

UFSM

Dissertação de Mestrado

**VACINA EXPERIMENTAL CONTRA O VÍRUS
DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA (BVDV):
AVALIAÇÃO DA INOCUIDADE, EFICÁCIA E
MODELO PARA TESTES DE PROTEÇÃO VACINAL**

Mário Celso Sperotto Brum

PPGMV

Santa Maria, RS, Brasil

2002

**VACINA EXPERIMENTAL CONTRA O VÍRUS
DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA (BVDV):
AVALIAÇÃO DA INOCUIDADE, EFICÁCIA E
MODELO PARA TESTES DE PROTEÇÃO VACINAL**

por

Mário Celso Sperotto Brum

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.**

PPGMV

Santa Maria, RS, Brasil

2002

B893v Brum, Mário Celso Sperotto

Vacina experimental contra o vírus da diarreia viral bovina (BVDV): avaliação da inocuidade, eficácia e modelo para testes de proteção vacinal / por Mário Celso Sperotto Brum. – Santa Maria, 2001.

xiii, 63 f. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria – Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária – Santa Maria, RS, 2001, Rudi Weiblen, orientador

1. Medicina veterinária 2. Vírus 3. Diarreia viral 4. Bovinos 5. Proteção fetal 6 Diarreia viral bovina 7. BVDV I. Weiblen, Rudi, orient. II. Título

CDU: T619:636.2

Ficha Catalográfica elaborada por
Luiz Marchiotti Fernandes CRB 10-1160
Biblioteca Setorial do CCR - UFSM

©2002

Todos os direitos autorais reservados a Mário Celso Sperotto Brum. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita com autorização por escrito do autor:

Endereço: Sala 4200, Prédio 20, DMP-DMVP/CCS-CCR/UFSM, Campus UFSM, Santa Maria, RS, 97105-900. Fone/fax: (55) 220 8034; Endereço eletrônico:

mcsbrum@yahoo.com.br

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

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

**VACINA EXPERIMENTAL CONTRA O VÍRUS
DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA (BVDV):
AVALIAÇÃO DA INOCUIDADE, EFICÁCIA E
MODELO PARA TESTES DE PROTEÇÃO VACINAL**

elaborada por
Mário Celso Sperotto Brum

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

COMISSÃO EXAMINADORA:

Rudi Weiblen
(Presidente/Orientador)

Luiz Carlos Kreutz

Eduardo Furtado Flores

Santa Maria, 11 de janeiro de 2002.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Rudi Weiblen pela orientação, confiança, colaboração, dedicação e amizade demonstrados durante a execução desse trabalho e convívio.

Ao professor Eduardo Furtado Flores pela orientação, dedicação, colaboração, confiança, paciência e amizade demonstrados durante a execução desse trabalho.

Aos meus familiares, principalmente ao meu irmão Fernando pelo auxílio, preocupação, ajuda e amizade.

Aos já mestres Adriana M. da Silva, Sônia A. Botton, Laura V. G. Gil, Fernando L. Tobias, Nilzane Beltrão, Alexandre Leal e Adriana M. B. Leal pela valiosa amizade, apoio, paciência, ensinamentos e dedicação em transmitir seus conhecimentos.

As colegas de mestrado Margareti Medeiros e Ingeborg M. Langhor pelo apoio, dedicação, discussões, conselhos e momentos de descontração durante o curso.

Aos colegas de mestrado Luizinho Caron, Charles Scherer, Fernanda Vogel, Larissa Brum e Ivomar Oldoni pela amizade, coleguismo e momentos de descontração durante o convívio.

Aos bolsistas do Setor de Virologia pela convivência, amizade, momentos de descontração e principalmente pela ajuda durante os experimentos.

Aos funcionários do Setor de Virologia pela presteza, ajuda, ensinamentos e convivência diária.

Aos professores Cláudio S. L. de Barros e Domingüita L. Graça e equipe do Setor de Patologia Veterinária pela ajuda na interpretação dos exames histológicos e pela amizade.

Ao professor Jairo Pereira Neves e ao doutorando Marlon Nadal Maciel pela disponibilidade em realizar os exames ultrassonográficos.

À professora Sônia T. A Lopes e ao colega Cleverson de Souza pela realização e auxílio na interpretação dos exames hematológicos.

À Fabíola N. Flores pelo carinho, compreensão, dedicação, apoio e auxílio nos experimentos.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, pela formação acadêmica e científica.

À CAPES pelo fornecimento de bolsas e ao CNPq, FAPERGS, FINEP (PRONEX em Virologia Veterinária, processo nº 215/96) pelo apoio financeiro, os quais viabilizaram a realização desse trabalho.

RESUMO

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

VACINA EXPERIMENTAL CONTRA O VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA (BVDV): AVALIAÇÃO DA INOCUIDADE, EFICÁCIA E MODELO PARA TESTES DE PROTEÇÃO VACINAL.

AUTOR: MÁRIO CELSO SPEROTTO BRUM

ORIENTADOR: RUDI WEIBLEN

Santa Maria, 11 de janeiro de 2002.

O presente estudo teve como objetivos avaliar duas amostras atenuadas do vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV) como possíveis candidatos a cepas vacinais e investigar os efeitos da inoculação de amostras brasileiras de BVDV tipo 2 (BVDV-2) em bezerros. No primeiro experimento, duas amostras do BVDV foram atenuadas através de múltiplas passagens em cultivo celular e radiação ultravioleta. As amostras foram testadas quanto à sua atenuação para bezerros e fetos ovinos, capacidade e espectro imunogênico, e capacidade de induzir proteção fetal em ovelhas prenhes. A inoculação intramuscular (IM) dos vírus modificados, em quatro bezerros, produziu apenas uma elevação discreta e passageira da temperatura corporal, seguida de produção de altos níveis de anticorpos neutralizantes. O vírus não foi detectado em secreções nasais ou no sangue nos dias seguintes à inoculação. Porém, a inoculação IM desses vírus em quatro ovelhas prenhes foi seguida de transmissão transplacentária e infecção em todos os fetos. Para os testes de proteção fetal, ovelhas prenhes previamente imunizadas com duas doses vacinais, foram inoculadas pela via intranasal com amostras de BVDV-1 (SV-126.8, n=6) ou BVDV-2 (SV-260, n=5). No dia do desafio (134 dias após a segunda dose), todos os animais apresentavam títulos altos de anticorpos neutralizantes (256 a >4096) contra os vírus vacinais, além de títulos de magnitude variada (8 a >4096) contra vários isolados brasileiros de BVDV-1 e BVDV-2. Quinze dias após o desafio, as ovelhas foram sacrificadas e tecidos fetais foram examinados para a presença do vírus. Todos os fetos das ovelhas controle não-vacinadas (n=4) foram positivos para os vírus utilizados no desafio. Em contraste, nenhum feto das ovelhas imunizadas (n=11) foi positivo

para vírus, indicando que a resposta imunológica induzida pela vacinação com os vírus modificados foi capaz de prevenir a infecção fetal. Em um segundo experimento, duas amostras brasileiras de BVDV-2 foram inoculadas em bezerros com o objetivo de verificar a virulência e estudar a patogenia da infecção. Previamente à inoculação, os animais foram imunodeprimidos com dexametasona. Quatro bezerros com idades entre 45 e 90 dias (grupo A) foram inoculados com a amostra SV-260 (n=2) ou LV-96 (n=2) e quatro bezerros com 6 a 8 meses de idade foram inoculados com a amostra SV-260 (grupo B). Após a inoculação, os bezerros do grupo A apresentaram anorexia, depressão, hipertermia, sinais de infecção respiratória e diarreia profusa acompanhada de melena em dois animais. Os sinais respiratórios e digestivos progrediram e os animais morreram ou foram sacrificados *in extremis* entre os dias 7 e 12 pós-inoculação. Os achados macroscópicos mais marcantes foram úlceras e erosões no trato digestivo (língua, n=4; esôfago, n=1; rúmen, n=1 e abomaso, n=3), edema pulmonar (n=4) e na mucosa do abomaso (n=3), equimoses e sufusões na serosa do baço (n=2), rúmen, intestino delgado e ceco (n=1), coração (n=1) e na mucosa da bexiga (n=1) e intussuscepção intestinal (n=1). Úlceras e erosões, acompanhadas de infiltrado mononuclear na mucosa e submucosa do trato digestivo e depleção linfóide nos linfonodos e placas de Peyer foram as alterações microscópicas observadas. O vírus foi detectado em vários tecidos e órgãos. Antígenos virais foram demonstrados por imuno-histoquímica principalmente em células epiteliais do trato digestivo; em células mononucleares nos espaços perivasculares e peribronquiais; na cápsula e septos de linfonodos; e em linfócitos e células mononucleares das placas de Peyer e baço. Os animais do grupo B apresentaram depressão, hipertermia, sinais moderados de infecção respiratória e digestiva, ulcerações na língua e bochecha e recuperaram-se após alguns dias. Esses resultados demonstraram que as amostras de BVDV-2 foram capazes de reproduzir a enfermidade aguda quando inoculadas em bezerros, e que as conseqüências clínico-patológicas da infecção foram mais severas nos animais mais jovens.

Palavras-chave: vírus da diarreia viral bovina, BVDV, vacina, proteção fetal.

ABSTRACT*Master's Dissertation*Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria***EXPERIMENTAL VACCINE AGAINST BOVINE VIRAL DIARRHEA
VIRUS (BVDV): EVALUATION TEST OF INNOCUITY, EFFICACY AND A
MODEL TO ASSESS VACCINE PROTECTION****AUTHOR: MÁRIO CELSO SPEROTTO BRUM**ADVISER: RUDI WEIBLEN**Santa Maria, January, the 11th, 2002.*

This study aimed to evaluate two attenuated strains of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) as vaccine candidates and to study the effects of inoculation of two Brazilian BVDV type 2 (BVDV-2) isolates in calves. In the first experiment, two isolates of BVDV-2, attenuated by multiple passages in tissue culture associated with ultraviolet irradiation, were evaluated as vaccine candidates. The attenuation of the modified viruses was assessed in calves and in pregnant ewes and their capacity to induce fetal protection was investigated in pregnant ewes. Intramuscular inoculation of the attenuated viruses in four seronegative calves produced only a mild and transient rise in body temperature, followed by the production of high titers of neutralizing antibodies. The viruses were not detected in nasal secretions or in the blood following inoculation. However, intramuscular inoculation of these viruses in four pregnant ewes resulted in transplacental transmission and infection of all fetuses. To assess fetal protection conferred by immunization, pregnant ewes previously immunized with these viruses were challenged by intranasal inoculation with BVDV-1 (SV-126.8, n=6) or BVDV-2 (SV-260, n=5). At the day of challenge (134 days after the second immunization), all ewes had high titers of neutralizing antibodies (256 to >4096) to the vaccine viruses, and variable titers (8 to >4096) to Brazilian BVDV-1 and BVDV-2 field isolates. Fifteen days after challenge, the ewes were euthanized and fetal tissues were examined for infectivity. All fetuses from non-vaccinated, challenged ewes (n=4) were infected. In contrast, none of the fetuses from the immunized dams (n=11) were positive for virus, indicating that the immunological response induced by immunization with the vaccine candidate

viruses was capable of preventing fetal infection. These results suggest that it might be possible to achieve by induction of a strong immunological response using a modified live vaccines. In the second experiment, two Brazilian BVDV-2 were inoculated in calves to study virulence and the pathogenesis of viral infection. Previously to virus inoculation, the calves were immunosuppressed with dexametasone. Four 45 to 90-days-old calves (group A) were inoculated with isolate SV-260 (n=2) or LV-96 (n=2), and four 6 to 8-months-old calves (group B) were inoculated with isolate SV-260. Following virus inoculation, group A calves showed anorexia, depression, hyperthermia, signs of respiratory infection and profuse diarrhea, bloody in two cases. The respiratory and digestive signs progressed and the animals died or were euthanized *in extremis* between days 7 and 12 post-inoculation. Ulcers and erosions in the digestive tract (tongue, n=4; esophagus, n=1; rumen, n=1 and abomasum, n=3), edema of the lung (n=4) and abomasal mucosa (n=3), echimosis and suffusions in the spleen serosa (n=2), rumen, small intestine and ceccum (n=1), heart (n=1) and urinary bladder mucosa (n=1) and intestinal intussuseption (n=1) were the most prominent findings at necropsy. Ulcerations and erosions accompanied by mononuclear cell infiltrates in the digestive tract mucosa and submucosa, and lymphoid depletion in the lymph nodes and Peyer's patches were frequently observed. Infectious virus was detected in several tissues and organs. Viral antigens were detected by immunohistochemistry mainly in epithelial cells of the digestive tract, in mononuclear cells of the perivascular and peribronchial spaces; in lymph node septae and capsule; and in lymphocytes and mononuclear cells of the spleen and Peyer's patches. Group B calves showed depression, hyperthermia, moderate signs of respiratory and digestive infection, small ulcerations in the tongue and recovered after a few days. These results demonstrate that the Brazilian BVDV-2 isolates were capable of producing an acute disease in calves upon experimental inoculation, and that the clinical and pathological consequences of the infection were more severe in young calves.

