorpos presentes no dia do desafio fossem baixos, houve proteção clínica e os animais

apresentaram uma resposta anamnésica aos 14 dias após o desafio, indicando que os animais estavam adequadamente imunizados.

A imunização com o recombinante conferiu proteção aos animais vacinados frente ao desafio com os isolados virulentos de BoHV-5. Ainda que a replicação e excreção viral não tenham sido inibidas pela vacinação, os animais vacinados excretaram vírus por menos tempo e em títulos inferiores aos animais controles (Tabela 1/Figura 1). Outros trabalhos utilizando vacinas compostas por mutantes de BoHV-1 com deleções nos genes da gE e/ou TK também demonstraram uma redução no tempo e na quantidade de vírus excretado no período pós-desafio (VAN ENGELBURG et al., 1994; KAASHOEK et al., 1996). A proteção clínica também foi satisfatória: os animais vacinados permaneceram saudáveis durante o experimento, enquanto que os controle desenvolveram doença neurológica severa e foram eutanasiados. O presente trabalho parece ser o único ao demonstrar proteção homóloga (BoHV-5 versus BoHV-5), uma vez que, outros trabalhos demonstraram proteção heteróloga (BoHV-1 x BoHV-5), e a proteção conferida foi apenas parcial. (CASCIO et al., 1999; SPILKI et al., 2004; DEL MEDICO ZAJAC et al., 2006; SILVA et al., 2006).

Nos grupos desafiados com o BoHV-1, os animais vacinados permaneceram saudáveis, enquanto que os animais controle (Cont/BoHV-1) desenvolveram apenas sinais leves da infecção respiratória. Assim, não foi possível avaliar se houve a proteção clínica heteróloga. Entretanto, a redução da excreção do BoHV-1 no grupo vacinado, aliada com a resposta anamnésica produzida após o desafio indica que ocorreu neutralização cruzada, a exemplo do que já havia sido demonstrado (DEL MEDICO ZAJAC et al., 2006). A reatividade sorológica cruzada entre BoHV-1 e BoHV-5 também foi demonstrada em outros estudos vacinais (BRUM, 2009).

Em resumo, os resultados deste trabalho demonstram que o recombinante BoHV-5 gE/TK Δ é avirulento para bezerros após administração IM. O recombinante não é excretado e

não induz sinais clínicos após a vacinação. O vírus recombinante também apresentou uma boa imunogenicidade, demonstrada pela forte resposta anamnésica após a vacinação e o desafio. A vacinação também provocou uma redução nos títulos virais excretados após o desafio e, principalmente, conferiu proteção aos animais desafiados com o BoHV-5. Assim, pode-se concluir que o vírus recombinante se constitui em um candidato potencial para uso em formulações de vacinas vivas diferenciais.

FONTES DE AQUISIÇÃO

^aCultilab, Campinas, SP, Brasil.

^bGibco-BRL, Rockville, MD, USA.

^cIDDEX One IDDEX Dr, Westbrook, Maine, USA.

^dASSISTAT versão 7.5 beta (2010) <http://www.assistat.com>

COMUNICAÇÃO PESSOAL

FLORES, E. F. Comunicação pessoal. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, UFSM, Santa Maria, RS. E-mail: eduardo@smail.ufsm.br.

COMITÊ DE ÉTICA E BEM ESTAR

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas do e aprovados pelo Comitê de Ética e Bem Estar Animal da UFSM, sob protocolo nº 23081.010078/2008-41.

REFERÊNCIAS

ACKERMANN, M.; ENGELS, M. Pro and contra IBR-eradication. **Veterinary Microbiology**, v.113, n.3-4, p.293-302, 2006.

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

BRUM, M.C.S. **Produção e caracterização de cepas recombinantes do herpesvírus bovino tipo 5 defectivas na enzima timidina quinase e glicoproteína E**. 2009. Tese de doutorado – Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria.

CARRILLO, B.J. et al. Meningoencephalitis caused by IBR virus in calves in Argentina. **Zentralbl Veterinarmed B**, v.30, p.327-332, 1983.

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

CHOWDHURY, S.I. et al. Neuropathology of bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) meningoencephalitis in a rabbit seizure model. **Journal of Comparative Pathology**, v.117, n.4, p.295-310, 1997.

D'ARCE, R.C.F. et al. Restriction endonuclease and monoclonal antibody analysis of Brazilian isolates of bovine herpesviruses types 1 and 5. **Veterinary Microbiology**, v.88, n.4, p.315-324, 2002.

DEL MÉDICO ZAJAC, M.P. et al. BHV-1 vaccine induces cross protection against BHV-5 disease in cattle. **Research in Veterinary Science**, v.81, n.3, p.327-334, 2006.

