

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

**IMUNIZAÇÃO GENITAL DE BEZERRAS COM UMA
CEPA RECOMBINANTE DO HERPESVÍRUS BOVINO
TIPO 1 DEFECTIVA NA GLICOPROTEÍNA E**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Marcelo Weiss

**Santa Maria, RS, Brasil
2009**

**IMUNIZAÇÃO GENITAL DE BEZERRAS COM UMA CEPA
RECOMBINANTE DO HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 1
DEFECTIVA NA GLICOPROTEÍNA E**

por

Marcelo Weiss

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 obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária

Orientador: Prof. Eduardo Furtado Flores, PhD

Santa Maria, RS, Brasil
2009

Weiss, Marcelo, 1979-

W431i

Imunização genital de bezerras com uma cepa recombinante do herpesvírus bovino tipo 1 defectiva na glicoproteína E / por Marcelo Weiss ; orientador Eduardo Furtado Flores. - Santa Maria, 2009.

41 f. ; il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2009.

1. Medicina veterinária 2. Herpesvírus bovino 3. BoHV-1-2 4. Vulvovaginite 5. Vacina 6. Proteção vacinal I. Flores, Eduardo Furtado, orient. II. Título

CDU: 619:636.2

Ficha catalográfica elaborada por
Luiz Marchiotti Fernandes – CRB 10/1160
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Rurais/UFSM

**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

**IMUNIZAÇÃO GENITAL DE BEZERRAS COM UMA CEPA
RECOMBINANTE DO HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 1 DEFECTIVA
NA GLICOPROTEÍNA E**

elaborada por
Marcelo Weiss

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

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Eduardo Furtado Flores, PhD
(Presidente/Orientador)

Fernanda Silveira Flores Vogel, Dra. (UFSM)

Luizinho Caron, Dr. (IRFA)

Santa Maria, 3 de março de 2009.

Agradecimentos

Principalmente aos meus pais, pelo amor, compreensão e esforço que fizeram para realizar este sonho. Sem vocês nada seria possível, sonhado ou realizado.

Minhas irmãs, parentes e amigos, pelo carinho e amizade, tanto nos momentos bons como nos momentos difíceis. Em especial àqueles que foram responsáveis diretos na tomada de algumas decisões fundamentais, que culminaram com esta conquista. Muito obrigado de coração.

Aos professores Eduardo e Rudi, que sempre foram exemplos de dedicação à profissão e que sempre estiveram dispostos a compartilhar seus conhecimentos. Agradeço ainda a oportunidade e confiança que tiveram em mim para fazer parte do Setor de Virologia.

Aos meus colegas de mestrado, pelos momentos de descontração e pelo conhecimento compartilhado.

Aos meus colegas de laboratório, tanto da pós-graduação, quanto estagiários de iniciação científica, pelo conhecimento, recepção, além dos momentos de descontração e confraternização ao longo desses dois anos e pouco. Meu sincero muito obrigado, tendo a certeza de que cada um de vocês contribuiu com o que sou hoje.

Aos professores do PPGMV, pelo conhecimento repassado, contribuindo para a minha formação.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa e suporte financeiro.

A Universidade Federal de Santa Maria, que oportunizou toda a minha formação acadêmica e por ter se tornado a minha segunda casa.

Resumo

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

IMUNIZAÇÃO GENITAL DE BEZERRAS COM UMA CEPA RECOMBINANTE DO HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 1 DEFECTIVA NA GLICOPROTEÍNA E

Autor: Marcelo Weiss
Orientador: Eduardo Furtado Flores
Santa Maria, 3 de março de 2009.

O presente estudo relata a avaliação da atenuação e proteção conferida pela vacinação intravaginal de bezerras com uma cepa recombinante do herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) defectiva na glicoproteína E (SV265gE-). Um grupo de seis bezerras foi vacinado com a cepa SV265gE- na submucosa da vulva (grupo IV; $10^{6,9}$ TCID₅₀); quatro bezerras foram vacinadas pela via intramuscular (grupo IM; $10^{7,6}$ TCID₅₀) e quatro bezerras permaneceram como controles não-vacinadas. As bezerras vacinadas pela via IV apresentaram edema e hiperemia leve e transitório na vulva; excretaram pequenas quantidades de vírus nas secreções, mas não transmitiram o vírus a uma bezerra sentinela mantida em contato. A tentativa de reativar o vírus vacinal em duas bezerras vacinadas IV pela administração intravenosa de dexametasona (0.5 mg.kg^{-1}) no dia 65 pós-vacinação (pv) não resultou em excreção viral, recrudescência clínica ou soroconversão. No dia 65 pv, as bezerras vacinadas e as controles foram desafiadas pela inoculação genital da cepa SV-56/90 do BoHV-1.2 ($10^{7,4}$ TCID₅₀/animal). Após o desafio, o vírus foi detectado nas secreções das bezerras controles por 8 a 9 dias (\bar{x} 8,2 dias); nas bezerras do grupo IM por 5 a 8 dias (\bar{x} 6,2) e nas do grupo IV por 5 a 6 dias (\bar{x} 5,2 dias). As bezerras controle desenvolveram vulvovaginite moderada (2/4) ou severa (2/4) com duração média de 11,2 dias (9–14). A enfermidade caracterizou-se por edema vulvar, congestão vulvovestibular, formação de pequenas vesículas, pústulas, que progrediram até coalescerem, erosões, placas fibrinonecroticas recobertas com exsudato fibrinopurulento. As bezerras do grupo IM desenvolveram vulvovaginite leve (1/3) ou moderada (3/4), com duração média de 11,5 dias (10–13 dias); enquanto as bezerras do grupo IV desenvolveram sinais genitais leves e transitórios (3/4) ou moderados (1/4), com duração média de 5,5 dias (4–8). A avaliação clínica pós-desafio demonstrou que a vacinação pelas duas vias (IM e IV) conferiu proteção, mas a vacinação IV foi mais efetiva na redução do tempo de excreção viral e na redução da severidade e duração dos sinais clínicos. Assim, esses resultados demonstram que a cepa SV265gE- é suficientemente atenuada para vacinação IV em dose baixa, não é reativada pela administração de dexametasona e, principalmente, confere proteção adequada frente a desafio genital com uma dose alta de uma cepa heteróloga altamente virulenta. Portanto, essa estratégia de imunização pode ser considerada para a prevenção das perdas reprodutivas causadas pela infecção genital pelo BoHV-1.

Palavras-chave: herpesvírus bovino, BoHV-1.2, vulvovaginite, vacina, proteção vacinal.

Abstract

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

GENITAL IMMUNIZATION OF HEIFERS WITH A RECOMBINANT STRAIN OF BOVINE HERPESVIRUS TYPE 1 DEFECTIVE IN THE GLYCOPROTEIN E

Author: Marcelo Weiss
Adviser: Eduardo Furtado Flores
Santa Maria, March, 3rd, 2009.

We herein report an evaluation of the attenuation and protection conferred by genital vaccination of heifers with a bovine herpesvirus type 1 strain (BoHV-1) defective in the glycoprotein E (SV265gE-). A group of six seronegative heifers was vaccinated with SV265gE- in the submucosa of the vulva (group IV; $10^{6.9}$ TCID₅₀); four heifers were vaccinated intramuscularly (group IM; $10^{7.6}$ TCID₅₀) and four heifers remained as non-vaccinated controls. Heifers vaccinated IV developed mild and transient local edema and hyperemia and shed low amounts of virus for a few days after vaccination, yet a sentinel heifer maintained in close contact did not seroconvert. Attempts to reactivate the vaccine virus in two IV vaccinated heifers by intravenous administration of dexamethasone (0.5 mg.kg^{-1}) at day 65 post-vaccination (pv) failed since no virus shedding, recrudescence of genital signs or seroconversion were observed. At day 65 pv, all vaccinated and control heifers were challenged by genital inoculation of a highly virulent BoHV-1.2 isolate (SV-56/90, $10^{7.4}$ TCID₅₀/animal). After challenge, virus shedding was detected in genital secretions of control animals for 8.2 days (8–9 days); in the IM group for 6.2 days (5–8 days) and during 5.2 days (5–6 days) in the IV group. Control non-vaccinated heifers developed moderate (2/4) or severe (2/4) vulvovaginitis lasting 9 to 14 days (\bar{x} 11.2 days). The disease was characterized by vulvar edema, vulvovestibular congestion, small vesicles progressing to coalescence and erosions, fibrinonecrotic plaques and fibrinopurulent exudate. IM vaccinated heifers developed mild (1/3) or moderate (3/4) genital lesions, lasting 10 to 13 days (\bar{x} 11.5 days); and IV vaccinated heifers developed mild and transient (3/4) or mild to moderate genital signs (1/4), lasting 4 to 8 days (\bar{x} 5.5 days). Clinical examination of the animals after challenge revealed that vaccination by both routes conferred some degree of protection, yet IV vaccination was clearly more effective in reducing the duration of virus shedding, the severity and duration of clinical disease. Taken together, these results demonstrate that SV265gE- is sufficiently attenuated upon IV vaccination in a low-titer dosis, is not reactivated after corticosteroid treatment and lastly, and more importantly, confers local protection upon challenge with a high titer of a virulent heterologous BoHV-1 isolate. Thus, this immunization strategy may be considered for the prevention of BoHV-1-associated genital disease in the field.

Key words: bovine herpesvirus, BoHV-1.2, vulvovaginitis, genital infection, vaccine.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 – Escore clínico médio dos grupos vacinados com uma cepa recombinante do BoHV-1.2 defectiva na glicoproteína E e grupo controle não-vacinado, após o desafio com uma amostra viral heteróloga do BoHV-1.2.....36
- FIGURA 2 – Títulos virais médios em secreções vaginais de bezerras dos grupos vacinados com uma cepa recombinante do BoHV-1.2 defectiva na glicoproteína E e grupo controle não-vacinado, após o desafio com uma amostra viral heteróloga do BoHV-1.2.....37
- FIGURA 3 – Títulos médios de anticorpos neutralizantes no soro de bezerras vacinadas com uma cepa recombinante do BoHV-1.2 defectiva na glicoproteína E e grupo controle não-vacinado, após o desafio com uma amostra viral heteróloga do BoHV-1.2.....38

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – Resposta sorológica pós-vacinação (pré-desafio), excreção viral e achados clínicos pós-desafio em bezerras imunizadas com uma cepa recombinante do BoHV-1.2 defectiva na glicoproteína E e desafiadas com uma amostra viral heteróloga.	35
---	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 CAPÍTULO 1 - Imunização genital de bezerras com uma cepa recombinante do herpesvírus bovino tipo 1 defectiva na glicoproteína E confere proteção frente a desafio com amostra viral heteróloga.....	14
Abstract.....	15
Resumo.....	16
Introdução.....	17
Material e métodos.....	20
Resultados.....	22
Discussão.....	26
Referências	30
3 REFERÊNCIAS.....	39

1. INTRODUÇÃO

O herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) é um vírus DNA pertencente à família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*, gênero *Varicellovirus* (ROIZMAN, 1992). A infecção de bovinos soronegativos pelo BoHV-1 tem sido associada com doença respiratória (rinotraqueíte infecciosa bovina - IBR), vulvovaginite/balanopostite pustular infecciosa (IPV/IBP), infertilidade temporária e abortos (KAHRS, 2001). Existem também relatos da associação do BoHV-1 com doença neurológica, porém essa doença tem sido mais freqüentemente atribuída ao BoHV-5 (SILVA et al., 2007c). Pela sua relevância sanitária e econômica, o BoHV-1 é considerado um dos principais patógenos de rebanhos bovinos de leite e corte (KAHRS, 2001).