Keywords: bovine viral diarrhea virus, BVDV, vaccine, fetal protection.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- FIGURA 1** - Evolução dos títulos médios (GMT) de anticorpos neutralizantes contra as amostras vacinais em ovinos imunizados com duas amostras modificadas do vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV)..... 21

CAPÍTULO 2

- FIGURA 1** - Tecidos de bezerros inoculados com amostras brasileiras do vírus da Diarréia Viral Bovina-2; (a) Equimoses e sufusões na serosa do rúmen e intestino delgado do animal nº 82. (b) Edema, congestão, úlceras e erosões no abomaso do animal nº 81. (c) Presença de antígeno viral difuso no citoplasma de células epiteliais do rúmen (pontas de setas). (d) Células mononucleares na polpa branca do baço, positivas para antígenos virais (pontas de setas)..... 47

LISTA DE QUADROS E TABELAS

CAPÍTULO 1

- QUADRO 1** - Anticorpos neutralizantes contra os vírus homólogos, induzidos pela imunização de ovelhas com duas amostras modificadas do vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV)..... 22
- QUADRO 2** - Atividade neutralizante do soro de ovelhas imunizadas com os vírus modificados, frente às amostras homólogas e isolados do vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV-1 e BVDV-2).... 23
- QUADRO 3** - Presença de vírus em secreções nasais, sangue e tecidos uterinos e fetais de ovelhas vacinadas com os vírus modificados e desafiadas com amostras heterólogas do BVDV..... 24

CAPÍTULO 2

- TABELA 1** - Achados clínicos e patológicos em bezerros inoculados com amostras brasileiras do vírus da Diarréia Viral Bovina tipo-2 (BVDV - 2).... 48

TABELA 2 - Distribuição de vírus e antígenos virais em tecidos de bezerros inoculados com amostras brasileiras do vírus da Diarréia Viral Bovina tipo - 2 (BVDV – 2).....	49
--	----

SUMÁRIO

LISTA DE QUADROS E TABELAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. CAPÍTULO 1 - PROTEÇÃO FETAL CONTRA O VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA (BVDV) EM OVELHAS IMUNIZADAS COM DUAS AMOSTRAS DE BVDV ATENUADAS EXPERIMENTALMENTE	4
2.1 ABSTRACT.....	5
2.2 RESUMO.....	6
2.3 INTRODUÇÃO.....	7
2.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	11
2.4.1 Células e vírus	11
2.4.2 Obtenção dos vírus vacinais	12
2.4.3 Teste de inocuidade para bovinos	12
2.4.4 Teste de inocuidade para fetos ovinos	13
2.4.5 Avaliação de proteção fetal	13
2.4.6 Pesquisa de vírus	14
2.4.7 Sorologia	15
2.5 RESULTADOS.....	16
2.5.1 Teste de inocuidade para bovinos	16
2.5.2 Teste de inocuidade para fetos ovinos	17
2.5.3 Resposta sorológica	18
2.5.4 Proteção fetal	19
2.6 DISCUSSÃO	25
2.7 REFERÊNCIAS	31

3 – CAPÍTULO 2 - ENFERMIDADE GASTROENTÉRICA E RESPIRATÓRIA EM BEZERROS INOCULADOS COM AMOSTRAS BRASILEIRAS DO VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA TIPO 2 (BVDV-2)	37
3.1 – RESUMO.....	38
3.2 – SUMMARY.....	39
3.3 - INTRODUÇÃO.....	40
3.4 – MATERIAL E MÉTODOS.....	42
3.4.1 – Vírus e células.....	42
3.4.2 – Animais e inoculação.....	43
3.4.3 – Monitoramento clínico, virológico e sorológico.....	43
3.4.4 – Histologia e imuno-histoquímica.....	44
3.5 - RESULTADOS.....	44
3.6 - DISCUSSÃO.....	50
3.7 – FONTES DE AQUISIÇÃO.....	55
3.8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
4 - CONCLUSÕES.....	59
5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

INTRODUÇÃO

O vírus da Diarréia Viral Bovina (*bovine viral diarrhea virus*, BVDV) é considerado um dos patógenos mais importantes para a pecuária bovina mundial. Isto deve-se à sua ampla distribuição geográfica, alta prevalência e pela capacidade de produzir diversas manifestações clínicas nos animais infectados. O BVDV está classificado no gênero *Pestivirus*, membro da família *Flaviviridae*, juntamente com o vírus da Peste Suína Clássica (*hog cholera virus*) e o vírus da Doença da Fronteira (*border disease virus* - BDV) de ovinos (HORZINEK, 1991; DONIS, 1995). Os pestivírus são vírus pequenos (40-60nm de diâmetro), e contém um nucleocapsídeo icosaédrico envolto por um envelope lipoprotéico (HORZINEK, 1991). O genoma é composto por uma molécula de RNA de cadeia simples, polaridade positiva, com cerca de 12,5 kb. O envelope é formado por uma membrana lipídica derivada de membranas celulares e contém pelo menos três glicoproteínas codificadas pelo vírus: gp53/E2, gp48/E0 e gp25/E1 (DONIS, 1995).

Com base na capacidade de produção de citopatologia em células de cultivo, os isolados de BVDV podem ser classificados em não-citopatogênicos (NCP) ou citopatogênicos (CP) (GILLESPIE et al., 1962). As amostras NCP são predominantes entre os isolados de campo e as amostras CP não ultrapassam 5%, sendo restritas a animais que desenvolvem a Doenças das Mucosas (DM) (DUBOVI, 1992). A caracterização de isolados de campo do BVDV por anticorpos

monoclonais e sorologia cruzada tem demonstrado uma ampla diversidade antigênica. No entanto, ainda não foi possível o estabelecimento definitivo de sorotipos (DUBOVI, 1992). Através de análise de regiões conservadas do genoma, pode-se dividir os isolados em genótipos 1 e 2 (BVDV - 1 e BVDV - 2) (PELLERIN et al., 1994; RIDPATH et al., 1994; van RIJN et al., 1997). As cepas tradicionais usadas em testes diagnósticos e vacinas são classificadas como BVDV - 1 e as amostras pertencentes ao genótipo 2 (BVDV - 2) foram inicialmente associadas com trombocitopenia e eventos agudos hemorrágicos (PELLERIN et al., 1994; RIDPATH et al., 1994).

O BVDV pode produzir diversas manifestações clínicas em bovinos, que incluem desde infecções subclínicas, doença gastroentérica, respiratória ou hemorrágica, até enfermidades fatais como a DM (BAKER, 1995). A infecção de fêmeas prenhes frequentemente resulta em transmissão transplacentária e infecção fetal, podendo levar à morte embrionária, abortos, mumificação fetal, natimortos, teratogenia ou o nascimento de terneiros fracos e inviáveis. Em fêmeas prenhes infectadas com amostras NCP entre o dia 42 e 125 da gestação, a infecção fetal pode resultar na geração de terneiros persistentemente infectados (PI). Os animais PI constituem-se em fontes de disseminação do vírus (McCLURKIN et al., 1984).

O controle da infecção pelo BVDV baseia-se na identificação e descarte dos animais PI, associado ou não ao uso de vacinação (DUBOVI, 1992; BOLIN 1995; van OIRSCHOT et al., 1999). Atualmente, as vacinas utilizadas no combate à infecção pelo BVDV podem ser com vírus vivo modificado ou com vírus inativado. A

diversidade antigênica das amostras de campo e a dificuldade de obter-se proteção fetal são os maiores obstáculos para o sucesso da vacinação no controle da infecção (DUBOVI, 1992; van OIRSCHOT et al., 1999).

Estudos recentes demonstraram uma grande diversidade antigênica entre amostras brasileiras de BVDV (BOTTON et al., 1998), além de uma resposta sorológica inadequada, principalmente frente ao BVDV-2, induzida por vacinas comerciais (VOGEL et al., 2001; 2002). Por isso, a produção de vacinas que contenham amostras regionais e representativas dos isolados locais pode ser necessária para a indução de uma resposta imunológica de amplo espectro (FLORES et al., 2000). Com esse objetivo, duas amostras CP do BVDV (BVDV-1, IBSP-2; BVDV-2, VS-253) foram atenuadas para serem avaliadas como vacina experimental.

Os objetivos do presente trabalho foram: **1.** avaliar essas duas cepas virais com relação a: i) atenuação para bovinos e fetos ovinos, ii) imunogenicidade, iii) espectro de reatividade antigênica e iv) capacidade de induzir proteção fetal em fêmeas gestantes; **2.** avaliar a virulência e estudar a patogenia da infecção por dois isolados locais de BVDV - 2 com vistas à sua utilização para desafio em testes de proteção vacinal. Essas duas etapas estão apresentadas separadamente a seguir, sob a forma de capítulos.

CAPÍTULO 1

PROTEÇÃO FETAL CONTRA O VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA (BVDV) EM OVELHAS IMUNIZADAS COM DUAS AMOSTRAS DE BVDV MODIFICADAS EXPERIMENTALMENTE¹

Mário Celso Sperotto Brum², Rudi Weiblen³, Eduardo Furtado Flores⁴, Fernando
Luiz Tobias⁵, Evandro Reinoldo Winkelmann⁶.

artigo submetido ao periódico Pesquisa Veterinária Brasileira

¹Parte da dissertação de mestrado do primeiro autor apresentado ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria. Trabalho realizado com suporte financeiro do MCT, CNPq, Capes e Finep (Pronex em virologia Veterinária, 215/96).

² Médico Veterinário, aluno do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria.

³ Médico Veterinário, MSc, PhD, Professor Titular do Departamento de Medicina Veterinária, Centro de Ciências Rurais, e do Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Centro de Ciências da Saúde, UFSM, Bolsista do CNPq (520161/97-1).

⁴ Médico Veterinário, MSc, PhD, Professor Adjunto do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Rurais e Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Centro de Ciências da Saúde, UFSM. Bolsista CNPq (520758/96-0). DMVP/CCR/UFSM, CEP 97105-900. Santa Maria, RS. Fone/fax: 55-220 8034. E-mail: flores@ccr.ufsm.br. Autor para correspondência.

⁵ Médico Veterinário, MSc, Professor - Centro Universitário Vila Velha, UVV, ES.

⁶ Acadêmico de Medicina Veterinária, Bolsista de Iniciação Científica, CNPq.