ENGELS, M.; ACKERMANN, M. Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. **Veterinary Microbiology**, v.121, n.1-2, p.3-15, 1996.

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

KAASHOEK, M.J. et al. Virulence and immunogenicity in calves of thymidine kinase and glycoprotein E-negative bovine herpesvirus 1 mutants. **Veterinary Microbiology**, v.48, n.1-2, p.143-153, 1996.

MUYLKENS, B. et al. Biological characterization of bovine herpesvirus 1 recombinants possessing the vaccine glycoprotein E negative phenotype. **Veterinary Microbiology**, v.113, n.3-4, p.283-291, 2006.

REED, L.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.18, p.493-494, 1938.

RISSI, R.D. et al. Meningoencefalite por herpesvírus bovino tipo 5. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.27, n.7, p.251-260, 2007.

ROIZMAN, B. et al. The family *Herpesviridae*: an update. **Archives of Virology**, v.123, n.3-4, p.25, 1992.

SALVADOR, S. C. et al. Meningoencefalite em bovinos causada por herpesvírus bovino-5 no Mato Grosso do Sul e São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.18, n.1, p.76-83, 1998.

SCHWYZER, M.; ACKERMANN, M. Molecular virology of ruminant herpesviruses. **Veterinary Microbiology**, v.53, n.1-2, p.17-29, 1996.

SPIPKI, F.R. et al. Partial protection induced by a BHV-1 recombinant vaccine against challenge with BHV-5. **Annals New York Academy of Sciences**, v.1026, p.240-250, 2004.

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

SILVA, L.F. et al. Imunogenicidade de vacinas comerciais inativadas contra o herpesvírus bovino tipo 1, **Ciência Rural**, v.37, n.5, p.1471-1474, 2007a.

SILVA, M.S. et al. Identificação e diferenciação de herpesvírus bovino tipos 1 e 5 isolados de amostras clínicas no Centro-Sul do Brasil, Argentina e Uruguai (1987-2006). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.27, n.10, p.403-408, 2007b.

SILVA, S.C. et al. A bovine herpesvirus 5 recombinant defective in the thymidine kinase (TK) gene and a double mutant lacking TK and the glycoprotein E gene are fully attenuated for rabbits. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.43, n.2, p. 150-159, 2010.

THURSFIELD, M. Serological Epidemiology. In:_____. **Veterinary Epidemiology**. Bourough Green, Sevenoaks, Kent, England: Butterworth & Co. (Publishers) Ltd, 1986. Cao- .16, p.176.

VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S. Rationale and perspectives on the success of vaccination against bovine herpesvirus-1. **Veterinary Microbiology**, v.113, n.3-4, p.275-282, 2006.

VAN ENGELBURG, F.A.C.A glycoprotein E deletion mutant of bovine herpesvirus 1 is avirulent in calves. **Journal of General Virology**, v.75, p.2311-2318, 1994.

VAN OIRSCHOT, J.T. et al. The use of marker vaccines in eradication of herpesviruses. **Journal of Biotechnology**, v.44, n.1-3, p.75-81, 1996.

Tabela 1. Achados virológicos e sorológicos durante a fase aguda em bezerros vacinados com o herpesvírus bovino tipo 5 recombinante, com deleções nos genes da glicoproteína E (gE) e enzima timidina quinase (TK) (BoHV-5gE/TK Δ) e posteriormente desafiados com isolados virulentos de herpesvírus bovino tipo 5 e 1 (BoHV-5 e 1).

Grupo/ animais	Pós-vacinação (pv)				Pós-desafio (pd)				
	Sorologia				Excreção viral		Sorologia		
	21 dias pv	42 dias pv		Duração (Dias)	Título ^b Máx Log ₁₀ DICC ₅₀ /ml	14 dias pd	30 dias pd		
	SN	SN	ELISA gE ^a			SN	SN	ELISA gE	
Desafio BoHV-5									
Não vacinados (Cont/BoHV-5)	1	<2	<2	-	9	7,8	128	nt ^c	nt ^c
	2	<2	<2	-	14	6,9	64	nt	nt
	3	<2	<2	-	12	7,1	16	nt	nt
	4	<2	<2	-	10	7,5	32	nt	nt
				\bar{x} 11,2					
Vacinados (Vac/BoHV-5)	5	4	8	-	9	7,6	256	256	+
	6	4	2	-	9	6,3	256	128	+
	7	4	2	-	12	7,6	256	128	+
	8	4	2	-	9	5,8	256	128	+
	9	4	4	-	9	7,8	256	128	+
				\bar{x} 9,6					
Desafio BoHV-1									
Não vacinados (Cont/BoHV-1)	10	<2	<2	-	11	7,9	64	32	+
	11	<2	<2	-	11	7,8	4	2	+
	12	<2	<2	-	14	7,8	2	16	+
	13	<2	<2	-	9	6,9	2	32	+
				\bar{x} 11,2					
Vacinados (Vac/BoHV-5)	14	2	2	-	10	7,7	256	128	+
	15	2	2	-	9	7,1	256	64	+
	16	4	4	-	10	7,1	256	256	+
	17	4	2	-	9	7,6	256	256	+
				\bar{x} 9,5					