Os isolados de campo do BoHV-1 podem ser diferenciados entre si com base em padrões de restrição enzimática do genoma e pela reatividade com determinados anticorpos monoclonais (METZLER et al., 1985; D'ARCE et al., 2002; SOUZA et al., 2002). De acordo com estas análises, os isolados de doença respiratória têm sido classificados como BoHV-1 subtipo 1 (BoHV-1.1), e os recuperados de doença genital são classificados como BoHV-1.2 (METZLER et al., 1985). No entanto, essa classificação não é mutuamente exclusiva, pois isolados do subtipo BoHV-1.2 podem causar doença respiratória (SPILKI et al., 2004), e isolados de BoHV-1.1 tem sido esporadicamente isolados de casos de doença genital (MILLER; VAN DER MAATEN, 1984).

Experimentos com o objetivo de reproduzir a enfermidade pelo BoHV-1.2 já foram realizados tanto em touros quanto em bezerras (VOGEL et al., 2004; HENZEL et al., 2008). Além de estudar os aspectos clínicos e virológicos, estes estudos tiveram como objetivo investigar os sítios de latência do BoHV-1.2 e validar a utilização da cepa SV-56/90, isolada de um surto de balanopostite em touros (WEIBLEN et al., 1992), para o desafio em testes de proteção vacinal.

As vacinas de uso rotineiro para o BoHV-1 (atenuadas ou inativadas) geralmente reduzem, em níveis variáveis, o desenvolvimento de sinais clínicos frente a desafio (VAN OIRSCHOT, 1999). Uma restrição ao uso de vacinas atenuadas é a possibilidade do estabelecimento da infecção latente pelo vírus vacinal nos animais vacinados (JONES; CHOWDHURY, 2008). As vacinas tradicionais de uso parenteral, inativadas e atenuadas, podem induzir uma resposta sistêmica consistente, porém geralmente não conferem boa proteção contra a doença genital (VAN OIRSCHOT, 1999). A imunidade contra as infecções

genitais parece estar na dependência de anticorpos secretados nos sítios de replicação viral e da resposta local mediada por células (TIKOO et al., 1995). Nesse sentido, vacinas de aplicação intravaginal ou intraprepucial podem induzir imunidade local e conferir boa proteção frente a infecções posteriores (VAN OIRSCHOT, 1999).

Alguns estudos com o objetivo de avaliar a eficácia de vacinas contra o BoHV-1 já foram realizados no Brasil. VOGEL et al. (2002) observaram que após três aplicações de uma vacina inativada, os animais desenvolveram títulos variáveis de anticorpos neutralizantes, sendo que alguns animais não soroconverteram. SILVA et al. (2007a, b) demonstraram que as vacinas inativadas contra o BoHV-1 disponíveis no comércio, em geral, induzem títulos baixos a moderados de anticorpos, títulos esses muito abaixo do considerados protetivos (POSPISIL et al., 1996).

Outra restrição ao uso das vacinas tradicionais em programas de controle e erradicação do BoHV-1 é a impossibilidade de diferenciação sorológica entre animais vacinados e infectados naturalmente (VAN OIRSCHOT, 1999). Vários países europeus, como a Áustria, Dinamarca, Suécia, Bélgica e Países Baixos implementaram programas de erradicação do BoHV-1 com base em vacinas com marcadores antigênicos (ACKERMANN; ENGELS, 2006). Seguindo essa tendência, vários estudos têm sido realizados com o objetivo de avaliar a eficácia e segurança de vacinas recombinantes, obtidas principalmente pela deleção de glicoproteínas de superfície viral por manipulação genética. As vacinas geneticamente manipuladas geralmente demonstram níveis variáveis de atenuação e a resposta sorológica pode ser diferenciada da resposta induzida pela infecção natural (VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, 2006). Diversos recombinantes virais defectivos nas glicoproteínas C-, gE-, gG- e proteína Us9 (FLORES et al., 1993; KAASHOEK; VAN OIRSCHOT, 1996; KAASHOEK et al., 1998; CHOWDHURY et al., 1999; BUTCHI et al., 2007), timidina quinase (TK) (KIT et al., 1986; CHOWDHURY, 1996; KAASHOEK et al., 1996a, b) têm sido construídos e testados como vacina. Recombinantes virais que apresentam deleções na gE e Us9 parecem ser mais seguros, pois não são excretados em episódios de reativação viral e apresentam indícios de atenuação (KAASHOEK et al., 1996a, b; BUTCHI et al., 2007; LIU et al., 2008). LIU et al. (2008) demonstraram que gE participa no transporte viral anterógrado, o que explica a ausência de excreção viral em episódios de reativação. Considerando-se estas características, mutantes que contenham estas deleções se constituem em potenciais candidatos para o uso em vacinas (VAN OIRSCHOT, 1999).

FRANCO et al. (2002b) construíram uma cepa do BoHV-1 contendo a deleção na gE (SV265gE-). A inoculação desta cepa em bovinos, pela via intranasal, não resultou em

sinais clínicos importantes e, principalmente, conferiu proteção aos animais frente ao desafio com o vírus parental (FRANCO et al., 2002a). SPILKI et al. (2005) demonstraram que esta cepa é também atenuada para fêmeas gestantes, não produzindo perdas fetais após inoculação parenteral.

O presente trabalho foi motivado pela necessidade de se obter vacinas mais seguras e eficientes contra as infecções pelo BoHV-1. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a cepa recombinante SV265gE- em relação à: i. Atenuação após administração intravaginal (IV) em bezerras; ii. Imunogenicidade e proteção conferida pela vacinação IV frente a desafio com uma amostra viral heteróloga.

2. CAPÍTULO 1

Imunização genital de bezerras com uma cepa recombinante do herpesvírus bovino tipo 1 defectiva na glicoproteína E confere proteção frente a desafio com amostra viral heteróloga

Genital immunization of heifers with a recombinant strain of bovine herpesvirus type 1 defective in the glycoprotein E confers protection against the viral strain heterologous challenge

Marcelo Weiss^a, Fernanda Silveira Flores Vogel^a, Mathias Martins^b, Rudi Weiblen^a, Paulo Michel Roehc^c e Eduardo Furtado Flores^{a*}.

(Artigo a ser submetido para publicação)

^a Setor de Virologia, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil.

^b Aluno de Graduação em Medicina Veterinária, Centro de Ciências Rurais, Setor de Virologia, Departamento de Medicina. Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil.

^c Laboratório de Virologia, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS & FEPAGRO Saúde Animal - Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), Eldorado do Sul, RS, Brasil.

* Autor para correspondência: Departamento de Medicina Veterinária Preventiva. Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS. Brazil. 97105-900. Phone: (011) 5555-3220-8055. Fax: (011) 5555- 3220-8034. E-mail: flores@ccr.ufsm.br.

ABSTRACT – Weiss M., Vogel F.S.F., Martins M., Weiblen R., Roehe P.M. & Flores E.F. 2009. [Genital immunization of heifers with a recombinant strain of bovine herpesvirus type 1 defective in the glycoprotein E confers protection against a heterologous virus challenge]. Imunização genital de bezerras com uma cepa recombinante do herpesvírus bovino tipo 1 defectiva na glicoproteína E confere proteção frente a desafio com amostra viral heteróloga. *Pesquisa Veterinária Brasileira* () - Setor de Virologia, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS, Brasil. 97105-900. flores@ccr.ufsm.br.

Venereal infection of seronegative cows with bovine herpesvirus type 1.2 (BoHV-1.2) frequently results in vulvovaginitis and transient infertility. Parenteral immunization with inactivated or modified live BoHV-1 vaccines often fails in conferring protection upon genital challenge. We herein report an evaluation of the attenuation and protection conferred by genital vaccination of heifers with a bovine herpesvirus type 1 strain (BoHV-1) defective in the glycoprotein E (SV265gE-). A group of six seronegative heifers was vaccinated with SV265gE- in the submucosa of the vulva (group IV; $10^{6.9}$ TCID₅₀); four heifers were vaccinated intramuscularly (group IM; $10^{7.6}$ TCID₅₀) and four heifers remained as non-vaccinated controls. Heifers vaccinated IV developed mild and transient local edema and hyperemia and shed low amounts of virus for a few days after vaccination, yet a sentinel heifer maintained in close contact did not seroconvert. Attempts to reactivate the vaccine virus in two IV vaccinated heifers by intravenous administration of dexamethasone (0.5 mg/kg) at day 65 post-vaccination (pv) failed since no virus shedding, recrudescence of genital signs or seroconversion were observed. At day 65 pv, all vaccinated and control heifers were challenged by genital inoculation of a highly virulent BoHV-1.2 isolate (SV-56/90, $10^{7.4}$ TCID₅₀/animal). After challenge, virus shedding was detected in genital secretions of control animals for 8.2 days (8–9 days); in the IM group for 6.2 days (5–8 days) and during 5.2 days (5–6 days) in the IV group. Control non-vaccinated heifers developed moderate (2/4) or severe (2/4) vulvovaginitis lasting 9 to 14 days (\bar{x} 11.2 days). The disease was characterized by vulvar edema, vulvovestibular congestion, small vesicles progressing to coalescence and erosions, fibrinonecrotic plaques and fibrinopurulent exudate. IM vaccinated heifers developed mild (1/3) or moderate (3/4) genital lesions, lasting 10 to 13 days (\bar{x} 11.5 days); and IV vaccinated heifers developed mild and transient (3/4) or mild to moderate genital signs (1/4), lasting 4 to 8 days (\bar{x} 5.5 days). Clinical examination of the animals after challenge revealed that vaccination by both routes conferred some degree of protection, yet IV vaccination was clearly more effective in reducing the duration of virus shedding, the

severity and duration of clinical disease. Taken together, these results demonstrate that SV265gE- is sufficiently attenuated upon IV vaccination in a low-titer dosis, is not reactivated after corticosteroid treatment and lastly, and more importantly, confers local protection upon challenge with a high titer of a virulent heterologous BoHV-1 isolate. Thus, this immunization strategy may be considered for the prevention of BoHV-1-associated genital disease in the field.