ABSTRACT. - Brum, M. C. S., Weiblen, R., Flores, E. F., Tobias, F. L., Winkelmann, E.R. 2002 [**Fetal protection against bovine viral diarrhea virus (BVDV) in pregnant ewes immunized with two BVDV strains experimentally attenuated**]. Proteção fetal contra o vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV) em ovelhas prenhes imunizadas com duas amostras de BVDV atenuadas experimentalmente. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 22()xx. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, DMVP/CCR/UFSM, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil.

Two isolates of bovine viral diarrhea virus (BVDV) submitted to multiple passages in tissue culture associated with ultraviolet irradiation were evaluated as vaccine candidates. The attenuation of the modified viruses was assessed in calves and in pregnant ewes. Intramuscular inoculation of the viruses in four seronegative calves produced only a mild and transient rise in body temperature, followed by the production of high titers of neutralizing antibodies. The viruses were not detected in nasal secretions or in the blood following inoculation. However, intramuscular inoculation of these viruses in four pregnant ewes resulted in transplacental transmission and infection of all fetuses. To assess fetal protection conferred by immunization, pregnant ewes immunized twice with the modified viruses were subsequently challenged by intranasal inoculation of BVDV-1 (SV-126.8, n=6) or BVDV-2 (SV-260, n=5). At the day of challenge (134 days after the second immunization), all ewes had high titers of neutralizing antibodies (256 to >4096) to the vaccine viruses and variable titers (8 to >4096)

to Brazilian BVDV-1 and BVDV-2 field isolates. Fifteen days after challenge, the ewes were euthanized and fetal tissues were examined for infectivity. All fetuses from non-vaccinated, challenged ewes (n=4) were infected. In contrast, none of the fetuses from the immunized dams (n=11) were positive for virus, indicating that the immunological response induced by immunization with the vaccine candidate viruses was capable of preventing fetal infection. These results indicate that it is possible to achieve fetal protection to BVDV by induction of a strong immunological response using modified live vaccines.

INDEX TERMS: bovine viral diarrhoea virus, BVDV, vaccine, fetal protection, sheep.

RESUMO

Duas amostras do vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV) submetidas à múltiplas passagens em cultivo celular e radiação ultravioleta (UV) foram avaliadas como vacina. As amostras foram testadas quanto à sua atenuação para bezerros e fetos ovinos, espectro imunogênico, e capacidade de induzir proteção fetal em ovelhas prenhes. Inoculação intramuscular (IM) dos vírus modificados em quatro bezerros produziu apenas uma elevação discreta e passageira da temperatura corporal, seguida de produção de altos títulos de anticorpos neutralizantes. O vírus não foi detectado em secreções nasais ou sangue nos dias seguintes à inoculação. Porém, a inoculação IM desses vírus em quatro ovelhas prenhes foi seguida de transmissão transplacentária e infecção em todos os fetos.

Para os testes de proteção fetal, ovelhas prenhes previamente imunizadas com duas doses vacinais, foram inoculadas pela via intranasal com amostras de BVDV-1 (SV-126.8, n=6) ou BVDV-2 (SV-260, n=5). No dia do desafio (134 dias após a segunda dose), todos os animais apresentavam altos títulos de anticorpos neutralizantes (256 a >4096) contra os vírus vacinais; além de títulos variados (8 a >4096) contra vários isolados brasileiros de BVDV-1 e BVDV-2. Quinze dias após o desafio, as ovelhas foram sacrificadas e os tecidos fetais foram examinados para a presença de vírus. Todos os fetos das ovelhas controle não-vacinadas apresentaram-se (n=4) positivos para os vírus utilizados no desafio. Em contraste, nenhum feto das ovelhas imunizadas (n=11) foi positivo para vírus, indicando que a resposta imunológica induzida pela vacinação com os vírus modificados foi capaz de prevenir a infecção fetal. Estes resultados indicam que é possível obter-se proteção fetal contra o BVDV através da indução de forte resposta imunológica pelo uso de vacinas vivas modificadas.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: vírus da Diarréia Viral Bovina, BVDV, vacina, proteção fetal, ovelhas.

INTRODUÇÃO

O vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV) é um dos patógenos mais importantes de bovinos, sendo o responsável por grandes perdas econômicas para a pecuária bovina em todo mundo. O BVDV está classificado na família *Flaviviridae*, gênero *pestivirus*, juntamente com o vírus da Peste Suína Clássica

(CFSV) e o vírus da Doença da Fronteira (BDV) de ovinos (Horzinek 1991). Os pestivírus são vírus envelopados, com diâmetro entre 40 e 60nm, cujo genoma consiste de uma fita simples de RNA, polaridade positiva, com 12,5kb (Donis 1995). Isolados de campo do BVDV podem ser classificados em citopatogênicos (CP) e não-citopatogênicos (NCP), baseado no efeito da sua replicação em células de cultivo (Gillespie et al. 1960). Amostras NCP predominam entre os isolados de campo, já as amostras CP não ultrapassam 5% e são isoladas quase que exclusivamente de animais acometidos pela Doença das Mucosas (Dubovi 1992). Uma característica marcante entre isolados de campo do BVDV é a grande diversidade antigênica; porém, o estabelecimento definitivo de sorotipos ainda não foi possível. No entanto, a análise de regiões conservadas do genoma revelou a existência de dois genótipos: BVDV tipos 1 e 2 (BVDV-1 e BVDV-2) (Pellerin et al. 1994, Ridpath et al. 1994, van Rijn et al. 1997). As amostras clássicas, utilizadas nos testes laboratoriais e na produção de vacinas pertencem ao genótipo BVDV-1. Amostras classificadas como BVDV-2 foram inicialmente identificadas em surtos graves ocorridos na América do Norte no final da década de 80 (Rebhun et al. 1989, Carman et al. 1998). Posteriormente, constatou-se que vírus do genótipo BVDV-2 estavam circulando na população bovina da América do Norte desde a década de 60 e não devem ser considerados sinônimos de alta virulência (Ridpath et al. 1994, 2000).

A infecção de animais susceptíveis pelo BVDV pode produzir uma variedade de sinais clínicos (Baker 1995). A infecção subclínica é aparentemente a forma mais freqüente. Uma das características da infecção é uma

imunodepressão, tornando os animais susceptíveis a outros patógenos (Baker 1995). Clinicamente, o BVDV pode produzir doença respiratória, digestiva, reprodutiva, a Doença das Mucosas (DM) e síndrome hemorrágica (HS) (Baker 1995). As maiores perdas são atribuídas à infecção de fêmeas prenhes, e estão diretamente associadas ao fase gestacional e ao tipo de amostra viral. A infecção de fêmeas prenhes pode cursar com reabsorção embrionária, abortos, mumificações, natimortalidade, malformações fetais, nascimento de terneiros fracos, persistentemente infectados (PI) e imunotolerantes ao vírus. O nascimento de animais imunotolerantes é resultado freqüente da infecção transplacentária entre os dias 45 e 125 de gestação, com amostras NCP (McClurkin et al. 1984). Os animais PI replicam e excretam o vírus durante toda a vida, constituindo-se no principal reservatório do vírus (Houe 1995).

O controle da infecção pelo BVDV baseia-se na identificação e eliminação dos animais PI, associado ou não ao uso de vacinas para proteger os animais susceptíveis (Dubovi 1992, Bolin 1995, van Oirschot et al. 1999). As vacinas devem proteger os animais da doença clínica e principalmente impedir a infecção transplacentária e a conseqüente infecção fetal (Bolin 1995, van Oirschot et al. 1999). Atualmente existem dois tipos principais de vacinas contra o BVDV; as vacinas inativadas e as vacinas vivas modificadas (Bolin 1995, van Oirschot et al. 1999, Fulton & Burge 2001). As vacinas inativadas são formuladas com uma ou mais cepas de vírus; geralmente induzem uma produção fraca ou moderada de anticorpos, e necessitam de várias aplicações, além de reforços anuais (Bolin 1995). A maioria das vacinas vivas contém uma amostra CP, atenuada *in vitro* por

sucessivas passagens em cultivo celular, associado ou não à mutagênese química (Bolin 1995). Essas vacinas geralmente produzem imunidade mais sólida e duradoura, porém não devem ser administradas a fêmeas prenhes (Bolin 1995). A grande diversidade antigênica dos isolados de campo, e a recente identificação do BVDV-2, constituem-se em problemas críticos para obtenção de proteção através de vacinação (Dubovi 1992, van Oirschot et al. 1999). Além disso, um dos maiores problemas de virtualmente todas as vacinas contra o BVDV é a incapacidade de conferir proteção fetal completa. Com isso, além das perdas reprodutivas, animais PI continuam a ser gerados e contribuem para a perpetuação do vírus nos rebanhos (Bolin et al. 1991, Dubovi 1992).

A identificação do BVDV-2, aliada à baixa reatividade cruzada destes vírus com cepas vacinais (Ridpath et al. 1994, Flores et al. 2000), além de diferenças marcantes existentes entre as amostras vacinais e isolados de campo (Corapi et al. 1988, Reddy et al. 1995, Botton et al. 1998) levam a questionamentos sobre a eficácia das vacinas atuais. Estudos realizados no Brasil demonstraram a presença dos dois genótipos de BVDV (BVDV-1 e BVDV-2) (Canal et al. 1998, Gil 1998). Além disso, os isolados brasileiros de BVDV possuem uma grande diversidade antigênica, sendo algumas amostras muito diferentes dos vírus utilizados nas formulações de vacinas comerciais (Botton et al. 1998). Estudos da resposta sorológica conferida por vacinas comerciais disponíveis no mercado brasileiro revelaram a incapacidade dessas vacinas de induzir proteção fetal em ovinos e fraca indução de anticorpos neutralizantes em bovinos e ovinos (Vogel et al. 2001, 2002).

O objetivo do presente estudo foi testar duas amostras de BVDV como candidatas à cepas vacinais. Esses vírus foram submetidos a múltiplas passagens em cultivo celular, associado à mutagênese induzida por radiação ultravioleta (UV). Nesse estudo testou-se a inocuidade dessas cepas em bovinos e em ovelhas prenhes, assim como a capacidade de induzirem resposta sorológica e proteção fetal em ovelhas prenhes.

MATERIAL E MÉTODOS

Células e vírus: os procedimentos de multiplicação, titulação, isolamento e soroneutralização viral foram realizados com células de linhagem de rim bovino (MDBK - *Madin Darby bovine kidney* - ATCC CCL-22) livres de pestivírus. As células foram cultivadas em meio essencial mínimo (MEM), contendo penicilina (1,6 mg/L), estreptomicina (0,4 mg/L) e nistatina (0,02mg/L), suplementado com 10% de soro equino. As amostras CP dos vírus utilizados para a obtenção dos mutantes (VS-253 e IBSP-2) foram gentilmente cedidas pelo Dr. Ruben O. Donis (University of Nebraska, Lincoln, NE) e pela Dra. Edwiges Maristela Pituco (Instituto Biológico, São Paulo, SP), respectivamente. As amostras NCP SV-126.8 e SV-260 utilizadas no desafio são isolados brasileiros caracterizados como pertencentes aos genótipos BVDV-1 e BVDV-2, respectivamente (Gil 1998). Os vírus utilizados nos testes de soroneutralização (SN) cruzada são cepas laboratoriais (BVDV-1, Singer; BVDV-2, 890); e os isolados locais de BVDV

(LV-96; SV-126.1; SV-152.1; SV-153.1; SV-63, UFSM-1 e UFSM-4) foram caracterizados por Botton et al. (1998).

Obtenção dos vírus vacinais: para a obtenção dos vírus vacinais, utilizou-se duas amostras CP clonadas dos isolados IBSP-2 (BVDV-1) e VS-253 (BVDV-2). A metodologia para a obtenção dos vírus modificados foi descrita em detalhes por BRUM (manuscrito em preparação). Resumidamente, os vírus foram submetidos à sucessivas passagens em cultivo celular e clonagens associadas com exposição à radiação ultravioleta (UV) a cada passagem. O tratamento foi realizado de forma paralela e individual, repetindo-se por vinte vezes para a amostra VS-253 e dezessete vezes para a amostra IBSP-2.