^a Teste comercial anti-BoHV-1 gE ELISA.

^b Título viral expresso em Log₁₀ DICC₅₀/ml.

^c Amostras não testadas na respectiva data.

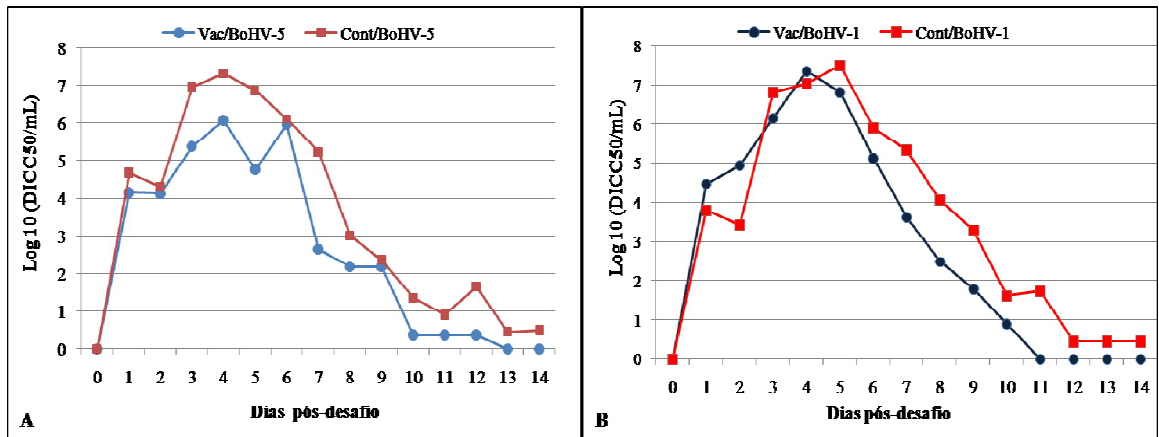


Figura 1. Excreção viral nas secreções nasais após o desafio. As médias diárias dos títulos virais estão expressas em \log_{10} DICC₅₀/ml (Doses infectantes para 50 % dos cultivos celulares). A) Média da excreção viral nasal dos animais vacinados com o recombinante (Vac/BoHV-5) e grupo controle (Cont/BoHV-5) desafiados com isolados virulentos de BoHV-5. B) Média da excreção viral nos animais do grupo Vac/BoHV-1 e Cont/BoHV1 desafiados com isolados de BoHV-1.