Key words: bovine herpesvirus, BoHV-1.2, vulvovaginitis, genital infection, vaccine.

RESUMO - A infecção genital de novilhas ou vacas soronegativas pelo herpesvírus bovino tipo 1.2 (BoHV-1.2) pode resultar em vulvovaginite e infertilidade temporária. As vacinas atenuadas ou inativadas administradas pela via parenteral freqüentemente conferem proteção incompleta frente a desafio pela via genital. O presente estudo relata a avaliação da atenuação e proteção conferida pela vacinação intravaginal de bezerras com uma cepa recombinante do herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) defectiva na glicoproteína E (SV265gE-). Um grupo de seis bezerras foi vacinado com a cepa SV265gE- na submucosa da vulva (grupo IV; $10^{6,9}$ TCID₅₀); quatro bezerras foram vacinadas pela via intramuscular (IM; $10^{7,6}$ TCID₅₀) e quatro bezerras permaneceram como controles não-vacinadas. As bezerras vacinadas pela via IV apresentaram edema e hiperemia leve e transitório na vulva; excretaram pequenas quantidades de vírus nas secreções, mas não transmitiram o vírus a uma bezerra sentinela mantida em contato. A tentativa de reativar o vírus vacinal em duas bezerras vacinadas IV pela administração intravenosa de dexametasona (0.5 mg/kg) no dia 65 pós-vacinação (pv) não resultou em excreção viral, recrudescência clínica ou soroconversão. No dia 65 pv, as bezerras vacinadas e as controles foram desafiadas pela inoculação genital da cepa SV-56/90 do BoHV-1.2 ($10^{7,4}$ TCID₅₀/animal). Após o desafio, o vírus foi detectado nas secreções das bezerras controles por 8 a 9 dias (\bar{x} 8,2 dias); nas bezerras do grupo IM por 5 a 8 dias (\bar{x} 6,2) e nas do grupo IV por 5 a 6 dias (\bar{x} 5,2 dias). As bezerras controle desenvolveram vulvovaginite moderada (2/4) ou severa (2/4) com duração média de 11,2 dias (9–14). A enfermidade caracterizou-se por edema vulvar, congestão vulvovestibular, formação de pequenas vesículas, pústulas, que progrediram até coalescerem, erosões, placas fibrinonecróticas recobertas com exsudato fibrinopurulento. As bezerras do grupo IM desenvolveram vulvovaginite leve (1/3) ou moderada (3/4), com duração média de 11,5 dias (10–13 dias); enquanto as bezerras do grupo IV desenvolveram sinais genitais leves e transitórios (3/4) ou moderados (1/4), com duração média de 5,5 dias (4–8). A avaliação

clínica pós-desafio demonstrou que a vacinação pelas duas vias (IM e IV) conferiu proteção, mas a vacinação IV foi mais efetiva na redução do tempo de excreção viral e na redução da severidade e duração dos sinais clínicos. Assim, esses resultados demonstram que a cepa SV265gE- é suficientemente atenuada para vacinação IV em dose baixa, não é reativada pela administração de dexametasona e, principalmente, confere proteção adequada frente a desafio genital com uma dose alta de uma cepa heteróloga altamente virulenta. Portanto, essa estratégia de imunização pode ser considerada para a prevenção das perdas reprodutivas causadas pela infecção genital pelo BoHV-1.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: herpesvírus bovino, BoHV-1.2, vulvovaginite, vacina, proteção vacinal.

INTRODUÇÃO

O herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) é um alfa herpesvírus, pertencente à família *Herpesviridae*, gênero *Varicellovirus* (Roizman 1992). A infecção pelo BoHV-1 possui distribuição mundial, com exceção de alguns países europeus que recentemente erradicaram a infecção (Van Oirschot 1999, Arkermann & Engel 2006). A infecção de bovinos pelo BoHV-1 pode resultar em doença respiratória (rinotraqueíte infecciosa bovina, IBR), conjuntivite, vulvovaginite (vulvovaginite pustular infecciosa, IPV), balanopostite (balanopostite pustular infecciosa, IPB), infertilidade, abortos e infecção multissistêmica fatal de neonatos (Kahrs 2001), além de meningoencefalite, doença que tem sido mais frequentemente atribuída ao BoHV-5 (Silva et al. 2007). Assim como outros alfa herpesvírus, o BoHV-1 possui a capacidade de estabelecer infecção latente em gânglios de nervos sensoriais (Homan & Easterday 1980, Vogel et al. 2003, Henzel et al. 2008), cuja reativação acompanhada de excreção viral contribui para a sua perpetuação na natureza (Rock 1994).

Amostras de campo do BoHV-1 isoladas de doença respiratória têm sido classificadas como BoHV-1.1, e os isolados de infecção genital como BoHV-1.2 com base em análise de restrição genômica (REA) e na reatividade com anticorpos monoclonais (AcMs) (Metzler et al. 1985, D'Arce et al. 2002). No entanto, a associação desses vírus com cada síndrome clínica parece não ser mutuamente exclusiva. Assim, bovinos inoculados pela via intranasal com um isolado de BoHV-1.2 desenvolveram doença respiratória (Spilki et al. 2004a), e bezerras inoculadas pela via vaginal com um isolado de BoHV-1.1 desenvolveram vulvovaginite (Miller & Van Der Maaten 1984). Da mesma forma, manifestações

respiratórias e genitais concomitantes têm sido descritas em surtos naturais de infecção pelo BoHV-1 (Pritchard et al. 1997).

Após a infecção ou inoculação do BoHV-1.2 no trato genital de fêmeas, o vírus replica na mucosa e estabelece infecção latente nos gânglios sacrais (Ackermann & Wyler 1984, Henzel et al. 2008) e também em linfonodos regionais (Henzel et al. 2008). Reativação esporádica da infecção latente com consequente re-excreção viral pode ocorrer de forma natural ou ser induzida pela administração de corticosteróides (Snowdon 1965, Sheffy & Davies 1972, Dennet et al. 1976, Henzel et al. 2008). A reativação induzida pela administração de dexametasona frequentemente cursa com excreção viral e recrudescência clínica (Henzel et al. 2008), ao contrário da reativação natural que geralmente cursa sem sinais clínicos evidentes (Snowdon 1965, Dennet et al. 1976).

A transmissão do BoHV-1 entre os animais ocorre principalmente por contato direto ou indireto, por secreções contaminadas. Na infecção genital, a transmissão ocorre por contato direto, pelo coito, ou de forma indireta, pelo sêmen ou instrumentos contaminados (Pastoret et al. 1984). A infecção genital pelo BoHV-1.2 em fêmeas susceptíveis tem sido associada com vulvovaginite, infertilidade temporária, altas taxas de retorno ao cio e, mais raramente, com reabsorção embrionária (Metzler et al. 1985). Abortos podem ser consequência da infecção respiratória, na qual o vírus atinge o útero e provoca mortalidade fetal (Kahrs 2001). A fase aguda da infecção apresenta um curso clínico de 4 a 7 dias, durante a qual os animais infectados excretam vírus em secreções genitais (Halfen & Vidor 2001). Excreção viral também ocorre em eventos de reativação da infecção latente, porém com uma menor magnitude e por um período menor de tempo (Vogel et al. 2004, Henzel et al. 2008). Não obstante, esta excreção aparentemente é suficiente para a disseminação e perpetuação do vírus nos rebanhos (Pastoret et al. 1984). A infecção genital de machos também resulta em perdas reprodutivas importantes, decorrentes da perda de libido, incapacidade temporária (ou permanente, em casos de aderências penianas) de realizar a monta, e de alterações na qualidade do sêmen (Saxegaard 1970, Huck et al. 1971).

A vacinação tem sido amplamente utilizada para minimizar as perdas associadas com a infecção pelo BoHV-1 e para reduzir a circulação de vírus nos rebanhos (Van Oirschot 1999, Kahrs 2001). Vacinas inativadas e com vírus atenuado podem conferir uma boa proteção da doença respiratória, porém geralmente não conferem boa proteção contra a doença genital (Van Oirschot 1999). A imunidade contra as infecções genitais parece depender de anticorpos secretados nos sítios de replicação viral, e também de resposta mediada por células (Tikoo et al. 1995). Nesse sentido, vacinas de aplicação intravaginal ou

intraprepuccial poderiam induzir proteção local e conferir boa proteção frente a infecções posteriores (Van Oirschot 1999).

O conceito de vacinas diferenciais (ou com marcadores antigênicos), que permitem a diferenciação entre animais vacinados e portadores da infecção latente, tem viabilizado a execução de programas de controle e erradicação da infecção pelo BoHV-1 em vários países europeus (Ackermann & Engel 2006). Dentre os marcadores antigênicos testados, a glicoproteína E (gE) tem sido preferida, pois além de fornecer um marcador antigênico confiável, a sua deleção contribui para a atenuação da cepa vacinal (Kaashoek et al. 1995).

A maioria das vacinas convencionais ou com marcadores antigênicos contra o BoHV-1 foram preparadas a partir de cepas de BoHV-1.1, que se constituem nos tipos mais prevalentes associados com doença respiratória e abortos nos Estados Unidos e Europa (Metzler et al. 1985, Kaashoek et al. 1994). No Brasil, a caracterização antigênica e molecular de isolados de campo revelou um número significativo de amostras do subtipo 1.2 (Souza et al. 2002), contra as quais a eficácia das vacinas tradicionais (contendo o BoHV-1.1) não tem sido testada. Buscando a obtenção de uma cepa vacinal representativa dos isolados circulantes no rebanho do país, o nosso grupo desenvolveu uma cepa recombinante de BoHV-1.2a defectiva no gene que codifica a gE (SV265gE-), para ser usada como vacina diferencial (Franco et al. 2002a). Esta cepa demonstrou ser atenuada para bovinos e conferir proteção contra a doença respiratória (IBR) frente a desafio com uma amostra homóloga (Franco et al. 2002b), além de poder permitir a diferenciação sorológica entre animais vacinados e infectados naturalmente. A capacidade desta cepa recombinante em conferir proteção frente a desafio genital, no entanto, ainda não havia sido testada. Como a infecção genital pelo BoHV-1 (vulvovaginite, balanopostite) tem sido freqüentemente descrita no país (Weiblen et al. 1996, Flores, dados não publicados) seria importante avaliar o potencial protetor desta vacina frente a desafio genital.

Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a administração intravaginal (IV) da cepa recombinante SV265gE- (Franco et al. 2002a), com relação à inocuidade/atenuação, imunogenicidade e capacidade de induzir proteção frente a desafio com uma amostra viral heteróloga. Como parâmetro para comparação, um grupo de bezerras foi vacinada pela via IM com a mesma cepa viral, em uma dose cinco vezes superior. Os resultados obtidos demonstraram que a inoculação da cepa recombinante pela via IV não produziu sinais locais importantes, e induziu uma resposta imunológica capaz de proteger os animais do desafio genital, em níveis superiores aos produzidos pela imunização IM.