Teste de inocuidade para bovinos: cinco bovinos machos, com idade entre 8 e 12 meses, soronegativos e livres do BVDV foram utilizados. Quatro animais foram imunizados com 1 ml do sobrenadante de cultivos celulares infectados com cada amostra viral, contendo $10^{6,88}$ DICC₅₀ (doses infectantes para 50% dos cultivos celulares) da amostra IBSP-2 e $10^{6,51}$ DICC₅₀ da amostra VS-253, pela via intramuscular (IM). Um animal permaneceu como controle. Após a inoculação, os animais foram monitorados clinicamente durante 14 dias. Swabs nasais e sangue foram coletados para isolamento viral e contagem leucocitária. Para a realização da contagem leucocitária coletou-se 5 ml de sangue contendo EDTA 10% (etileno diamino tetra acetado de sódio). A contagem foi realizada a partir do sangue total, com auxílio de câmara de Neubauer seguida de coloração de rotina e observação em microscópio óptico com aumento de 400X. A

soroconversão foi monitorada através de exames sorológicos realizados em amostras de soro coletadas nos dias 0, 7, 14 e 28 pós-inoculação (pi).

Teste de inocuidade para fetos ovinos: o experimento de inocuidade fetal foi realizado em quatro ovelhas prenhes, cruzas Corriedale, com idade entre 3 e 4 anos soronegativas para o BVDV. Os animais foram inoculados pela via IM com 1 ml de cada suspensão viral contendo $10^{6,51}$ DICC₅₀ (IBSP-2) e $10^{6,64}$ DICC₅₀ (VS-253). Após a inoculação, realizou-se monitoramento clínico diário até o dia 15 pi, com coleta de swabs nasais e sangue a cada 3 dias para pesquisa de vírus. No final deste período (dia 15 pi), os animais foram sacrificados e tiveram os úteros e fetos coletados para pesquisa de vírus.

Avaliação de proteção fetal: para o estudo de proteção fetal, utilizou-se ovelhas cruzas Corriedale, com idade entre 3 e 4 anos soronegativas para o BVDV. Os animais foram imunizados duas vezes com intervalo de 45 dias. Cada animal recebeu 1 ml de suspensão de cada uma das amostras virais contendo $10^{7,31}$ DICC₅₀ (IBSP-2) e $10^{6,61}$ DICC₅₀ (VS-253) pela via IM na primeira aplicação e doses de $10^{6,51}$ DICC₅₀ (IBSP-2) e $10^{6,54}$ DICC₅₀ (VS-253) na segunda aplicação. Aproximadamente 40 dias após a segunda dose, as ovelhas foram colocadas em cobertura durante 45 dias. Cinquenta dias após o final do período de monta, realizou-se exame ultra-sonográfico para diagnóstico de gestação. Onze ovelhas prenhes foram então desafiadas com as amostras heterólogas de BVDV-1 (SV-126.8, n=6) ou BVDV-2 (SV-260, n=5). O desafio foi realizado 134 dias após a segunda imunização, quando as ovelhas apresentavam entre 55 e 75 dias de gestação. O desafio foi realizado pela inoculação de uma suspensão viral contendo

$10^{6,64}$ DICC₅₀ (SV-126.8) ou $10^{6,51}$ DICC₅₀ (SV-260,) pela via intranasal. Quatro ovelhas não vacinadas foram utilizadas como controle, sendo duas inoculadas com cada amostra de vírus (SV-126.8 ou sv-260). Após o desafio, as ovelhas foram monitoradas clinicamente e a replicação e excreção do vírus foi monitorada através da pesquisa de vírus em swabs nasais e sangue coletados com intervalos de três dias até o dia 15 pós-desafio (pd). No dia 15 pd, os animais foram sacrificados e tiveram seus úteros e fetos coletados para pesquisa de vírus.

Pesquisa de vírus: tentativas de isolamento viral foram realizadas a partir de swabs nasais, leucócitos sanguíneos e tecidos maternos e fetais. Secreções nasais coletadas com auxílio de cotonetes de algodão foram acondicionadas em tubos plásticos contendo 1 ml de MEM com 5 vezes a concentração de uso de antibióticos (MEM-Atb) e centrifugadas (2700xg por 5 min) para separação de debris celulares. O sobrenadante foi inoculado em cultivos de células MDBK. A capa flogística foi obtida através da coleta de sangue em tubos contendo EDTA a 10%, seguido de centrifugação (1000xg por 10 min a 4° C). Os leucócitos foram aspirados e inoculados em cultivo celular. Para a pesquisa de vírus em tecidos, fragmentos de tecidos (aproximadamente 1 g) foram macerados com areia estéril e ressuspensos em MEM-Atb (10 ml), seguidos de centrifugação (1000xg por 10 min a 4°C). O sobrenadante foi removido e inoculado em células MDBK. Para o isolamento de vírus, utilizou-se placas de 24 cavidades contendo tapetes celulares de células MDBK pré-formados. O inóculo foi adsorvido por 2 h a 37°C, seguido de lavagem com MEM-Atb. Após, acrescentou-se meio de manutenção, sendo os cultivos mantidos em estufa contendo 5% de CO₂ a 37°C. Realizou-se três

passagens com intervalos de 72 horas. Para os vírus CP, detectou-se a presença de vírus através da observação do efeito citopatogênico, e para os vírus NCP utilizou-se a técnica de imunofluorescência indireta (IFA), conforme descrito por Botton et al. (1998), utilizando-se um "pool" de anticorpos monoclonais anti-BVDV (Corapi et al. 1988) e um conjugado anti-IgG de camundongo (FITC).

Sorologia: a detecção de anticorpos contra o BVDV foi realizada através da técnica de soroneutralização (SN), conforme descrito por Botton et al. (1998). Coletou-se sangue para obtenção do soro antes da imunização ou desafio e a diferentes intervalos após, de acordo com o experimento. Previamente ao teste, as amostras de soro foram inativadas a 56°C durante 1h. A atividade neutralizante das amostras de soro foi testada frente aos vírus vacinais (IBSP-2, VS-253), frente às amostras-padrão (BVDV-1 Singer e BVDV-2 890) e contra vários isolados brasileiros de BVDV. Os testes de SN foram realizados em placas de poliestireno de 96 cavidades, incubando-se diluições seriadas do soro (diluição inicial 1:4) frente à doses constantes do vírus (100 a 250 DICC₅₀/cavidade). Células MBDK foram utilizadas como indicador da replicação viral. O monitoramento da replicação viral foi realizado através da observação de efeito citopatogênico para as amostras CP ou através de IFA para as amostras NCP. O título neutralizante foi considerado a recíproca da maior diluição do soro capaz de prevenir a replicação viral. Para o cálculo da média foram utilizados todas as ovelhas vacinadas e desafiadas. As médias dos títulos foram transformadas em títulos médios geométricos (GMT; Thrusfield 1986) pela relação $GMT=2^a$, onde **a** é a média do \log_a do título de anticorpos.

RESULTADOS

Os vírus candidatos a cepas vacinais foram obtidos através de sucessivas passagens em cultivo de células MDBK, associado a exposição à radiação UV e clonagem a cada passagem. Os vírus obtidos no final das passagens (VS-253, 20 passagens; IBSP-2, 17 passagens) foram amplificados e utilizados para a imunização dos animais e em testes de inocuidade. Esses vírus apresentaram uma redução no tamanho de formação das placas em comparação com os vírus originais (dados não mostrados). Com base nessa alteração fenotípica, os vírus candidatos à cepas vacinais serão denominados de vírus modificados.

Teste de inocuidade para bovinos: para o teste de inocuidade para bovinos, utilizou-se cinco bezerros, sendo quatro inoculados (104, 105, 106 e 125) e um controle (PP) que permaneceu em contato com os demais. Após a inoculação IM dos vírus modificados, não foram observadas alterações de comportamento (apatia, depressão, apetite) ou sinais clínicos importantes. A única alteração clínica observada foi uma elevação bifásica discreta e passageira da temperatura corporal nos dias 4 e 7 (pi). No entanto, o animal controle também apresentou temperatura elevada durante todo o experimento. Observou-se também uma redução passageira nos valores leucocitários nos dias 1 e 2 (pi), tanto para os animais inoculados como para o controle. Esses valores, no entanto, permaneceram dentro dos limites fisiológicos. Nos dias 9, 10 e 11 pós-vacinação, os animais 104, 105 e 106 apresentaram secreção nasal serosa, que alguns momentos continha finas estrias de pus. No entanto, não detectou-se a presença de

vírus nas secreções nasais. Nos dias seguintes à inoculação, a pesquisa de vírus em secreções nasais e em leucócitos foi negativa, indicando ausência de excreção viral. Confirmando esses achados, o animal controle que permaneceu em contato no período pós-inoculação, permaneceu soronegativo durante todo o experimento. Apesar de não ter sido detectada excreção viral após a inoculação, todos os animais soroconverteram aos vírus vacinais, o que indica uma replicação viral eficiente. No dia 28 (pi), os títulos neutralizantes eram superiores a 256 em todos os animais vacinados. Esses resultados indicam que a inoculação IM dos vírus modificados resultou em replicação viral eficiente e em resposta sorológica de grande magnitude. A replicação viral, no entanto, não foi acompanhada de excreção viral detectável e de alterações clínicas importantes.

Teste de inocuidade para fetos ovinos: para a avaliação da inocuidade para fetos, utilizou-se quatro ovelhas prenhes com idade gestacional entre 85 e 105 dias. Após a inoculação dos vírus, não observou-se alterações clínicas nos animais inoculados. Também não detectou-se vírus em secreções nasais ou em leucócitos nos dias seguintes à inoculação (dias 1, 3, 6, 9, 12 e 15 pi). No dia 15 pi, as ovelhas foram sacrificadas e tiveram seus úteros e fetos coletados para exame macroscópico e pesquisa de vírus. Todos os tecidos maternos e fetais apresentaram aspecto normal. O vírus foi detectado nos placentomas dos animais 27 e 157, e nos fetos das ovelhas 27 (baço e pulmão), 29 (baço) e 31 (pulmão). Todas as ovelhas possuíam anticorpos neutralizantes anti-BVDV no dia do sacrifício, com títulos variando entre 32 e 64 para amostra IBSP-2 e entre 16 e 32 para a amostra VS-253. Todos os fetos foram soronegativos. Esses resultados

demonstram que os vírus modificados mantiveram a capacidade de replicar nos tecidos maternos e infectar os fetos ovinos após inoculação intramuscular.

Resposta sorológica: a resposta sorológica induzida pela imunização com os vírus modificados foi avaliada a diferentes intervalos após as imunizações. Os animais avaliados sorologicamente foram posteriormente utilizados para o teste de proteção fetal. A evolução dos títulos médios e individuais de anticorpos neutralizantes desenvolvidos contra os vírus homólogos após a imunização está apresentada na Figura 1 e Quadro 1. Já com a primeira imunização, os títulos médios atingiram valores moderados a altos no dia 45 (dia da segunda imunização, GMT= 272,4 para a amostra IBSP-2 e GMT= 308,6 para a amostra VS-253). Após a segunda aplicação, os títulos aumentaram progressivamente atingindo valores médios GMT= 617,3 para a amostra IBSP-2 e GMT= 744,4 para a amostra VS-253, no dia do desafio. Após o desafio, outro aumento nos títulos foi observado, atingindo valores médios GMT= 3373,4 para a amostra IBSP-2 e GMT= 2320,1 para a amostra VS-253 no dia do sacrifício (Figura 1). Os títulos individuais frente às amostras homólogas a diferentes intervalos estão apresentados no Quadro 1.