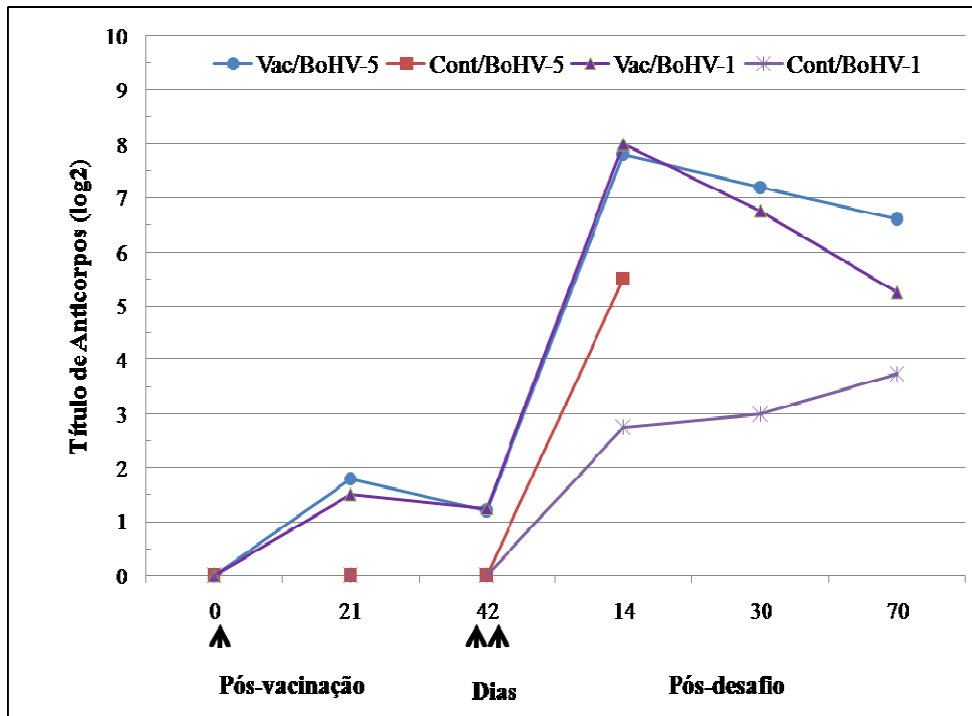


Figura 2. Títulos de anticorpos neutralizantes contra o herpesvírus bovino tipo 5 e 1 (BoHV-5 e BoHV-1) após a vacinação com o recombinante de herpesvírus tipo 5 com deleções nos genes da glicoproteína e (gE) e enzima timidina quinase (TK) (BoHV-5 gE/TKΔ). Os animais foram desafiados com isolados de BoHV-5 ou BoHV-1. Uma seta indica o momento da vacinação (dia 0), duas setas indicam o momento do desafio (dia 42 pv). Os títulos de anticorpos neutralizantes estão expressos em Títulos médios geométricos (GMT).

5. CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho permitem concluir que:

- O recombinante BoHV-5 gE/TKΔ é atenuado e imunogênico para bezerros, induz anticorpos neutralizantes com amplo espectro de reatividade sorológica para BoHV-1 e BoHV-5.

- O recombinante induz resposta sorológica diferencial da resposta à infecção pelo uso de um ELISA anti-BoHV-1 gE.

- A vacinação com o recombinante conferiu proteção homóloga reduzindo o tempo, quantidade viral excretada e, ausência da manifestação dos sinais clínicos.

- O recombinante BoHV-5 gE/TKΔ é um candidato potencial para uso em formulações de vacinas vivas diferenciais.

5. REFERÊNCIAS

ACKERMANN, M.; ENGELS, M. Pro and contra IBR-eradication. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 113, n. 3-4, p. 293-302, Mar. 2006.

AL-MUBARAK, A. et al. A glycine-rich bovine herpesvirus 5 (BHV-5) gE-specific epitope within the ectodomain is important for BHV-5 neurovirulence. **Journal of Virology**, United States, v. 78, n. 9, p. 4806-4816, May. 2004.

BRUM, M. C. S. **Produção e caracterização de cepas recombinantes do herpesvírus bovino tipo 5 defectivas na enzima timidina quinase e glicoproteína E**. 2009. 88f. Tese de doutorado (Doutorado em Medicina Veterinária) – Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, 2009.

_____. et al. Immunogenicity of an inactivated bovine herpesvirus type 5 strain defective in thymidine kinase and glycoprotein E. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.30, n. 1, p. 57-62, jan. 2010.

CARRILLO, B. J. et al. Meningoencephalitis caused by IBR virus in calves in Argentina. **Zentralbl Veterinarmed Reihe B**, Germany, v. 30, n. 5, p. 327-332, Jun. 1983.

CHEN, S. H.; PEARSON, A.; COEN, D. M. Failure of thymidine kinase-negative herpes simplex virus to reactivate from latency following efficient establishment. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 78, n.1, p. 520-523, Jan. 2004.

CHOWDHURY, S. I. et al. Neuropathology of bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) meningoencephalitis in a rabbit seizure model. **Journal of Comparative Pathology**, Liverpool, v. 117, n. 4, p. 295-310, Nov. 1997.

_____. et al. Neuropathology of bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) meningo-encephalitis in a rabbit seizure model. **Journal of Comparative Pathology**, Liverpool, v. 117, n. 4, p. 295-310, Nov. 1997.

_____. et al. Bovine herpesvirus 5 glycoprotein E is important for neuroinvasiveness and neurovirulence in the olfactory pathway of the rabbit. **Journal of Virology**, United States, v. 74, n. 5, p. 2094-2106, Mar. 2000.

COLODEL, E. M. et al. Meningoencefalite necrosante em bovinos causada por herpesvírus bovino no estado de Mato Grosso, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, p. 293-298, mar./abr. 2002.

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

DIEL, D. G. et al. O Herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) pode utilizar as rotas olfatória ou trigeminal para invadir o sistema nervoso central de coelhos, dependendo da via de inoculação. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 3, p. 164-170, jul./set. 2005.