MATERIAL E MÉTODOS

Desenho experimental

Quatorze bezerras soronegativas para o BoHV-1 foram utilizados neste experimento. Seis bezerras foram vacinadas com a cepa de BoHV-1.2 recombinante SV265gE- na submucosa da vulva (grupo IV); quatro foram vacinadas com a mesma cepa pela via intramuscular (grupo IM) e outras quatro permaneceram como controles não-vacinadas (controle). Após a vacinação, os animais foram monitorados nos aspectos clínicos, virológicos e sorológicos. Sessenta e cinco dias após a vacinação (pv), dois animais do grupo IV foram submetidos à administração de dexametasona (Dx) e monitorados nos dias seguintes. Também no dia 65 pv os demais animais foram desafiados pela inoculação da cepa heteróloga SV56/90 do BoHV-1.2 na mucosa da vulva e vagina. Após o desafio, os animais foram monitorados nos aspectos clínicos e virológicos durante 14 dias. Testes sorológicos foram realizados nos dias zero, 16 e 30 pv; no dia do desafio (65 pv), e nos dias 14 e 30 após o desafio (pd).

Células e vírus

Todos os procedimentos de multiplicação e quantificação de vírus, teste de soroneutralização (SN) e isolamento viral de secreções vulvovaginais foram realizados em células da linhagem de rim bovino CRIB (Flores & Donis 1995). As células foram cultivadas em meio essencial mínimo (MEM), contendo penicilina (1.6mg/L), estreptomicina (0.4mg/L), anfotericina (2mg/L), suplementado com 10% de soro fetal bovino. A produção e caracterização *in vitro* da cepa recombinante SV265gE- foi anteriormente descrita (Franco et al. 2002a), e a sua caracterização *in vitro* (Spilki et al. 2004b) e *in vivo* (Franco et al. 2002b) também foram anteriormente relatadas. A amostra de BoHV-1.2 utilizada no desafio (SV56/90) foi isolada de um surto de balanopostite em touros de uma central de inseminação artificial no estado do Rio Grande do Sul, Brasil (Weiblen et al. 1992). Esse vírus foi posteriormente submetido à caracterização antigênica e molecular, constatando-se tratar de vírus do subtipo 1.2 (D'Arce et al. 2002). A virulência desta amostra viral – e a sua adequação para testes de desafio - foi demonstrada tanto em touros após inoculação intraprepucial (Vogel et al. 2004) quanto em bezerras após inoculação intravaginal (Henzel et al. 2008).

Animais, imunização, administração de dexametasona (Dx) e desafio

Seis bezerras soronegativas para o BoHV-1, com idade entre 8 e 10 meses, foram imunizadas pela inoculação na vulva (grupo IV) de 200 μ L de uma suspensão viral que continha $10^{7,6}$ TCID₅₀/ml da cepa recombinante SV265gE- (dose por animal: $10^{6,9}$ TCID₅₀). A inoculação foi realizada na submucosa da face interna da vulva, bilateralmente (100 μ L em cada lábio vulvar), com o uso de seringa e agulha de insulina. Quatro bezerras foram imunizadas pela via IM com 1 mL da suspensão viral (dose por animal: $10^{7,6}$ TCID₅₀). Quatro bezerras permaneceram como controles não-vacinados, sendo inoculadas com 200 μ L de meio de cultivo (MEM) na mucosa da vulva. Sessenta e cinco dias pv, duas bezerras do grupo IV (#237 e #242) foram submetidas à administração de Dx (dose única de 0,5mg/kg pela via intravenosa; Winkler et al. 2000). Neste mesmo dia, as demais bezerras foram submetidas a desafio com a amostra SV56/90 (título de $10^{7,1}$ TCID₅₀/ml). O desafio foi realizado pela inoculação de 1 mL com o auxílio de suabes embebidos na suspensão viral e friccionados levemente na face interna dos lábios vulvares e vestibulo bilateralmente; e pela inoculação de 1mL da suspensão viral internamente na vagina, com o auxílio de uma pipeta de inseminação artificial (dose total de $10^{7,4}$ TCID₅₀). Todos os procedimentos de manipulação e experimentação dos animais foram realizados com a supervisão de um Médico Veterinário e de acordo com o Comitê Brasileiro de experimentação animal (COBEA, lei n. 6.638 de 8 de maio de 1979). O experimento foi aprovado anteriormente pelo Comitê de Ética da UFSM (número de aprovação: 48/2006).

Monitoramento dos animais, coleta e processamento das amostras

As bezerras foram monitoradas clinicamente pelo exame genital e a aferição da temperatura retal durante 14 dias após a vacinação e 14 dias após a administração de Dx ou desafio. Secreções vulvovaginais foram coletadas com auxílio de suabes e acondicionadas em 1 mL de MEM, do dia zero (dia da vacinação) ao dia 14 pv; no dia da administração de Dx ou desafio e nos 14 dias subseqüentes. No laboratório, os suabes foram fortemente agitados em um *vortex* e posteriormente centrifugados a uma rotação de 1.000 x g por 3 min. Para tentativas de isolamento viral, 0,2 mL do sobrenadante dos suabes foram inoculados em monocamadas de células CRIB cultivadas em placas de poliestireno de 24 cavidades e submetidos a três passagens de cinco dias cada para monitoramento do efeito citopático. A infectividade das secreções que foram positivas no isolamento viral foi posteriormente quantificada por diluição limitante, e os títulos virais foram expressos em log₁₀TCID₅₀/mL. Amostras de sangue para a pesquisa de anticorpos anti-BoHV-1 foram coletadas no dia da

vacinação e nos dias 16 e 30 pv; no dia da administração de Dx ou desafio (dia 65 pv) e 14 e 30 pd. Para a pesquisa de anticorpos, as amostras de soro foram submetidas ao teste de SN de acordo com a técnica descrita por Lovato et al. (1995).

Os resultados obtidos das amostras positivas no teste de SN foram convertidos para o Título Médio Geométrico (*geometric mean titer* - GMT) segundo Thrusfield (1986). O GMT é o antilogaritmo na base 2 (neste caso) para o resultado da técnica de SN. Após a conversão dos títulos da SN para o antilogaritmo respectivo, é calculada a média dos títulos.

Os animais foram submetidos a um acompanhamento clínico minucioso após a vacinação (grupo IV) e após a administração de Dx ou desafio (grupos IV, IM, controle e reativadas). Os exames clínicos foram realizados de forma independente por dois técnicos que desconheciam os grupos experimentais. Os parâmetros observados foram: i. temperatura retal; ii. espessura dos lábios vulvares (aferidos com o uso de um paquímetro); iii. coloração da mucosa; iv. presença e número de vesículas e/ou pústulas; v. presença e abundância de secreção; vi. presença e extensão de ulcerações/erosões da mucosa; vii. hemorragias. Essas alterações foram observadas diariamente e analisadas posteriormente, pelo exame de fotografias digitais obtidas da região genital durante o exame clínico. Assim, pode-se estabelecer um critério objetivo de avaliação e comparação da severidade do quadro clínico local desenvolvido pelos animais dos três grupos experimentais. Para tornar a comparação mais objetiva, foram atribuídos valores numéricos aos diferentes níveis de intensidade de cada parâmetro clínico: de (+) a +++, que posteriormente eram convertidos para valores numéricos, sendo que (+) equivalia a um valor de 0,5 e ++++ de 4. Com o somatório destes valores, obteve-se o escore clínico individual, e por grupo, para cada dia após o desafio.

RESULTADOS

Monitoramento clínico e virológico pós-vacinal

Os animais do grupo vacinado pela via IV apresentaram hiperemia discreta, edema leve e transitório na vulva nos dias seguintes à vacinação. Em geral, estes sinais ficaram restritos às proximidades do local de inoculação. Três destes animais desenvolveram pequenas vesículas próximas ao local de inoculação, que se romperam e cicatrizaram em um ou dois dias. A pesquisa de vírus em secreções coletadas dos locais de inoculação do grupo IV revelou infectividade (títulos $\leq 10^{2,97}$ TCID₅₀/mL) durante 3 a 8 dias (entre os dias 1 e 8 pv), dependendo do animal. Na maioria das coletas, detectou-se vírus apenas na segunda passagem

em cultivo celular. Nenhum animal do grupo controle ou IM apresentou sinais clínicos e/ou excretou vírus nos dias seguintes à vacinação. Esses resultados demonstram que a cepa vacinal SV265gE- é suficientemente atenuada para aplicação na submucosa da vulva em dose de $10^{6,9}$ TCID₅₀, mas pode ser excretada por alguns dias.

Monitoramento da reativação do vírus vacinal

Nenhuma das bezerras do grupo IV (#237 e 242) submetidas à administração de Dx no dia 65 pv apresentou evidências de reativação viral nos dias subsequentes ao tratamento. Não foi possível o isolamento viral nas amostras das secreções vaginais. Os animais não apresentaram sinais de recrudescência clínica e não houve um aumento dos títulos de anticorpos neutralizantes no período pós-Dx (#237 permaneceu com título de anticorpos neutralizantes de GMT 1 e #242 permaneceu com título GMT <1). Esses resultados demonstram que a cepa vacinal SV265gE- não foi reativada com eficiência após administração de Dx.

Monitoramento clínico e virológico pós-desafio

Após o desafio, os animais foram monitorados clinicamente durante 14 dias. Neste período, um exame minucioso do trato genital foi realizado por dois técnicos que desconheciam os grupos experimentais. O exame clínico concentrou-se nos sinais locais de infecção, incluindo espessura e coloração da mucosa vulvovestibular; presença, número e diâmetro de vesículas e pústulas; presença e abundância de secreções; presença e diâmetro de erosões/ulcerações da mucosa. A cada aspecto clínico atribuíram-se valores numéricos de 0,5 ou (+) a 4 ou +++. O somatório dos valores individuais resultou no escore clínico diário para cada animal; e o somatório dos escores individuais resultou no escore clínico diário do grupo (Fig. 1). Para o cálculo do número de dias doentes de cada animal e dos grupos, considerou-se o valor igual ou superior a 0,5 ou (+) (Quadro 1).

Cabe ressaltar que, além das variações entre os grupos, houve variação importante na severidade e, em menor grau, na duração do quadro clínico entre animais do mesmo grupo. Dentre os animais controles, 2/4 apresentaram vulvovaginite severa e 2/4 apresentaram sinais moderados. A duração do quadro clínico foi de 9 a 14 dias (média de 11,2 dias). Dentre os animais do grupo IM, um apresentou apenas sinais leves e três apresentaram vulvovaginite moderada (comparável aos dois animais do grupo controle). Neste grupo, a duração do quadro clínico variou de 10 a 13 dias (média de 11,5 dias). Embora a duração média tenha sido semelhante nos dois grupos, a severidade da doença foi notadamente inferior no grupo IM. No

grupo IV, um animal desenvolveu vulvovaginite moderada (comparável aos dois animais do grupo controle e aos três do grupo IM) e três desenvolveram apenas sinais genitais leves. A duração do quadro clínico variou de 4 a 8 dias (média de 5,5 dias). A evolução clínica da doença genital nos grupos experimentais nos dias subseqüentes ao desafio está representada na Fig. 1 e Quadro 1.