Com o soro coletado no dia do desafio, realizou-se testes de neutralização cruzada contra cepas-padrão e contra isolados locais de BVDV-1 e BVDV-2. Os títulos neutralizantes apresentados pelos animais nessa data estão apresentados no Quadro 2. Todos os animais imunizados produziram anticorpos com atividade neutralizante frente às amostras de vírus testadas. Títulos altos (>256) contra várias amostras de BVDV-1 e contra algumas amostras de BVDV-2 foram

produzidos pela maioria dos animais. No entanto, uma grande variação na atividade neutralizante foi observada quando determinadas amostras de soro foram testadas frente à diferentes vírus. Observou-se diferenças de títulos de até 7 vezes (8 para 1024) para alguns pares de soro-vírus. Em geral, os títulos neutralizantes frente à isolados brasileiros de BVDV-1 foram superiores aos títulos contra isolados brasileiros de BVDV-2 (Quadro 2). Esses resultados demonstraram que a imunização com os vírus modificados induziu a produção de níveis moderados a altos de anticorpos neutralizantes na maioria dos animais, principalmente contra amostras brasileiras de BVDV-1, mas também contra algumas amostras de BVDV-2.

Proteção fetal: para a avaliação da proteção fetal, as ovelhas imunizadas foram desafiadas 134 dias após a segunda dose vacinal através da inoculação IM de uma das amostras de vírus (BVDV-1, SV 126.8 ou BVDV-2, SV-260). No dia do desafio as ovelhas estavam com 55 a 75 dias de gestação. No período pós-desafio, não foram observadas alterações clínicas nos animais inoculados. Detectou-se vírus nas secreções nasais nos dias 1 e 3 pós-desafio em todos os animais, em pelo menos uma coleta. A maior frequência de excreção viral foi observada no dia 3, quando todos o animais excretaram vírus. Detectou-se viremia nos dias 3 e 6 pós-desafio em três animais e somente uma ovelha foi positiva nos dois dias (Quadro 3).

Quinze dias após o desafio, as ovelhas foram sacrificadas e tiveram seus úteros e fetos coletados para exame. Não se observou alterações macroscópicas nos tecidos uterinos e fetais das ovelhas vacinadas e controles. Os resultados da

pesquisa de vírus nos tecidos maternos e fetais estão apresentados no Quadro 3. Nenhum feto das ovelhas imunizadas e posteriormente desafiadas foi positivo para vírus, após três passagens do material em cultivo celular. Em contraste, todos os fetos das ovelhas controle não vacinadas foram positivos para vírus (Quadro 3). Esses resultados demonstram que a imunização dupla com os vírus modificados produziu uma resposta imunológica capaz de prevenir a transmissão do vírus aos fetos após inoculação IM das ovelhas com isolados de BVDV-1 e BVDV-2.

DISCUSSÃO

A imunização de ovelhas com os dois vírus modificados induziu uma resposta imunológica capaz de prevenir a infecção fetal após desafio intranasal com amostras de BVDV-1 e BVDV-2. Embora imunização com duas doses não seja comum para vacinas com vírus vivo, demonstrou-se que é possível se obter proteção fetal contra o BVDV com essa estratégia. A resposta sorológica induzida pela imunização foi de espectro amplo: o soro dos animais imunizados reagiu em títulos moderados e altos com a maioria dos isolados testados, principalmente de BVDV-1. Os vírus modificados não produziram sinais clínicos quando inoculados em bezerros, porém mantiveram a sua capacidade de atravessar a placenta e de infectar fetos ovinos após administração IM.

A necessidade da reformulação das vacinas comerciais utilizadas no Brasil tem sido sugerida a partir de análise antigênica de amostras brasileiras de BVDV e testes de vacinas comerciais (Botton et al. 1998, Flores et al. 2000, Vogel et al. 2001, 2002). Esses estudos detectaram uma ampla diversidade antigênica entre isolados brasileiros e diferenças marcantes com as cepas vacinais (Botton et al. 1998). A inclusão de uma cepa de BVDV-2 certamente iria ampliar o espectro de reatividade dos anticorpos induzidos pela vacinação. Nos Estados Unidos, as vacinas contra o BVDV formuladas nos últimos anos têm incluído necessariamente vírus dos dois genótipos (Fulton & Burge 2001). No presente estudo, foram escolhidas duas amostras CP para a produção dos vírus modificados: um isolado brasileiro de BVDV - 1 (IBSP-2) e um isolado norte-

americano de BVDV - 2 (VS-253). A amostra IBSP-2 foi isolada de um animal saudável que possuía o par NCP/CP (Tobias et al. 1998). Devido à falta de um isolado CP de BVDV - 2 brasileiro até o presente, foi escolhido o isolado norte-americano VS-253. A utilização de amostras CP na confecção de vacinas é indicada devido à facilidade de manipulação, capacidade de obter-se títulos altos e pela facilidade de monitorar a sua replicação em cultivo celular (Dubovi 1992).

A realização de múltiplas passagens em cultivo, associadas ou não à mutagênese química ou física, tem sido amplamente utilizado para atenuar vírus para produção de vacinas (Ellis 2001, Knipe & Howley 2001). Quando inoculados em bezerros, os vírus modificados não produziram sinais clínicos, com exceção de uma elevação discreta e passageira da temperatura corporal. No entanto, os títulos altos de anticorpos induzidos pela imunização demonstraram que houve replicação efetiva dos vírus vacinais nas ovelhas e nos bezerros. Como as amostras originais não foram testadas em animais, não se pode atribuir a baixa patogenicidade ao procedimento de atenuação realizado. Por outro lado, os testes de inocuidade realizados em ovelhas prenhes demonstraram que a atenuação dos vírus não foi suficiente para permitir a sua administração a fêmeas prenhes, pois os vírus vacinais retiveram a capacidade de replicar nos tecidos maternos e atravessar a placenta. Portanto, se utilizados como vacinas, esses vírus não deveriam ser utilizados para imunização de fêmeas gestantes, como tem sido recomendado para a maioria das vacinas vivas.

No Brasil atualmente só existem vacinas comerciais inativadas para o BVDV. No entanto, as vacinas com vírus vivo são universalmente aceitas como

mais eficazes. Além de possuírem menor custo, essas vacinas induzem proteção mais sólida e duradoura e geralmente não necessitam aplicações múltiplas (Bolin 1995, Potgieter 1995). A segurança dessas vacinas, no entanto, é questionável. Além da possibilidade de causar perdas embrionárias ou fetais quando aplicadas em fêmeas prenhes, essas vacinas podem induzir imunodepressão, reverter à virulência ou ocasionalmente recombinar com isolados de campo (Bolin 1995, Potgieter 1995, van Oirschot et al. 1999). A vacina viva termossensível descrita por Lobmann et al. (1984) e atualmente em uso na Europa é dos raros exemplos em que não ocorreu infecção fetal pelo vírus vacinal após administração à fêmeas prenhes. Outra desvantagem das vacinas com vírus vivo é a possibilidade, embora pequena, de indução de Doença das Mucosas quando administrada em animais PI (Bolin 1995, Becher et al. 2001).

Os títulos de anticorpos neutralizantes induzidos pela imunização foram muito superiores aos detectados em bovinos e ovinos imunizados com vacinas inativadas, principalmente frente ao BVDV-2 (Vogel et al. 2001; 2002). A aplicação de duas doses, com intervalo de 45 dias, objetivou provocar uma resposta anamnésica com aumento dos níveis de anticorpos. Aos 134 dias após a aplicação da segunda dose (dia do desafio) todos os animais possuíam títulos altos de anticorpos contra as amostras vacinais (Quadro 1). Em geral, os níveis e duração dos anticorpos induzidos pela vacinação com vacinas vivas são superiores as vacinas inativadas e de subunidades (Bolin 1995, Brusckhe et al. 1997, van Oirschot et al. 1999, Fulton & Burge 2001). Infelizmente, não foi possível acompanhar os animais por um tempo mais longo para monitorar a duração dos

títulos de anticorpos induzidos pela vacinação.

A proteção fetal através da vacinação é um requisito fundamental para o controle da infecção pelo BVDV. Estudos experimentais com vacinas vivas ou inativadas têm demonstrado diferentes graus de eficácia, desde proteção fetal completa (Howard et al. 1994), satisfatória (Brownlie 1995, Cortese et al. 1998), até ausência de proteção, mesmo em animais com títulos moderados a altos de anticorpos (Vogel et al. 2001). Os estudos de proteção fetal contra o BVDV conferida por vacinas devem ser analisados com critério, pois a utilização de amostras virais antigenicamente semelhantes aos vírus vacinais para o desafio ou o próprio vírus vacinal, dose viral do desafio, tempo entre vacinação e desafio e utilização de amostras com fraca capacidade de infectar o feto podem não refletir a realidade encontrada à campo. No campo, a proteção fetal observada tem sido geralmente incompleta, com perdas reprodutivas contínuas e geração de animais PI, mesmo em rebanhos vacinados sistematicamente (Bolin et al. 1991, Dubovi, 1992). No presente estudo, o desafio foi realizado 134 dias após aplicação da segunda vacinação, através da inoculação de amostras dos dois genótipos (SV-126.8, BVDV-1 ou SV-260, BVDV-2) pela via intranasal. A capacidade de infecção transplacentária desses dois isolados já havia sido demonstrada anteriormente (Bruschke et al. 1996, Scherer et al. 2001, Vogel et al. 2001) e foi confirmada no presente estudo pela infecção dos fetos das ovelhas não vacinadas. Tentativas de isolamento de vírus nos tecidos fetais das ovelhas imunizadas coletados 15 dias após o desafio foram negativas, demonstrando que a imunização

induziu uma resposta imunológica capaz de prevenir a infecção fetal pelas amostras de vírus utilizadas no desafio.

Ainda não foi possível estabelecer-se com precisão os títulos de anticorpos neutralizantes que são necessários para conferir proteção fetal. Tem sido demonstrado que mesmo a presença de títulos altos de anticorpos não é um indicativo seguro de proteção fetal induzida por vacinas inativadas (Dubovi 1992, Bolin 1995, Potgieter 1995, van Oirschot et al. 1999). Em vacinas de subunidades, proteção fetal foi obtida somente em animais com altos títulos de anticorpos (>2048) e que foram desafiados com a amostra homóloga (Bruscke et al. 1997). A imunidade conferida pela infecção natural pode induzir proteção fetal, porém a infecção transplacentária pode ocorrer quando utiliza-se amostras antigenicamente diferentes para o desafio (Paton et al. 1999). O mecanismo imunológico de proteção fetal ainda é pouco conhecido, existindo indicativos de que a associação da resposta humoral e celular possibilitaria a prevenção da infecção fetal (Potgieter 1995, Dubovi 1992). No presente estudo, os fetos de todas as ovelhas imunizadas foram protegidos da infecção quando desafiados com amostras heterólogas do BVDV, embora três ovelhas apresentassem títulos relativamente baixos ou moderados (8, 32 e 64). Nesses casos específicos, é provável que a resposta celular, juntamente com mecanismos imunológicos associado a anticorpos sem atividade neutralizante tenham tido participação decisiva no mecanismo de proteção.

A reatividade sorológica cruzada detectada nos animais imunizados indica um amplo espectro de reatividade, pois as amostras de soro foram testadas contra

amostras de ambos os genótipos e antigenicamente distintas entre si (Botton et al. 1998, Flores et al. 2000). Todos os animais imunizados reagiram contra os amostras testadas; porém, observou-se uma variação marcante nos títulos entre animais e diferentes isolados. Em geral, os títulos maiores foram contra as amostras brasileiras de BVDV-1. Isso pode ser explicado pelo fato da amostra IBSP-2 ter sido isolada no Brasil e ser mais semelhante antigenicamente às outras amostras de BVDV-1 utilizadas. Os animais reagiram sorologicamente em magnitude inferior frente às amostras de BVDV - 2 brasileiras, provavelmente pelo fato da cepa de BVDV-2 vacinal (VS-253) ser norte-americana. Essa cepa é antigenicamente diferente dos isolados brasileiros de BVDV-2 já caracterizadas, com exceção da amostra SV-63 (Flores E.F. et al. 2001). A inclusão de uma amostra brasileira de BVDV - 2 na formulação das vacinas poderia resultar em uma reatividade maior com os isolados brasileiros deste genótipo. Nesse sentido, a inclusão de várias cepas antigenicamente diferentes e representativas dos isolados locais nas vacinas pode ser uma alternativa.