ELIAS, F.; SCHILD, A. L.; RIET-CORREA, F. Meningoencefalite e encefalomalacia por herpesvírus bovino-5: distribuição das lesões no sistema nervoso central de bovinos naturalmente infectados. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 24, n.3, p. 123-131, jan./mar. 2004.

ENGELS, M.; ACKERMANN, M. Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 121, n. 1-2, p. 3-15, Nov. 1996.

FERRARI, M. et al. A comparative study of pseudorabies virus (PRV) strains with defects in thymidine kinase and glycoprotein genes. **Journal of Comparative Pathology**, Liverpool, v. 123, n. 2-3, p. 152-163, Aug./Oct. 2000.

JONES, C.; CHOWDHURY, S. A. 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. **Animal Health Research Reviews**, England, v. 8, n. 2, p. 187-205, Oct. 2007.

KAASHOEK, M. J. et al. Virulence and immunogenicity in calves of thymidine kinase- and glycoprotein E-negative bovine herpesvirus 1 mutants. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 48, n. 1-2, p. 143-153. Jan. 1996

_____. et al. Virulence, immunogenicity and reactivation of bovine herpesvirus 1 mutants with a deletion in the gC, gG, gI, gE, or in both the gI and gE gene. **Vaccine**, Amsterdam, v. 16, n. 8, p. 802-809, May. 1998.

LEE, B. J. et al. Spread of bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) in the rabbit brain after intranasal inoculation. **Journal of Neurovirology**, London, v. 5, n. 5, p. 474-484, Oct. 1999.

METTENLEITER, T. C. Pathogenesis of neurotropic herpesviruses: role of viral glycoproteins in neuroinvasion and transneuronal spread. **Virus Research**, Amsterdam, v. 92, n. 2, p. 197-206, Apr. 2003.

MITTAL, S. K., FIELD, H. J. Analysis of the bovine herpesvirus type 1 thymidine kinase (TK) gene from wild-type virus and TK-deficient mutants. **J Gen Virol**, Reading, v. 70, n. 4, p.901-918, Apr. 1989.

RISSI, R. D. et al. Epidemiologia, sinais clínicos e distribuição das lesões encefálicas em bovinos afetados por meningoencefalite por herpesvirus bovino-5. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 26, n. 2, p. 123-132, abr./jun. 2006.

_____. et al. Meningoencefalite por herpesvirus bovino tipo 5. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 7, p. 251-260, jul. 2007.

ROIZMANN, B. et al. The family *Herpesviridae*: an update. The herpesvirus Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. **Archives of Virology**, Wien, New York, v. 123, n. 3-4, p. 425-429, Sept. 1992.

SALVADOR, S. C. et al. Meningoencefalite em bovinos causada por herpesvirus bovino-5 no Mato Grosso do Sul e São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 18, n.2 p. 76-83, abr./jun. 1998.

SCHWYZER, M.; ACKERMANN, M. Molecular virology of ruminant herpesviruses. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 53, n. 1-2, p. 17-29, Nov. 1996.

SILVA, A. M. D. et al. Pathogenesis of meningoencephalitis in rabbits by bovine herpesvirus type-5 (BHV-5). **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 30, n.1, p. 22-31, jan. 1999.

SILVA, M. S. et al. Identificação e diferenciação de herpesvirus bovino tipos 1 e 5 isolados de amostras clínicas no Centro-Sul do Brasil, Argentina e Uruguai (1987-2006). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 10, p. 403-408, oct. 2007.

SILVA, S. C. et al. A bovine herpesvirus 5 recombinant defective in the thymidine kinase (TK) gene and a double mutant lacking TK and the glycoprotein E gene are fully attenuated for rabbits. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 43, n. 2, p. 150-159, Feb. 2010.

VAN OIRSCHOT, J. T. et al. Advances in the development and evaluation of bovine herpesvirus 1 vaccines. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 53, n. 1-2, p. 43-54, Nov. 1996a.

_____. The use of marker vaccines in eradication of herpesviruses. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 44, n. 1-3, p. 75-81, Jan. 1996b

_____. Diva vaccines that reduce virus transmission. **Journal Biotechnology**, Amsterdam, v. 73, n. 2-3, p. 195-205, Aug. 1999.

VAN DRUNEN LITTLE-VAN DEN HURK, S. Rationale and perspectives on the success of vaccination against bovine herpesvirus-1. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 113, n. 3-4, p. 275-282, Mar. 2006

_____. Cell-mediate immune responses induced by BHV-1: rational vaccine design. **Expert Review Vaccines**, London, v. 6, n. 3, p. 369-80, Jun. 2007.

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