Os sinais genitais desenvolvidos pelos animais controles – e que serviram como parâmetro para comparação com os grupos vacinados – foram observados a partir do dia 1 ou 2 pd, aumentaram progressivamente de intensidade até os dias 4-5 pd e mantiveram-se severos até aproximadamente o dia 8 pd (Fig. 1). A partir daí, os sinais regrediram lenta e progressivamente. Dois animais controle ainda apresentavam sinais genitais (hiperemia, edema, pequena quantidade de secreção fibrinopurulenta aderida às lesões) entre os dias 11 e 14 pd. Os sinais observados foram hiperemia inicial leve (1 a 2 dias pd), podendo ser difusa na mucosa vulvar ou restrita, ao redor de pequenos pontos amarelados (<1 mm). Essas vesículas (ou pústulas) apareciam inicialmente como pequenos pontos amarelados, rapidamente erodiam (1 a 2 dias após o surgimento) dando lugar a pequenas erosões na mucosa (< 2 mm) recobertas por secreção amarelada. As pústulas, inicialmente com diâmetro de 2-3 mm, circulares e com a superfície deprimida, aumentavam de diâmetro e tendiam a coalescer formando placas fibrinonecróticas de coloração amarelada e morfologia irregular que com o passar do tempo ficavam recobertas por um exsudato fibrinopurulento. Essas placas fibrinonecróticas – com epitélio erodido - possuíam diâmetro variável e, em dois animais (# 202 e 236) chegaram a coalescer totalmente, recobrindo a maior parte da superfície interna da vulva. Nesses animais, a coleta de suabes era acompanhada de sangramento das lesões. Um discreto aumento de secreção mucosa foi observado nos primeiros dias pós-desafio, dando lugar a secreção fibrinopurulenta, viscosa, que tendia a permanecer aderida à superfície das lesões. Edema e hiperemia pronunciados, além de sensibilidade (dor) ao toque nas lesões, foram achados consistentes entre os dias 3 e 11-13 pd.

No grupo vacinado pela via IM, os sinais foram geralmente mais brandos e com menor duração (com exceção de um animal que apresentou sinais de intensidade semelhante ao grupo controle). O início dos sinais foi semelhante ao grupo controle, com o surgimento de pontos amarelados rodeados por halo hiperêmico na mucosa vulvar entre os dias 1 e 2 pd. No dia 2 pd, todos os animais apresentavam vesículas/pústulas na mucosa vulvar, sendo que em um animal eram disseminadas e apresentavam placas fibrinóticas sobre as lesões. Entre os dias 3 e 5 pv, houve um agravamento das lesões, quando era possível observar várias pústulas coalescentes, recobertas por placas fibrinóticas, edema e hiperemia pronunciada da mucosa

vulvar e presença de um corrimento pouco abundante, que variava de translúcido a fibrinopurulento. Entre os dias 6 e 13 pd foi observada uma regressão lenta dos sinais clínicos, com uma tendência de resolução das lesões. No último dia de avaliação (14 pd), ainda foram observados sinais residuais (hiperemia e edema leves, pequenas lesões cicatriciais) em três animais. Comparando-se com o grupo controle, os animais do grupo IV apresentaram lesões mais moderadas e com menor duração (Fig. 1 e Quadro 1).

No grupo IV, um dos animais apresentou hiperemia vulvar leve e edema discreto no dia 1 pd. No dia 2 pd, três animais apresentavam alguns pontos amarelados (vesículas/pústulas) distribuídas na face interna da vulva, hiperemia leve ao redor das lesões e um edema discreto da mucosa vulvar. Entre os dias 3 e 6 pd, os animais do grupo apresentaram pequenas vesículas e pústulas, em número moderado, acompanhado de edema e hiperemia vulvar. Em um animal, as pústulas aumentaram de diâmetro, tendendo a coalescer e ficaram recobertas por um exsudato fibrinopurulento. Algumas vesículas erodiram, formando pequenas erosões com secreção fluída leve. Em três animais, a hiperemia se restringiu principalmente aos locais ao redor das vesículas/pústulas. Neste período foi também observado corrimento seroso pouco abundante. No dia 8 pd, apenas dois animais deste grupo ainda apresentavam lesões residuais (hiperemia leve, edema, pequenos pontos amarelados). Em geral, os animais do grupo IV apresentaram sinais genitais muito mais brandos do que o grupo controle, e moderadamente mais brandos do que o grupo IM. A duração dos sinais foi notadamente menor nestes animais, comparando-se com os grupos controle e IM (Fig. 1 e Quadro 1).

Nenhum dos animais inoculados apresentou aumento importante da temperatura corporal durante monitoramento. Durante o pico dos sinais clínicos, os animais hesitavam em se locomover, apresentavam a cauda erguida e deslocada lateralmente e urinavam com frequência, em pequenos jatos.

Após o desafio, o vírus foi detectado nas secreções das bezerras controles durante 8 a 9 dias (média: 8,2 dias). Nas bezerras do grupo IM o vírus foi detectado por 5 a 8 dias (média: 6,2 dias) e nas bezerras do grupo IV a excreção viral ocorreu durante 5 a 6 dias (média: 5,2 dias) (Quadro 1). A evolução da excreção viral nos diferentes grupos pode ser acompanhada na Fig. 2.

Sorologia pós-vacinal, pré- e pós-desafio

Dentre os animais do grupo IV, apenas dois desenvolveram títulos de anticorpos neutralizantes detectáveis na SN (animais #237 e 275; GMT= 2 no dia 16 pv e 1 no dia 30

pv). Esses títulos permaneceram inalterados até o dia do desafio (65 pv). Os animais do grupo IM desenvolveram títulos de 1 (dois animais) e 2 (dois animais) nos dias 16 e 30 pv. Os animais deste grupo mantiveram estáveis os títulos de anticorpos até o dia 65 pv, com exceção de um animal que teve uma redução no título de 2 para 1. Uma bezerra deixada em contato com o grupo IV – como sentinela para verificar uma possível transmissão viral – manteve-se soronegativa durante o período. Os animais do grupo controle também permaneceram soronegativos durante o período pré-desafio.

No dia do desafio, os animais controle permaneciam soronegativos; todos os animais do grupo IM apresentavam títulos neutralizantes (títulos de 1 e 2), enquanto apenas dois animais do grupo IV eram soropositivos na SN (título de 1). Após o desafio (coletas nos dias 14 e 30 pd), os animais dos três grupos apresentaram um aumento dos títulos de anticorpos neutralizantes (Quadro 1 e Fig. 3). Os animais do grupo controle (soronegativos no dia do desafio) soroconverteram, apresentando títulos de 3 no dia 30 pd (três animais) e de 2 (um animal). Os animais dos grupos IM e IV apresentaram uma resposta anamnésica marcante após o desafio, desenvolvendo títulos entre 5 e ≥ 8 (grupo IM) e entre 4 e 7 (grupo IV) no dia 30 pd.

DISCUSSÃO

A vacinação de bezerras com a cepa recombinante do BoHV-1.2 SV265gE- na submucosa da vulva (IV) não resultou em sinais locais importantes e, principalmente, conferiu proteção satisfatória frente a desafio genital com uma amostra viral heteróloga. O nível de proteção, medido pela severidade e duração dos sinais clínicos e pela duração da excreção viral, foi superior ao conferido pela vacinação IM. Além disso, a administração de Dx em duas bezerras vacinadas pela via IV não resultou em re-excreção viral detectável, recrudescência dos sinais clínicos ou em aumento nos títulos de anticorpos, indicando que a cepa recombinante não é capaz de reativar a infecção latente de forma eficiente, o que é altamente desejável para uma vacina com vírus replicativo. Esses resultados, principalmente considerando-se o título viral alto utilizado no desafio, viabilizam a utilização desta cepa vacinal e da estratégia de imunização genital para a imunização de fêmeas com vistas à redução das perdas causadas pela infecção genital pelo BoHV-1.

A estratégia de vacinação local para a prevenção de infecções genitais pelo BoHV-1 pode se justificar pela proteção incompleta geralmente conferida pelas vacinas de uso

parenteral frente à infecção/desafio genital (Van Oirschot 1999). A resposta imunológica local, mediada por anticorpos secretados localmente e por células efectoras concentradas nos tecidos linfóides próximos, provavelmente resulta em proteção superior àquela induzida por vacinas de uso parenteral, sobretudo por restringir a replicação viral nos locais de penetração e replicação primária (Tikoo et al. 1995). Da mesma forma, o uso de uma cepa recombinante defectiva na gE representa uma vantagem pela atenuação e pela possibilidade de diferenciação sorológica (Kaashoek et al. 1995). Um aspecto até certo ponto preocupante nessa estratégia foi a excreção do vírus vacinal - apesar dos baixos títulos e do curto período - pelos animais do grupo IV. Nesse sentido, a modificação do método de inoculação/vacinação – substituindo-se a inoculação na submucosa por uma inoculação profunda na vulva - poderia minimizar este efeito, reduzindo ou mesmo abolindo a excreção viral pós-vacinal. Os sinais locais desenvolvidos pelos animais do grupo IV após a vacinação foram leves e transitórios e confirmam a atenuação da cepa vacinal. A incapacidade do vírus vacinal de reativar a infecção latente e ser excretado após a administração de Dx também representa um aspecto favorável para o uso desta cepa vacinal em administração local. Kaashoek et al. (1998), Franco et al. (2002b), Liu et al. (2008) também demonstraram que cepas do BoHV-1 defectivas na gE são pouco eficientes na reativação da infecção latente. Cepas do BoHV-1 defectivas na gE apresentam reduzida capacidade de transporte neuronal anterógrado (dos gânglios para a periferia), o que pode explicar a falha em retornar aos sítios de replicação primária e ser excretadas em eventos de reativação (Liu et al. 2008).

Embora os animais vacinados (tanto pela via IM quanto pela via IV) não tenham desenvolvido títulos de anticorpos neutralizantes elevados (alguns não desenvolveram títulos detectáveis pela SN), estes ficaram protegidos parcialmente, e em níveis variáveis, da doença clínica. Esses achados confirmam observações anteriores que atribuem um papel relativo – e pouco indicativo de proteção – do título de anticorpos neutralizantes sistêmicos na proteção contra o BoHV-1, o que também reforça o provável papel da imunidade celular (Tikoo et al. 1995, Flores et al. 1993). A participação de anticorpos sem atividade neutralizante – e que, portanto, não são detectados na SN – na proteção contra a infecção pelo BoHV-1 também deve ser considerada (Tikoo et al. 1995).