Em resumo, os resultados obtidos demonstraram que é possível se obter proteção fetal contra o BVDV em ovinos através de imunização com vírus vivos modificados. Testes adicionais são necessários para determinar se resultados semelhantes podem ser obtidos em bovinos. A inclusão de várias amostras atenuadas nas vacinas, produzindo resposta sorológica de amplo espectro, pode ser eficiente para induzir proteção fetal contra diferentes isolados de campo. Embora duas vacinações não seja usual para vacinas com vírus vivo, esse protocolo pode representar uma boa alternativa quando se deseja níveis adequados

de proteção fetal.

REFERÊNCIAS

- Baker, J. C. 1995. The clinical manifestations of bovine viral diarrhoea infection. *Vet. Clin. North Am.*, 11(3):425-446.
- Becher, P., Orlich, M. & Thiel, H. J. 2001. RNA recombination between persisting pestivirus and a vaccine strain: generation of cytopathogenic virus and induction of lethal disease. *J. Virol.*, 75(14):6256-6264.
- Bolin, S. 1995. Control of bovine viral diarrhoea virus infection by use of vaccination. *Vet. Clin. North Am.*, 11(3):615-626.
- Bolin, S., Littledike, E.T. & Ridpath, J.F. 1991. Serologic detection and practical consequences of antigenic diversity among bovine viral diarrhoea virus in a vaccinated herd. *Am. J. Vet. Res.*, 52:1033-1047.
- Botton, S.A., Silva, A.M., Brum, M.C.S., Flores, E.F. & Weiblen, R. 1998. Antigenic characterization of Brazilian bovine viral diarrhoea virus isolates by monoclonal antibodies and cross-neutralization. *Braz. J Med. Biol. Res.*, v.31(11):1429-1438.
- Brownlie, J., Clarke, M.C., Hooper, L.B. & Bell, G.D. 1995. Protection of bovine fetus from bovine viral diarrhoea virus by means of a new inactivated vaccine. *Vet. Rec.*, 137:58-62.
- Bruschke, C.J.M., Moormann, R.J.M., van Oirschot, J.T. & van Rijn, P.A. 1997. A subunit vaccine based on glycoprotein E2 of bovine virus diarrhoea virus

- induces fetal protection in sheep against homologous challenge. *Vaccine*, 15(17/18):1940-1945.
- Bruschke, C.J.M., van Rijn, P.A., Moormann, R.J.M. & van Oirschot, J.T. 1996. Antigenically different pestivirus strains induce congenital infection in sheep: a model for a bovine virus vaccine efficacy studies. *Vet. Microbiol.*, 50:33-43.
- Canal, C.W., Strasser, M., Hertig, C., Masuda, A. & Peterhans, E. 1998. Detection of antibodies to bovine viral diarrhea virus (BVDV) and characterization of genomes of BVDV from Brazil. *Vet. Microbiol.*, 63:85-97.
- Carman, S., van Drumel, T., Ridpath, J.F., Hazlett, M., Alves, D., Dubovi, E.J., Tremblay, R., Bolin, S.R., Godkin, A. & Anderson, N. 1998. Severe acute bovine viral diarrhea in Ontario, 1993-1995. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 10:27-38.
- Corapi, W.V., Donis, R.O. & Dubovi, E.J. 1988. Characterization of a panel of monoclonal antibodies and their use in the study of the antigenic diversity of bovine viral diarrhea virus. *Am. J. Vet. Res.*, 51(9):2823-2827.
- Cortese, V.S., Grooms, D.L., Ellis, J., Bolin, S.R., Ridpath, J.F. & Brock, K.V. 1998. Protection of pregnant cattle and their fetuses against infection with bovine viral diarrhea virus type 1 by use of a modified-live vaccine. *Am. J. Vet. Res.*, 59(11):1409-1413.
- Donis, R.O. 1995. Molecular biology of bovine viral diarrhea virus and its interactions with the host. *Vet. Clin. North Am.*, 11(3):393-423.
- Dubovi, E.J. 1992. Genetic diversity and BVD virus. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 15(3):155-162.

- Ellis, R.W. 2001. Technologies for the design, discovery, formulation and administration of vaccines. *Vaccine*, 19:2681-2687.
- Flores, E.F., Gil, L.H.V., Botton S.A., Weiblen, R., Ridpath, J.L., Kreutz, L.C., Pilati, C., Driemeyer, D., Moojen, V. & Wendelstein, A.C. 2000. Clinical, pathological and antigenic aspects of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) type 2 isolates identified in Brazil. *Vet. Microbiol*, 77:175-183.
- Flores, E.F. Ridpath, J. F. , Weiblen, R. , Vogel, F.S.F. & Gil, L.H.V.G. 2001. Phylogenetic analysis of Brazilian bovine viral diarrhoea virus type 2 (BVDV) isolates: evidence for a subgenotype within BVDV-2. XII National Meeting of Virology and IV Mercosul Meeting of Virology. Caldas Novas, GO, Brazil. PE-03.
- Fulton, R.W. & Burge, L.J. 2001. Bovine viral diarrhoea virus type 1 and 2 antibody response in calves receiving modified live virus or inactivated vaccine. *Vaccine*, 19:264-274.
- Gil, L.H.V.G. 1998. Sequenciamento, análise filogenética e caracterização de polipeptídeos não-estruturais de amostras do vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV). Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria. 69p.
- Gillespie, J.H., Baker, J.A. & McEntee, K.A. 1960. A cytopathogenic strain of bovine viral diarrhoea virus. *Cornell. Vet.*, 50:73-79.
- Horzinek, M.C. 1991. Pestivirus-taxonomic perspectives. *Arch Virol*, suppl.3:1-5.
- Houe, H. 1995. Epidemiology of bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Clin. North Am.*, 11(3):521-548.

- Howard, C.J., Clarke, M.C., Sopp, P. & Brownlie, J. 1994. Systemic vaccination with inactivated bovine virus diarrhoea virus protects against respiratory challenge. *Vet. Microbiol.*, 42:171-179.
- Knipe, D.M. & Howley, P.M. 2001. *Fields Virology*. Lippincott, Philadelphia, Cap. 2:19-52.
- Lobmann, M., Charlier, P., Florent, G. & Zygraich, N. 1984. Clinical evaluation of a temperature-sensitive bovine viral diarrhoea virus strain. *Am. J. Vet. Res.*, 45:2498-2503.
- McClurkin, A.W., Littledike, E.T., Cutlip, R.C., Frank, G.H., Coria, M.F. & Bolin, S.R. 1984. Production of cattle immunotolerant to BVD virus. *Can. J. Comp. Med.*, 48:156-161.
- Paton, D.J., Sharp, G. & Ibata, G. 1999. Foetal cross-protection experiments between type 1 and 2 bovine viral diarrhoea virus in pregnant ewes. *Vet. Microbiol.*, 64:185-196.
- Pellerin, C., van den Hurk, J., Lecomte, J., & Tussen, P. 1994. Identification of a new group of bovine viral diarrhoea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. *Virology*, 203(2):260-268.
- Potgieter, L.N.D. 1995. Immunology of bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Clin. North Amer.*, 11(3): 501:520.
- Rebhun, W.C., French, T.W. Pedrizet, J.A., Dubovi, E.J., Dill, S.G. & Karcher, L.F. 1989. Thrombocytopenia associated with acute bovine virus diarrhoea infection in cattle. *J. Vet. Int. Med.*, 3(1):42-46.

- Reddy, J. R., Xue, W., Rivera, S. & Minocha, H.C. 1995. Antigenic differences between a field isolate and vaccine strains of bovine viral diarrhoea virus. *J. Clin. Microbiol.*, 33(8):2159-2161
- Ridpath, J. F., Neil, J. D., Frey, M. & Landgraf, J.G. 2000. Phylogenetic, antigenic and clinical characterization of type 2 BVDV from North America. *Vet. Microbiol.*, 77:145-155.
- Ridpath, J. F., Bolin, S. & Dubovi, E. J. 1994. Segregation of bovine viral diarrhoea virus into genotypes. *Virology*, 206(1): 66-74.
- Scherer, C.F.C., Flores, E.F., Weiblen, R., Caron, L., Irigoyen, L.F., Neves, J.P. & Maciel, M.N. 2001. Experimental infection of pregnant ewes with bovine viral diarrhoea virus type-2 (BVDV-2): effects on the pregnancy and fetus. *Vet. Microbiol.*, 77:285-299.
- Thrusfield, M. 1986. *Veterinary epidemiology*. London:Butterworth, 1986. 280p. Cap. 16: Serological epidemiology : p.175-185.
- Tobias, F.L., Odeon, A., Pituco, E.M., Weiblen, R., Garcez, D.C. & Flores, E.F. 1998. Análise antigênica e molecular de amostras citopáticas do vírus da diarréia viral bovina. *Ciência Rural*, 30(1):129-135.
- van Oirschot, J., Brusckhe, C. J. M. & van Rijn, P. A. 1999. Vaccination of cattle against bovine viral diarrhoea. *Vaccine*, 17:169-183.
- van Rijn, P.A., van Gennip, H.G.P., Leendertse, C.H., Brusckhe, C.J.M., Paton, D.J., Moormann, R.J. & van Oirschot, J.T. 1997. Subdivision of the Pestivirus genus based on envelope glycoprotein E2. *Virology*, 237:337-348.

- Vogel, F.S.F., Flores, E.F., Weiblen, R., Meyer, S.V., Quadros, V.L. & Oldoni, I. 2002. Magnitude, duração e especificidade da resposta sorológica em bovinos vacinados contra o vírus da Diarréia Viral Bovina. *Ciência Rural*, 32 (1):83-89.
- Vogel, F.S.F., Scherer, C.F.C., Flores, E.F., Weiblen, R., Lima, M. & Kunrath, C.F. 2001. Resposta sorológica e avaliação de proteção fetal em ovelhas prenhes vacinadas contra o vírus da diarréia viral bovina (BVDV). *Ciência Rural*, 31 (5):831-838.

CAPÍTULO 2

ENFERMIDADE GASTROENTÉRICA E RESPIRATÓRIA EM BEZERROS INOCULADOS COM AMOSTRAS BRASILEIRAS DO VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA TIPO 2 (BVDV-2)¹

GASTROENTERIC AND RESPIRATORY DISEASE IN CALVES INOCULATED WITH BRAZILIAN ISOLATES OF BOVINE VIRAL DIARRHEA VIRUS TYPE 2 (BVDV - 2)

Mário Celso Sperotto Brum², Charles Fernando Capinos Scherer³, Eduardo Furtado Flores⁴, Rudi Weiblen⁵, Claudio Severo Lombardo de Barros⁶, Ingeborg Maria Langohr⁶

artigo submetido ao periódico Ciência Rural

¹ Trabalho realizado com suporte financeiro do MCT, CNPq, CAPES e FINEP (Pronex em Virologia Veterinária, 215/96).

² Médico Veterinário, Acadêmico do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, DMVP/CCR/UFSM.

³ Médico Veterinário, MSc, Professor Substituto do Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Centro de Ciências da Saúde.

⁴ Médico Veterinário, MSc, PhD, Professor Adjunto do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Rurais e do Departamento de Microbiologia e Parasitologia, UFSM. Bolsista do CNPq (520758/96-0). DMVP/CCR/UFSM, CEP 97105-900. Santa Maria, RS. Fone/Fax: 55 220 8034; e-mail: flores@ccr.ufsm.br. Autor para correspondência.

⁵ Médico Veterinário, MSc, PhD, Professor Titular do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Rurais e do Departamento de Microbiologia e Parasitologia, UFSM. Bolsista do CNPq (520161/97-1).

⁶ Médico Veterinário, Setor de Patologia Veterinária, Departamento de Patologia, Centro de Ciências da Saúde, UFSM.

RESUMO

Duas amostras brasileiras do vírus da Diarréia Viral Bovina tipo 2 (BVDV-2) foram inoculadas em bezerros com o objetivo de estudar a virulência e a patogenia da infecção viral. Previamente à inoculação, os animais foram imunodeprimidos com dexametasona. Quatro bezerros com idades entre 45 e 90 dias (grupo A) foram inoculados com a amostra SV-260 (n=2) ou LV-96 (n=2) e quatro bezerros com 6 a 8 meses de idade foram inoculados com a amostra SV-260 (grupo B). Após a inoculação, os bezerros do grupo A apresentaram anorexia, depressão, hipertermia, sinais de infecção respiratória e diarréia profusa acompanhada de melena em dois animais. Os sinais respiratórios e digestivos progrediram e os animais morreram ou foram sacrificados *in extremis* entre os dias 7 e 12 pós-inoculação. Úlceras e erosões no trato digestivo (língua, n=4; esôfago, n=1; rúmen, n=1 e abomaso, n=3), edema pulmonar (n=4) e na mucosa do abomaso (n=3), equimoses e sufusões na serosa do baço (n=2), rúmen, intestino delgado e ceco (n=1), coração (n=1) e na mucosa da bexiga (n=1) e intussuscepção intestinal (n=1) foram os achados macroscópicos mais marcantes. Úlceras e erosões, acompanhadas de infiltrado mononuclear na mucosa e submucosa do trato digestivo e depleção linfóide nos linfonodos e placas de Peyer foram as alterações microscópicas mais freqüentes. O vírus foi detectado em vários tecidos e órgãos. Antígenos virais foram demonstrados por imunohistoquímica principalmente em células epiteliais do trato digestivo; em células mononucleares nos espaços perivasculares e peribronquiais; na cápsula e septos

de linfonodos; e em linfócitos e células mononucleares das placas de Peyer e baço. Os animais do grupo B apresentaram depressão, hipertermia, sinais moderados de infecção respiratória e digestiva, ulcerações na língua e bochecha e recuperaram-se após alguns dias. Esses resultados demonstram que as amostras de BVDV-2 foram capazes de reproduzir a enfermidade aguda quando inoculadas em bezerros, e que as conseqüências clínico-patológicas da infecção foram mais severas nos animais mais jovens.

Palavras-chave: vírus da Diarréia Viral Bovina tipo 2, BVDV-2, infecção experimental.

SUMMARY

Two Brazilian isolates of bovine viral diarrhea virus type 2 (BVDV-2) were inoculated in calves to test the virulence and to study the pathogenesis of the viral infection. Previously to vírus inoculation, the calves were immunosuppressed with dexametasona. Four 45 to 90-days-old calves (group A) were inoculated with isolate SV-260 (n=2) or LV-96 (n=2), and four 6 to 8-months-old calves (group B) were inoculated with isolate SV-260. Following virus inoculation, group A calves showed anorexia, depression, hyperthermia, signs of respiratory infection and profuse diarrhea, bloody in two cases. The respiratory and digestive signs progressed and the animals died or were euthanized *in extremis* between days 7 and 12 post-inoculation. Ulcers and erosions in the digestive tract (tongue, n=4; esophagus, n=1; rumen, n=1 and abomasum, n=3), edema of the lung (n=4)

and abomasal mucosa (n=3), echimosis and suffusions in the spleen serosa (n=2), rumen, small intestine and ceccum (n=1), heart (n=1) and urinary bladder mucosa (n=1) and intestinal intussuseption (n=1) were the most prominent findings. Ulcerations and erosions accompanied by mononuclear cell infiltrates in the digestive tract mucosa and submucosa, and lymphoid depletion in the lymph nodes and Peyer's patches were frequently observed. Infectious virus was detected in several tissues and organs. Viral antigens were detected by immunohistochemistry mainly in epithelial cells of the digestive tract, in mononuclear cells of the perivascular and peribronchial spaces; in lymph node septae and capsule; and in lymphocytes and other mononuclear cells of the spleen and Peyer's patches. Group B calves showed depression, hyperthermia, moderate signs of respiratory and digestive infection, small ulcerations in the tongue and recovered after a few days. These results demonstrate that the Brazilian BVDV-2 isolates were capable of producing an acute disease in calves upon experimental inoculation, and that the clinical and pathological consequences of the infection were more severe in young calves.

Key words: bovine viral diarrhea virus type 2, BVDV-2, experimental infection.

INTRODUÇÃO

O vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV) é um dos patógenos mais importantes de bovinos. O BVDV está classificado na família Flaviviridae, gênero Pestivirus, juntamente com o vírus da Peste Suína Clássica (hog cholera virus) e o

vírus da Doença da Fronteira (border disease virus) de ovinos (HORZINEK, 1991). Os Pestivirus são vírus pequenos (40 a 60nm de diâmetro), com envelope, possuem como genoma uma molécula de RNA de fita simples, polaridade positiva, com aproximadamente 12,5 quilobases (DONIS, 1995). De acordo com a capacidade de produzir citopatologia em cultivo celular, as amostras do BVDV podem ser classificadas em citopatogênicas (CP) e não-citopatogênicas (NCP) (GILLESPIE *et al.*, 1960).

Embora originalmente identificado de casos de doença gastroentérica grave (OLAFSON *et al.*, 1946), o BVDV tem sido mais frequentemente associado às infecções subclínicas ou com sinais clínicos leves e passageiros. As maiores perdas estão geralmente relacionadas com a infecção de fêmeas prenhes. O vírus tem a capacidade de atravessar a placenta e infectar o feto, podendo causar mortalidade embrionária ou fetal, abortos ou mumificação fetal, malformações e nascimento de terneiros fracos e inviáveis (BAKER, 1995).

No final da década de 80, uma enfermidade severa associada ao BVDV, com altos índices de morbidade e mortalidade em bovinos de todas as idades, foi descrita na América do Norte (REBBHUN *et al.*, 1989; CARMAN *et al.*, 1998). A análise genética e antigênica dos vírus isolados desses surtos demonstrou tratar-se de um novo genótipo de BVDV, posteriormente denominado de BVDV tipo 2 (BVDV-2) (PELLERIN *et al.*, 1994; RIDPATH *et al.*, 1994). Os sinais clínicos observados eram aborto, doença respiratória ou entérica aguda, doença hemorrágica e trombocitopenia (CARMAN *et al.*, 1998). Após isso, várias tentativas de reproduzir a enfermidade pelo BVDV-2 foram realizadas, nem

sempre com sucesso (ELLIS *et al.*, 1998; ODEON *et al.*, 1999; WALZ *et al.*, 1999; RIDPATH *et al.*, 2000; STROFFREGEN *et al.*, 2000). O genótipo BVDV-2 não é sinônimo de alta virulência, pois uma parcela significativa desses vírus tem sido isolada de infecções subclínicas, de animais persistentemente infectados, e como contaminantes de soro fetal bovino e vacinas (RIDPATH *et al.*, 1994; 2000).

No Brasil, amostras de BVDV-2 já foram isoladas de casos clínicos e de fetos saudáveis, e estudos sorológicos demonstraram que a infecção está difundida no rebanho bovino do país (FLORES *et al.*, 2000). O presente trabalho foi realizado com o objetivo de reproduzir a enfermidade, através da inoculação de bezerros com dois isolados brasileiros de BVDV-2. Além disso, a reprodução da enfermidade também pode viabilizar o uso desses isolados para testes de proteção vacinal.

MATERIAL E MÉTODOS

Vírus e células: duas amostras brasileiras NCP do BVDV-2 (SV-260 e LV-96), isoladas de casos clínicos e caracterizadas antigênica e geneticamente (FLORES *et al.*, 2000) foram utilizadas para a inoculação dos bezerros. As amostras foram propagadas em células de linhagem de rim bovino (MDBK- Madin Darby bovine kidney, ATCC-CCL 22), livres de pestivírus, cultivadas em meio essencial mínimo^a (MEM), contendo 0,035g/L de penicilina^b e 0,2g/L de estreptomicina^c, suplementadas com 5% de soro equino. Os vírus foram propagados até obtenção

de estoques contendo aproximadamente $10^{6,0}$ DICC₅₀/ml (doses infectantes para 50% dos cultivos celulares). A amostra Singer (BVDV-1), utilizada nos testes de soro-neutralização (SN), foi cedida pelo Dr. Ruben Donis (University of Nebraska, Lincoln, NE, USA).

Animais e inoculação: nove bezerros, cruzas da raça holandesa, foram utilizados no experimento. Os animais foram divididos em dois grupos de acordo com a idade e inoculados separadamente. O grupo A era composto de quatro animais com idade entre 45 e 90 dias e peso médio de 60kg. O grupo B era constituído de quatro animais, com seis a oito meses de idade e peso aproximado de 130kg. O animal utilizado como controle era da mesma idade e peso dos animais do grupo B. Previamente à inoculação, os animais foram testados frente à presença de anticorpos neutralizantes contra o BVDV e BHV-1. Os animais do grupo A apresentaram títulos residuais de anticorpos contra a cepa Singer (entre 4 e 8) e os demais animais eram soronegativos. Antes da inoculação, os animais passaram por um período de adaptação de sete dias, quando foram everminados e monitorados clinicamente. Nos três dias anteriores, no dia da inoculação e um dia após, os animais receberam administração intramuscular de dexametasona^d (0,2mg/kg/dia). Os animais foram inoculados com 10ml de suspensão viral (dose total de $10^{7,0}$ DICC₅₀/animal) divididos pelas vias intranasal (5ml) e endovenosa (5ml). O animal controle foi inoculado com MEM.

Monitoramento clínico, virológico e sorológico: os animais foram monitorados diariamente através de exames clínicos e medição da temperatura corporal. Os animais que apresentaram quadro clínico severo foram sacrificados *in extremis*,

submetidos à necropsia e tiveram seus tecidos coletados para a pesquisa de vírus, antígenos virais e histopatologia. A replicação do vírus foi monitorada através da pesquisa de vírus no sangue, no soro e em secreções nasais coletados nos dias seguintes à inoculação, e em tecidos dos animais que morreram. As amostras coletadas foram submetidas à pesquisa de vírus, através da inoculação em cultivo celular, conforme descrito por BOTTON **et al.** (1998). As amostras de soro coletadas nos dias 0, 3, 6, 9, 12, 14 e 22 pós-inoculação (pi) foram testadas frente à presença de anticorpos neutralizantes contra o BVDV, pela técnica de soro-neutralização (SN) (BOTTON **et al.**, 1998).

Histopatologia e imuno-histoquímica (IHC): fragmentos de tecidos obtidos na necropsia foram fixados em formol tamponado a 10%, incluídos em parafina e cortados a 5µm para histopatologia e imuno-histoquímica. Para os exames histopatológicos, os cortes foram corados com hematoxilina e eosina (H&E) de acordo com protocolos de rotina. A detecção de antígenos virais nos tecidos foi realizada através da técnica de imuno-histoquímica, conforme descrito por SCHERER **et al.** (2001).