O desafio utilizado no presente estudo foi planejado para realmente avaliar se a imunização IV – e comparativamente, a vacinação IM – seria capaz de conferir proteção local. Para tal, utilizou-se parâmetros quantitativos e qualitativos diferentes da maioria dos estudos de proteção vacinal contra o BoHV-1. Ao contrário de grande parte dos estudos anteriores, o presente experimento utilizou para o desafio uma amostra heteróloga de vírus

(SV56/90). Esta amostra, isolada originalmente de um surto de balanopostite em touros de uma central de IA (Weiblen et al. 1992) já havia demonstrado o seu potencial virulento após inoculação intraprepucial em touros (Vogel et al. 2004) e intravaginal em bezerras (Henzel et al. 2008). Além do desafio com uma amostra heteróloga, o tempo decorrido entre a vacinação e o desafio (65 dias pv) foi superior ao intervalo adotado na maioria dos estudos de proteção vacinal (Kit et al. 1986, Franco et al. 2002b). O título viral utilizado no desafio também foi bastante alto e superior aos títulos geralmente utilizados neste tipo de estudo (Kaashoek et al. 1995, 1996, 1998, Belknap et al. 1999).

Embora a quantidade de vírus que é efetivamente depositada no trato genital das fêmeas após transmissão natural pela cópula seja difícil de estimar, é altamente improvável que o título viral em infecções naturais seja de tal magnitude, por algumas razões: 1. A quantidade de vírus presente em secreções prepuciais e/ou sêmen de touros infectados natural ou experimentalmente raramente excedem valores acima de 5 log (Van Engelenburg et al. 1995); 2. Os níveis de excreção viral durante a infecção aguda de touros geralmente acompanham a evolução do quadro clínico, ou seja, o pico da excreção viral ocorre geralmente nos dias de maior severidade clínica (Vogel et al. 2004). Dessa forma, é altamente improvável que touros que apresentem balanopostite clínica tenham disposição para realizar a monta; 3. Na IA, os títulos presentes no sêmen contaminado raramente excedem os 3 log (Van Engelenburg et al. 1995). Em resumo, o título viral utilizado no desafio foi provavelmente muito superior a real quantidade de vírus que pode ser depositada no trato genital feminino durante a cópula ou pela IA. Mesmo assim, a vacinação IV – e em menor grau a vacinação IM - conferiu proteção genital satisfatória, reduzindo significativamente a severidade e duração da doença, além de reduzir o período de excreção viral. Esses resultados sugerem que, frente a desafios naturais (monta natural ou IA), a vacinação IV (e, em menor escala a IM) pode conferir proteção satisfatória na maioria dos animais.

Nenhuma das estratégias de vacinação (IM e IV) foi capaz de conferir proteção total frente ao desafio, pois os animais vacinados também desenvolveram – em graus variáveis – sinais genitais de infecção. No entanto, quando se compara o escore clínico dos animais dos três grupos (controle, IM e IV), observam-se diferenças importantes na severidade clínica e, principalmente, na duração do quadro clínico agudo. Enquanto as bezerras controle desenvolveram um quadro clínico moderado (2/4) ou severo (2/4) com duração de até doze dias, as bezerras do grupo IM apresentaram um quadro leve (1/3) ou moderado (3/4) de menor duração (9–11 dias). O maior grau de proteção foi observado no grupo IV, em que três animais (3/4) apresentaram um quadro leve e transitório (5–6 dias) e um apresentou

vulvovaginite de severidade moderada, porém também transitória. Quando se observa a curva do escore clínico (Fig. 1), pode-se perceber também que, após um início clínico semelhante nos três grupos, o grupo IV respondeu mais rápido, resultando em não-progressão do quadro em níveis similares aos outros grupos. O grupo IM respondeu mais tardiamente, com diferenças para o grupo controle sendo observadas a partir do dia 4 pd. A resposta mais rápida no grupo IV deve-se, provavelmente, a distribuição das células efectoras nos tecidos linfóides perigenitais, resultando em uma resposta mais rápida. Nesse sentido, Gallichan & Rosenthal (1996) demonstraram que após administração intranasal, intravaginal e sistêmica de um adenovírus recombinante expressando a gB do herpes simplex humano tipo 2 (HSV-2), houve uma maior concentração de células T de memória nos tecidos linfóides relacionados à mucosa quando comparado a concentração de células T de memória sistêmicas.

Nos dois grupos vacinais foi possível observar uma rápida redução da severidade clínica, a partir do dia 4 e 5, ao contrário do grupo controle que manteve a severidade clínica até o dia 8 ou 9 pd. Em resumo, a vacinação IV e, em menor grau, a vacinação IM, foram capazes de induzir proteção parcial frente ao desafio, reduzindo a severidade e duração do quadro clínico. Ressalte-se novamente que o desafio foi realizado com uma dose viral elevada, improvável de ocorrer em condições naturais. Assim, é esperado que a imunização IV, especialmente, possa conferir proteção satisfatória – quase completa – em condições naturais. Ressalte-se também que a vacinação IV neste estudo foi realizada com 1/5 da dose utilizada na vacinação IM, o que também viabilizaria a sua utilização considerando-se os custos.

Um dado muito importante para a validação desta cepa vacinal, que porém não pode ser realizado, foi a diferenciação sorológica para a gE nos animais vacinados. Este resultado não pode ser obtido por falta de um teste sorológico anti-gE disponível no país.

Um aspecto que ainda falta ser esclarecido é se uma vacina atenuada de aplicação IV seria efetiva na prevenção da infecção respiratória, uma vez que casos de infecção respiratória e genital concomitantes pelo BoHV-1 têm sido descritos (Kahrs 2001). Nesse sentido, para a prevenção de infecções respiratórias e genitais, que eventualmente possam ocorrer de forma concomitante em rebanhos, pode-se propor uma vacinação dupla, utilizando-se a dose integral pela via IM e 1/5 da dose pela via IV. Desta forma, estaria-se induzindo imunidade sistêmica e, ao mesmo tempo, imunidade local genital.

Agradecimentos: M. Weiss é aluno do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária (PPGMV) da UFSM e bolsista CNPq. M. Martins é bolsista de iniciação científica (CNPq) no

Setor de Virologia da UFSM, E.F. Flores (101666/2004-0) e R. Weiblen (301339/2004-0) são bolsistas de produtividade do CNPq. Agradecemos aos demais bolsistas do Setor de Virologia da UFSM pelo auxílio durante o experimento.

REFERÊNCIAS

- Ackermann M. & Wyler R. 1984. The DNA of an IPV strain of bovid herpesvirus 1 in sacral ganglia during latency after intravaginal infection. *Vet. Microbiol.* 9(1):53-63.
- Ackermann M. & Engels M. 2006. Pro and contra IBR-eradication. *Vet. Microbiol.* 113(3-4):293-302.
- Belknap E.B., Walters L.M., Kelling C., Ayers V.K., Norris J., McMillen J., Hayhow C., Cochran M., Reddy D.N., Wright J. & Collins J.K. 1999. Immunogenicity and protective efficacy of a gE, gG and US2 gene-deleted bovine herpesvirus-1 (BHV-1 vaccine). *Vaccine.* 17(18):2297-2305.
- D'Arce R.C.F., Almeida R.S., Silva T.C., Franco A.C., Spilki F., Roehe P.M. & Arns C.W. 2002. Restriction endonuclease and monoclonal antibody analysis of Brazilian isolates of bovine herpesviruses types 1 and 5. *Vet. Microbiol.* 88(4):315-324.
- Dennet D.P., Barasa J.O. & Johnson R.H. 1976. Infectious bovine rhinotracheitis virus: studies on the venereal carrier status in range cattle. *Res. Vet. Sci.* 20(1):77-83.
- 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(4):534-540.
- Flores E.F. & Donis R.O. 1995. Isolation of mutant MDBK cell line resistant to bovine viral diarrhea virus infection due to a block in viral entry. *Virology.* 208(2):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(3):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(4):135-140.

- Gallichan W.S. & Rosenthal K.L. 1996. Long-lived cytotoxic T lymphocyte memory in mucosal tissues after mucosal but not systemic immunization. *J. Exp. Med.* 184(5):1879-1890.
- Halfen D.C. & Vidor T. 2001. Infecção por herpesvírus bovino-1 e herpesvírus bovino-5, p.97-108. In: Riet-Correa F., Schild A.L., Mendez M.D.C. & Lemos R.A. (ed.), *Doenças de Ruminantes e Eqüinos*. 2ª ed. Varela, São Paulo. Vol I, 426p.
- Henzel A., Diel D.G., Arenhart S., Vogel F.S.F., Weiblen R. & Flores E.F. 2008. Aspectos virológicos e clínico-patológicos da infecção genital aguda e latente pelo herpesvírus bovino tipo 1.2 em bezerras experimentalmente infectadas. *Pesq. Vet. Bras.* 28(3):140-148.
- Homan E.J. & Easterday B.C. 1980. Isolation of bovine herpesvirus-1 from trigeminal ganglia of clinically normal cattle. *Am. J. Vet. Res.* 41(8):1212-1213.
- Huck R.A., Millar P.G., Evans D.H., Stables J.W. & Ross A. 1971. Penoposthitis associated with infectious bovine rhinotracheitis-infectious pustular vulvovaginitis (I.B.R.-I.P.V.) virus in a stud of bulls. *Vet. Rec.* 88(12):292-297.
- Kaashoek M.J., Moerman A., Madić J., Rijsewijk F.A., Quak J., Gielkens A.L. & Van Oirschot J.T. 1994. A conventionally attenuated glycoprotein E-negative strain of bovine herpesvirus type 1 is an efficacious and safe vaccine. *Vaccine.* 12(5):439-444.
- Kaashoek M.J., Moerman A., Madić J., Weerdmeester K., Maris-Veldhuis M., Rijsewijk F.A. & Van Oirschot J.T. 1995. An inactivated vaccine based on a glycoprotein E-negative strain of bovine herpesvirus 1 induces protective immunity and allows serological differentiation *Vaccine.* 13(4):342-346.
- Kaashoek M.J., Van Engelenburg F.A., Moerman A., Gielkens A.L., Rijsewijk F.A. & Van Oirschot J.T. 1996. Virulence and immunogenicity in calves of thymidine kinase- and glycoprotein E-negative bovine herpesvirus 1 mutants. *Vet. Microbiol.* 48(1-2):143-53.
- Kaashoek M.J., Rijsewijk F.A.M., Ruuls R.C., Keil G.M., Thiry E., Pastore 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(8): 802-809.
- Kahrs R.F. 2001. Infectious bovine rhinotracheitis and infectious pustular vulvovaginitis, p.159-170. In: ____ (ed.), *Viral Diseases of Catle*. 2nd ed. Iowa State University, Ames. 324p.

- Kit S., Kit M. & McConnell S. 1986. Intramuscular and intravaginal vaccination of pregnant cows with thymidine kinase-negative, temperature-resistant infectious bovine rhinotracheitis virus (bovine herpes virus 1). *Vaccine*. 4(1):55-61.
- Liu Z.F., Brum M.C.S., Doster A., Jones C., & Chowdhury S.I. 2008. A bovine herpesvirus type 1 mutant virus specifying a carboxyl-terminal truncation of glycoprotein E is defective in anterograde neuronal transport in rabbits and calves. *J. Virol.* 82(15):7432–7442.
- Lovato L.T., Weiblen R., Moraes M.P. & Tobias L.F. 1995. Herpesvírus bovino tipo 1 (HVB-1): inquérito soro-epidemiológico no rebanho leiteiro do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Cienc. Rural*. 25(3):425-430.
- Metzler A.E., Matile H., Gassmann U., Engels M. & Wyler R. 1985. European isolates of bovine herpesvirus 1: a comparison of restriction endonuclease sites, polypeptides and reactivity with monoclonal antibodies. *Arch. Virol.* 85(1-2):57-69.
- Miller J.M. & Van Der Maaten M.J. 1984. Reproductive tract lesions in heifers after intrauterine inoculation with infectious bovine rhinotracheitis virus. *Am. J. Vet. Res.* 45(4):790-794.
- Pastoret P.P., Thiry E., Brochier B., Derboven G. & Vindevogel H. 1984. The role of latency in the epizootiology of infectious bovine rhinotracheitis, p.211-228. In: Wittmann G., Gaskell R. & Rziha H.J. (ed.), *Latent Herpes Virus Infections in Veterinary Medicine*. Martinus Nijhoff, The Hague. 528p.
- Pritchard G., Cook N. & Banks M. 1997. Infectious pustular vulvovaginitis/infectious pustular balanoposthitis in cattle. *Vet. Rec.* 140(22):587.
- Rock D.L. 1994. Latent infection with bovine herpesvirus type 1. *Sem. Virol.* 5(3):233-240.
- Roizman B. 1992. The family *Herpesviridae*: an update. *Arch. Virol.* 123(3-4):432-445.
- Saxegaard F. 1970. Infectious bovine rhinotracheitis/ infectious pustular vulvovaginitis (IBR/IPV) virus infection of cattle with particular reference to genital infections. *Vet. Bull.* 40(8):605-611.
- Sheffy B.E. & Davies D.H. 1972. Reactivation of a bovine herpesvirus after corticosteroid treatment. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 140(3):974-976.
- 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(2):191-199.
- Snowdon W.A. 1965. The IBR-IPV virus: reaction to infection and intermittent recovery of virus from experimentally infected cattle. *Aust. Vet. J.* 41(5):135-142.

- Souza V.F., Melo S.V., Esteves P.A., Schmidt C.S., Gonçalves D.A., Schaefer R., Silva T.C., Almeida R.S., Vicentini F., Franco A.C., Oliveira E.A., Spilki F.R., Weiblen R., Flores E.F., Lemos R.A., Alfieri A.A., Pituco E.M. & Roehle P.M. 2002. Caracterização de herpesvírus bovinos tipos 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5) com anticorpos monoclonais. *Pesq. Vet. Bras.* 22(1):13-18.
- Spilki F.R., Esteves P.A., Lima M., Franco A.C., Chiminazzo C., Flores E.F., Weiblen R., Driemeier D. & Roehle, P.M. 2004a. Comparative pathogenicity of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) subtypes 1 (BHV-1.1) and 2a (BHV-1.2a). *Pesq. Vet. Bras.* 24(1):43-49.
- Spilki F.R., Franco A.C., Rijsewijk F.A.M., Weiblen R., Flores E.F., & Roehle, P.M. 2004b. In vitro characterization of gE negative bovine herpesvirus types 1.1 (BHV-1.1) and 1.2a (BHV-1.2a). *Braz. J. Microbiol.* 35(3):264-268.
- Thrusfield M. 1986. Serological epidemiology, p.175-186. In: ____ (ed.), *Veterinary epidemiology*. Butterworths, London. 280p.
- Tikoo S.K., Campos M. & Babiuk L.A. 1995. Bovine herpesvirus 1 (BHV-1): biology, pathogenesis and control. *Adv. Virus. Res.* 45:191-223.
- Van Engelenburg F.A.C., Van Schie F.W., Rijsewijk F.A.M. & Van Oirschot J.T. 1995. Excretion of bovine herpesvirus 1 in semen is detected much longer by PCR than by virus isolation. *J. Clin. Microbiol.* 33(2):308-312.
- Van Oirschot J.T. 1999. Bovine viral vaccines, diagnosis, and eradication: past, present and future. *Adv. Vet. Med.* 41:197-216.
- Vogel F.S.F., Flores E.F., Weiblen R., Winkelman E.R., Moraes M.P. & Bragança J.F.M. 2004. Intrapreputal infection of young bulls with bovine herpesvirus type 1.2. (BHV-1.2): acute balanoposthitis, latent infection and detection of viral DNA in regional neural and non-neural tissues 50 days after experimental reactivation. *Vet. Microbiol.* 98(3-4):185-196.
- Vogel F.S.F., Caron L., Flores E.F., Weiblen R., Winkelman E.R., Mayer S.V. & Bastos R.G. 2003. Distribution of bovine herpesvirus type 5 DNA in the central nervous system of latently, experimentally infected calves. *J. Clin. Microbiol.* 41(10):4512-4520.
- Weiblen R., Moraes M.P., Rebelatto M.C., Lovato L.T. & Canabarro T.F. 1996. Bovine herpesvirus isolates. *Rev. Microbiol.* 27(3):87-90.
- Weiblen R., Kreutz L.C., Canabarro T.F., Schuch L.F. & Rebelatto M.C. 1992. Isolation of bovine herpesvirus 1 from preputial swabs and semen of bulls with balanoposthitis. *J. Vet. Diagn. Invest.* 4(3):341-343.

Winkler M.T.C., Doster A. & Jones C. 2000. Persistence and reactivation of bovine herpesvirus 1 in the tonsils of latently infected calves. *J. Virol.* 74(11):5337-5346.

Quadro 1 – Resposta sorológica pós-vacinação (pré-desafio), excreção viral e achados clínicos pós-desafio em bezerras imunizadas com uma cepa recombinante do BoHV-1.2 defectiva na glicoproteína E e desafiadas com uma amostra viral heteróloga.

Grupos/animais	Anticorpos neutralizantes		Excreção viral ^b		Vulvovaginite		Anticorpos neutralizantes Pós-desafio ^e
	Pré-desafio ^a		Duração (dias)	Título máximo ^c	Severidade ^d	Dias	
	198	<1	8	5,5	Moderada	1–9	3
Grupo	202	<1	8	5,97	Severa	1–13	2
Controle	230	<1	9	5,8	Moderada	2–10	3
	236	<1	8	5,8	Severa	1–14	3
			\bar{x} 8,2			\bar{x} 11,2	
	240	1	8	4,3	Leve	2–13	6
Grupo	241	1	5	5,5	Moderada	2–11	5
IM	244	2	6	4,8	Moderada	1–11	≥8
	248	1	6	4,5	Moderada	1–13	≥8
			\bar{x} 6,2			\bar{x} 11,5	
	232	<1	5	5,3	Moderada	1–8	5
Grupo	246	<1	5	4,8	Leve	3–6	4
IV	275	1	6	3,8	Leve	2–6	7
	276	<1	5	4,8	Leve	2–6	5
			\bar{x} 5,2			\bar{x} 5,5	
Grupo	237	1	na ^g	na	na	na	1
IV-Dx ^f	242	<1	na	na	na	na	<1

^a Anticorpos neutralizantes obtidos pela técnica de soroneutralização (SN). Resultados referentes ao dia 65 pv. Valores expressos em GMT (título médio geométrico).

^b Excreção viral monitorada até o dia 14 pd por coleta de suabes vaginais e isolamento viral em cultivo celular.

^c Título viral expresso em \log_{10} TCID₅₀/mL.

^d Conforme a gravidade dos sinais clínicos (ver Material e Métodos) observados nos dias subsequentes ao desafio.

^e Anticorpos neutralizantes obtidos pela técnica de SN. Resultados referentes ao dia 30 pd. Valores expressos em GMT.

^f Animais do grupo IV que foram submetidas à administração de Dx no dia 65 pv.

^g Não aplicável.

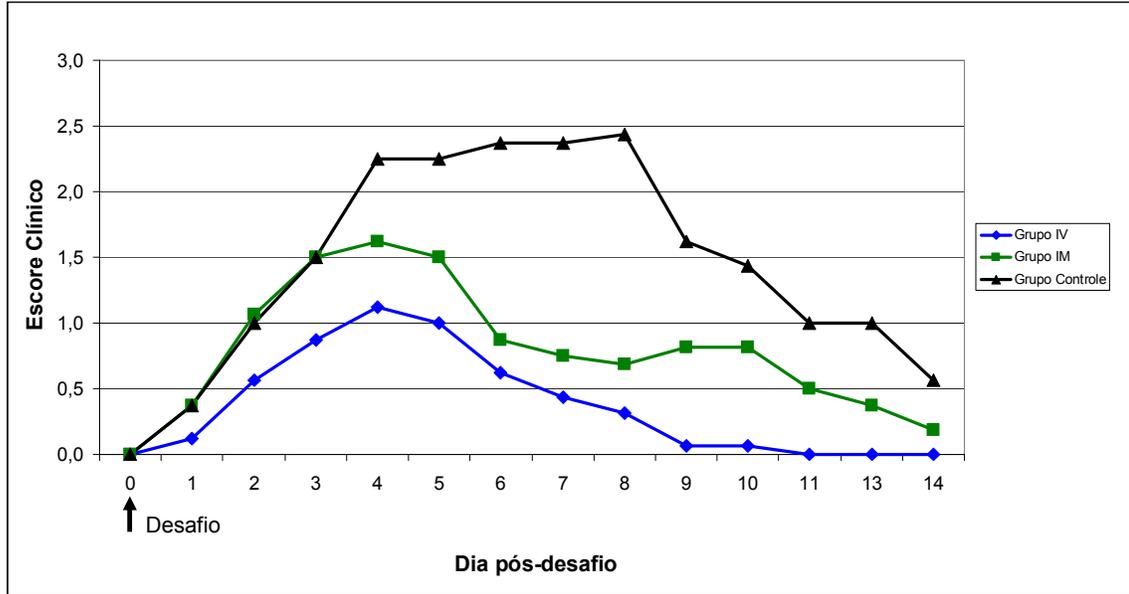


Figura 1 – Escore clínico médio dos grupos vacinados com uma cepa recombinante do BoHV-1.2 defectiva na glicoproteína E e grupo controle não-vacinado, após o desafio com uma amostra viral heteróloga do BoHV-1.2.

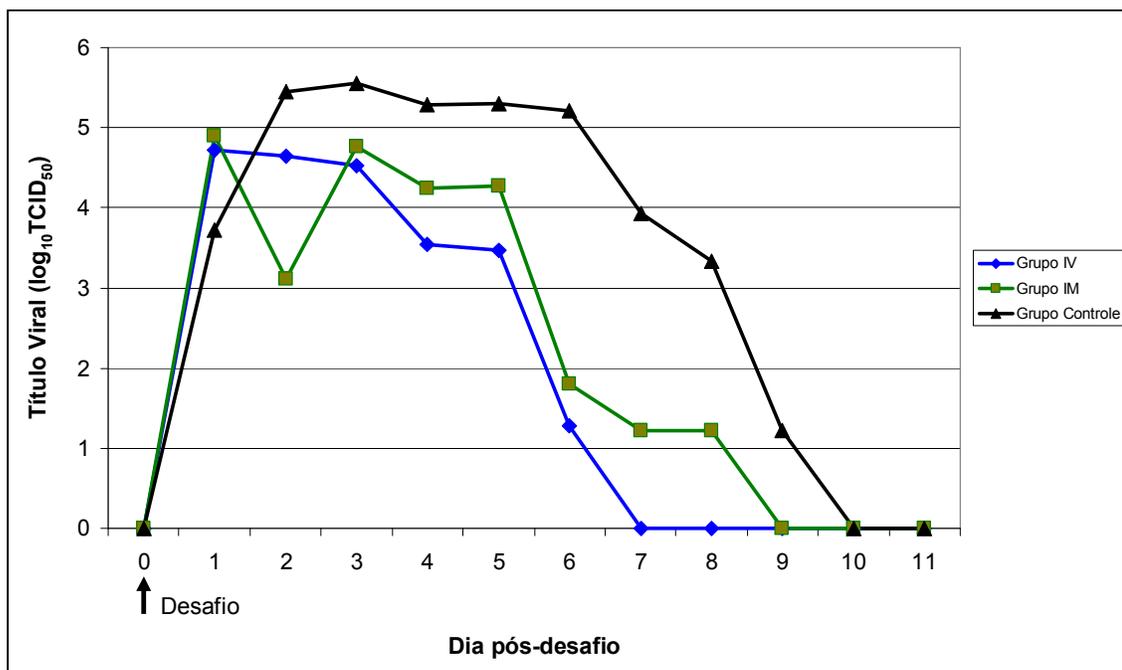


Figura 2 – Títulos virais médios em secreções vaginais de bezerras dos grupos vacinados com uma cepa recombinante do BoHV-1.2 defectiva na glicoproteína E e grupo controle não-vacinado, após o desafio com uma amostra viral heteróloga do BoHV-1.2.

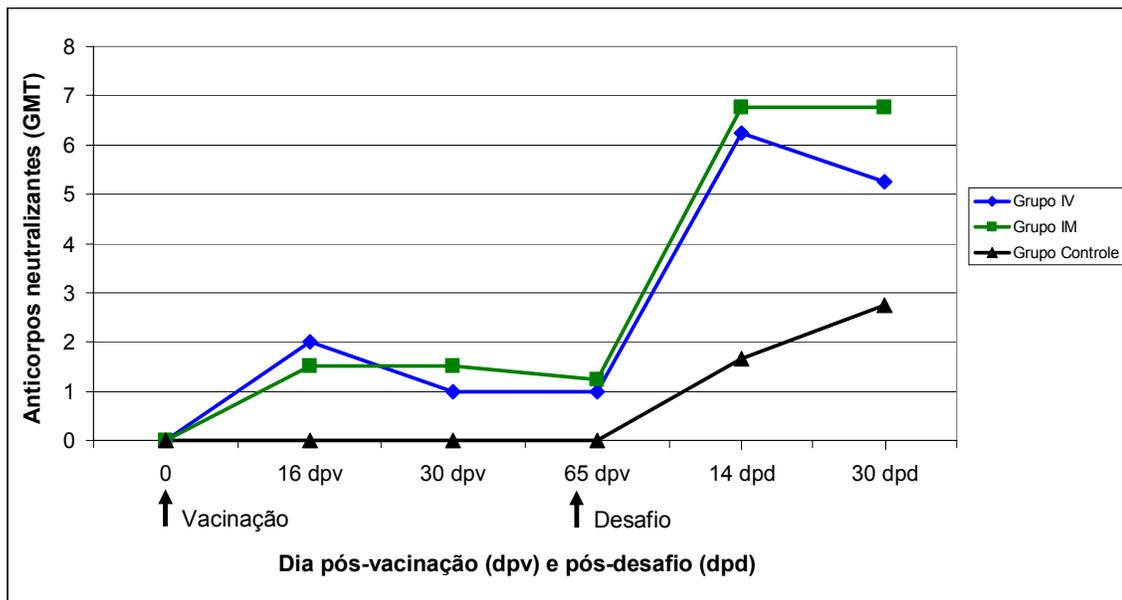


Figura 3 – Títulos médios de anticorpos neutralizantes no soro de bezerras vacinadas com uma cepa recombinante do BoHV-1.2 defectiva na glicoproteína E e grupo controle não-vacinado, após o desafio com uma amostra viral heteróloga do BoHV-1.2.

3. REFERÊNCIAS

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

BUTCHI, N. B. et al. Envelope protein Us9 is required for the anterograde transport of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) from trigeminal ganglia to nose and eye upon reactivation. **Journal of Neurovirology**, v. 13, n. 4, p. 384-388, 2007.

CHOWDHURY, S. I. Construction and characterization of an attenuated bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) recombinant virus. **Veterinary Microbiology**, v. 52, n. 1/2, p. 13-23, 1996.

CHOWDHURY, S. I. et al. Construction and characterization of a glycoprotein E gene-deleted bovine herpesvirus type 1 recombinant. **American Journal of Veterinary Research**, v. 60, n. 2, p. 227-232, 1999.

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.

FLORES E. F. et al. Efficacy of a deletion mutant bovine herpesvirus-1 (BHV-1) vaccine that allows serologic differentiation of vaccinated from naturally infected animals. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 5, n. 4, p. 534-540, 1993.

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, 2002a.

FRANCO, A. C. et al. Construction and characterization of a glycoprotein E deletion mutant of bovine herpesvirus type 1.2 strain isolated in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 3, p. 274-278, 2002b.

HENZEL, A. et al. Aspectos virológicos e clínico-patológicos da infecção genital aguda e latente pelo herpesvírus bovino tipo 1.2 em bezerras experimentalmente infectadas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 3, p. 140-148, 2008.

JONES, C.; CHOWDHURY, S. I. 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**, v. 8, n. 2, p. 187-205, 2008.

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, 1996a.

KAASHOEK, M. J. 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**, v. 16, n. 8, p. 802–809, 1998.

KAASHOEK, M. J.; RIJSEWIJK, F. A.; OIRSCHOT, J. T. Persistence of antibodies against bovine herpesvirus 1 and virus reactivation two to three years after infection. **Veterinary Microbiology**, v. 53, n. 1/2, p. 103–110, 1996b.

KAASHOEK, M. J.; VAN OIRSCHOT, J. T. Early immunity induced by a live gE-negative bovine herpesvirus 1 marker vaccine. **Veterinary Microbiology**, v. 53, n. 1/2, p.191-197, 1996.

KAHRS, R. F. Infectious bovine rhinotracheitis and infectious pustular vulvovaginitis,. In: _____. **Viral Diseases of Cattle**. 2nd ed. Ames:Iowa State University, 2001. p.159-170.

KIT, S.; KIT, M.; McCONNELL, S. Intramuscular and intravaginal vaccination of pregnant cows with thymidine kinase-negative, temperature-resistant infectious bovine rhinotracheitis virus (bovine herpesvirus 1). **Vaccine**, v. 4, n. 1, p. 55-61, 1986.

LIU, Z. F. et al. A bovine herpesvirus type 1 mutant virus specifying a carboxyl-terminal truncation of glycoprotein E is defective in anterograde neuronal transport in rabbits and calves. **Journal of Virology**, v. 82, n. 15, p. 7432–7442, 2008.

METZLER, A. E. et al. European isolates of bovine herpesvirus 1: a comparison of restriction endonuclease sites, polypeptides and reactivity with monoclonal antibodies. **Archives of Virology**, v. 85, n. 1/2, p. 57-69, 1985.

MILLER, J. M.; VAN DER MAATEN, M. J. Reproductive tract lesions in heifers after intrauterine inoculation with infectious bovine rhinotracheitis virus. **American Journal of Veterinary Research**, v. 45, n. 4, p. 790-794, 1984.

POSPISIL, Z. et al. Development of a disease control program based on the use of an inactivated vaccine against infectious bovine rhinotracheitis. **Veterinary Microbiology**, v. 53, n. 1-2, p. 199-206, 1996.

ROIZMAN, B. The family *Herpesviridae*: an update. **Archives of Virology**, v. 123, n. 3/4, p. 432-445, 1992.

SILVA, L. F. et al. Cobaias como modelo para teste de vacinas inativadas contra o herpesvírus bovino tipo 1 e o vírus da diarreia viral bovina. **Ciência Rural**, v. 37, n. 4, p. 1060-1065, 2007a.

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

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

SOUZA, V. F. et al. Caracterização de herpesvírus bovinos tipos 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5) com anticorpos monoclonais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 22, n. 1, p. 13-18, 2002.

SPIILKI, F. R. et al. Comparative pathogenicity of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) subtypes 1 (BHV-1.1) and 2a (BHV-1.2a). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 24, n. 1, p. 43-49, 2004.

SPIILKI, F. R. et al. Field evaluation of safety during gestation and horizontal spread of a recombinant differential bovine herpesvirus 1 (BoHV-1) vaccine. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, n. 1, p. 54-58, 2005.

TIKOO, S. K.; CAMPOS, M.; BABIUK, L.A. Bovine herpesvirus 1 (BHV-1): biology, pathogenesis and control. **Advances in Virus Research**, v. 45, p. 191-223, 1995.

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

VAN OIRSCHOT, J. T. Bovine viral vaccines, diagnosis, and eradication: past, present and future. **Advances in Veterinary Medicine**, v. 41, p. 197-216, 1999.

VOGEL, F. S. F. et al. 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**, v. 32, n. 5, p. 881-883, 2002.

VOGEL, F. S. F. et al. Intrapreputial infection of young bulls with bovine herpesvirus type 1.2. (BHV-1.2): acute balanoposthitis, latent infection and detection of viral DNA in regional neural and non-neural tissues 50 days after experimental reactivation. **Veterinary Microbiology**, v. 98, n. 3/4, p. 185-196, 2004.

WEIBLEN, R. et al. Isolation of bovine herpesvirus 1 from preputial swabs and semen of bulls with balanoposthitis. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 4, n. 3, p. 341-343, 1992.