RESULTADOS

O histórico clínico e os achados macro e microscópicos nos animais inoculados estão apresentados na tabela 1. Os animais apresentaram anorexia, depressão, hiperemia da mucosa nasal, secreção nasal mucosa passando a mucopurulenta, estertores pulmonares, anemia, sangramento no momento da

vasopunctura, úlceras e erosões no sistema digestivo e diarreia. Todos os animais inoculados apresentaram uma elevação da temperatura corporal, que foi bifásica nos animais do grupo A (dias 2-3 pi e nos dias anteriores à morte), e entre os dias 5 e 7 pi nos animais do grupo B. Em alguns animais, observou-se diarreia com muco e sangue, geralmente entre os dias 6 e 10 pi. Pequenas lesões ulceradas na língua foram observadas em todos os animais do grupo A e em dois bezerros do grupo B a partir do dia 7 pi. Essas lesões persistiram até o dia 9 pi (grupo B) e dia 12 pi (grupo A). Os sinais clínicos progrediram em intensidade nos animais do grupo A, fazendo com que ficassem moribundos e em decúbito, morrendo ou sendo sacrificados *in extremis*. Nos animais do grupo B houve regressão dos sinais clínicos ao redor do dia 10 pi, permanecendo somente a diarreia aquosa e secreção nasal serosa (nº 100, 101 e 103), até o dia 13 pi. O animal controle apresentou apenas um aumento discreto e passageiro da temperatura corporal no dia 3 após a administração da dexametasona.

O BVDV foi detectado com maior frequência e duração nas secreções nasais e no sangue dos animais do grupo A. O vírus foi isolado de leucócitos de todos os animais inoculados, a partir do dia 1. Um animal (grupo A) eliminou vírus até o dia 11 pi. A maior frequência de isolamento ocorreu entre os dias 3 e 7 pi, com redução progressiva a partir do dia 8 pi. Nas secreções nasais, o vírus foi detectado de maneira irregular e intermitente, a partir do dia 3 até o dia 12 pi em um animal, com maior frequência nos dias 5 e 6 pi. Entre os animais do grupo A, apenas o bezerro 83 apresentou soroconversão antes da morte/sacrifício (título de 32, no dia 12 pi). No grupo B, todos os animais soroconverteram ao BVDV a

partir do dia 9 pi (títulos de 16 e 32). O animal controle não eliminou vírus e permaneceu soronegativo durante o experimento.

As lesões observadas na necropsia dos bezerros do grupo A (Figura 1a, 1b) estão apresentadas na tabela 1. Os sistemas respiratório e digestivo foram os mais afetados. As lesões mais frequentemente observadas foram úlceras e erosões na língua, edema pulmonar com áreas deprimidas e congestionadas, tumefação das pregas do abomaso com ulceração de suas bordas e coleção de líquido nas cavidades abdominal, torácica e pericárdica. Alterações microscópicas marcantes foram observadas nos tecidos linfóides (depleção linfóide e infiltrado inflamatório nos linfonodos retrofaríngeos, mediastínicos e mesentéricos e nas placas de Peyer) e sistema digestivo (erosões e úlceras da língua e abomaso, edema da submucosa e muscular do abomaso).

Nos animais que foram necropsiados durante a infecção aguda, o BVDV foi isolado de vários tecidos, com pequenas variações entre os animais (Tabela 2). Antígenos do BVDV foram detectados através de IHC principalmente em células epiteliais do trato digestivo; em células mononucleares nos espaços perivasculares e peribronquiais; na cápsula e septos de linfonodos; e em linfócitos e células mononucleares dos linfonodos, placas de Peyer e baço (Tabela 2; Figura 1c, 1d).

DISCUSSÃO

Os resultados apresentados demonstram que as amostras SV-260 e LV-96 de BVDV-2, isoladas a partir de casos de doença gastroentérica grave, foram capazes de reproduzir a enfermidade aguda quando inoculadas em bezerros imunodeprimidos artificialmente. A exemplo dos casos dos quais foram isoladas, a doença gastroentérica foi acompanhada de sinais respiratórios. A enfermidade foi mais severa e até fatal nos bezerros mais jovens, enquanto os bezerros com seis a oito meses de idade apresentaram sinais clínicos de intensidade moderada e recuperaram-se. Tanto a enfermidade severa desenvolvida pelos animais jovens, como a doença de menor gravidade observada nos demais bezerros, apresentaram características clínicas e patológicas semelhantes às descritas em infecções naturais (REBBHUN *et al.*, 1989; CARMAN *et al.*, 1998) e experimentais (CORAPI *et al.*, 1990; ELLIS *et al.*, 1998; ODEON *et al.*, 1999; WALZ *et al.*, 1999; RIDPATH *et al.*, 2000; STROFFREGEN *et al.*, 2000) pelo BVDV-2. As variações mais notáveis referem-se à intensidade e duração dos sinais clínicos. No entanto, infecções agudas pelo BVDV-2 com curso clínico de intensidade muito variável e rápido, ou relativamente tardio, já foram descritas (CORAPI *et al.*, 1990; ELLIS *et al.*, 1998; ODEON *et al.*, 1999; WALZ *et al.*, 1999; RIDPATH *et al.*, 2000; STROFFREGEN *et al.*, 2000).

Os sinais clínicos apresentados foram semelhantes aos observados nos casos de origem desses isolados, com algumas diferenças na duração da enfermidade e nas manifestações clínicas. A amostra LV-96 foi isolada de um

caso crônico, caracterizado por episódios intermitentes de diarreia e sinais respiratórios. A amostra SV-260 foi isolada de um caso de doença gastroentérica aguda, sugestivo de Doença das Mucosas (FLORES *et al.*, 2000). No presente estudo, os animais inoculados com as duas amostras apresentaram um quadro clínico-patológico semelhante (grupo A). A infecção teve curso com apatia severa, lesões orais, diarreia e sinais de doença respiratória. As lesões ulcerativas eram em menor número e gravidade do que nos casos naturais, localizadas na língua e no esôfago, em somente um animal (nº 80). Foram observados, nos animais inoculados com a amostra SV-260, edemas, áreas ulceradas no abomaso, equimoses e sufusões na superfície capsular do baço, serosas do rúmen, intestino delgado e ceco e petéquias na mucosa da bexiga, sendo que essas lesões não foram descritas no caso de infecção natural. Na descrição do caso de infecção natural pela amostra SV-260 foram observadas áreas congestionadas nas mucosas da língua, omaso e rúmen e úlceras extensas e profundas na língua, palato e esôfago (FLORES *et al.*, 2000). As lesões microscópicas nos epitélios e tecidos linfóides foram semelhantes às descritas nos casos naturais. Depleção linfóide severa, alteração frequentemente associada à infecção pelo BVDV (BAKER, 1995), foi um achado marcante no presente estudo e também relatado nos casos naturais (FLORES *et al.*, 2000). A depleção linfóide está geralmente associada à replicação do vírus nesses tecidos, como demonstrado através de isolamento viral e imuno-histoquímica (Figura 1c, 1d; Tabela 2).

Um achado importante nos animais inoculados com as amostras LV-96 e SV-260 foi a presença de áreas erosivas e ulceradas no abomaso. Esse não é um

achado constante em infecções pelo BVDV, porém já foi descrito anteriormente (CARMAN **et al.**, 1998; WALZ **et al.**, 1999). Os demais achados macroscópicos observados no presente estudo são freqüentes em casos de infecção natural pelo BVDV, tanto na Doença das Mucosas, como na BVD aguda/hemorrágica produzida pelo BVDV-2 (CARMAN **et al.**, 1998).

Alguns aspectos da enfermidade observados no presente estudo diferem do que foi relatado anteriormente. CARMAN **et al.** (1998) descreveram os surtos de BVD aguda/hemorrágica associados com BVDV-2 e observaram maior mortalidade em animais com idade inferior a dois anos. Lesões discretas a moderadas foram observadas em animais com idade superior a seis meses. Nos animais com idade inferior a seis meses, as lesões foram pouco freqüentes, além de discretas e localizadas principalmente no trato digestivo superior. No presente estudo, os animais mais jovens (45 a 90 dias) foram os que desenvolveram um quadro clínico mais severo e morreram rapidamente, enquanto os animais com idade superior a 6 meses desenvolveram sinais digestivos e respiratórios moderados, lesões orais discretas e recuperaram-se clinicamente. Outros estudos também têm relatado doença aguda severa em animais mais jovens (CORAPI **et al.**, 1990; ELLIS **et al.**, 1998; ODEON **et al.**, 1999; RIDPATH **et al.**, 2000; STROFFREGEN **et al.**, 2000). Além dos sinais digestivos, todos os animais apresentaram sinais de infecção respiratória, que é um achado freqüente em infecções naturais e experimentais pelo BVDV-2 (PELLERIN **et al.**, 1994; CARMAN **et al.**, 1998; ODEON **et al.**, 1999).

Assim como em casos de infecção natural (REBBHUN **et al.**, 1989; CARMAN **et al.**, 1998) e experimental (CORAPI **et al.**, 1990) com BVDV-2, sinais hemorrágicos não são achados constantes e somente são observados ocasionalmente. Nas descrições originais da BVD aguda, a ocorrência de doença hemorrágica foi relatada em aproximadamente 15% dos rebanhos (CARMAN **et al.**, 1998). Em contraste, trombocitopenia é um achado consistente em infecções experimentais pelo BVDV-2 (CORAPI **et al.**, 1990; WALZ **et al.**, 1999). No presente estudo, o animal número 82 (LV-96), além de diarreia com sangue, apresentou dificuldade de coagulação sanguínea no momento da vasopuntura (dia 10 pi). Foram observados, por ocasião da necropsia, grandes áreas hemorrágicas nas serosas do sistema digestivo e intussuscepção de um segmento do intestino delgado. Curiosamente, nos casos de infecção natural, a amostra SV-260 estava associada a sinais hemorrágicos (FLORES **et al.**, 2000). A patogenia dos eventos hemorrágicos associados à infecção pelo BVDV-2 ainda não está esclarecida. A associação de dois ou mais mecanismos produzindo dificuldade na coagulação tem sido sugerida, porém a replicação viral na medula óssea aparentemente produz alterações na quantidade e qualidade das plaquetas, o que poderia favorecer a ocorrência de distúrbios na coagulação sanguínea (WALZ **et al.**, 1999). Enterites e placas de Peyer aumentadas, muitas vezes são uma consequência de infecções virais, podendo servir de ponto de aderência do segmento intestinal, favorecendo a ocorrência de intussuscepção (BARKER **et al.**, 1993).

Vários estudos envolvendo inoculação experimental têm sido realizados com o objetivo de estudar a patogenia da infecção pelo BVDV-2 (CORAPI **et al.**, 1990; ELLIS **et al.**, 1998; ODEON **et al.**, 1999; WALZ **et al.**, 1999; RIDPATH **et al.**, 2000; STROFFREGEN **et al.**, 2000). Esse interesse foi despertado a partir dos casos originais, nos quais a severidade e os aspectos clínico-patológicos diferiam, significativamente, do que era historicamente descrito para o BVDV. Por isso, inicialmente, acreditava-se que amostras de BVDV-2 eram invariavelmente virulentas. Estudos experimentais e observações epidemiológicas posteriores, porém, demonstraram que existem amostras de BVDV-2 pouco virulentas ou mesmo avirulentas e, provavelmente, constituem-se na maioria das amostras de campo (RIDPATH **et al.**, 1994; 2000). Portanto, o genótipo BVDV-2 não deve ser considerado sinônimo de alta virulência. Os resultados do presente estudo indicam que, além das características virais, fatores como a idade dos animais parecem ser importantes determinantes das conseqüências clínico-patológicas da infecção. A intensidade e a gravidade das lesões também parecem ser influenciadas pela duração do curso clínico. Em casos de infecção natural ou experimental, os animais acometidos por enfermidade aguda de curso rápido freqüentemente não desenvolvem lesões severas (CARMAN **et al.**, 1998; ELLIS **et al.**, 1998; ODEON **et al.**, 1999; RIDPATH **et al.**, 2000).

A detecção do vírus em praticamente todos os tecidos examinados (Tabela 2) demonstra a ampla disseminação do agente no organismo dos animais inoculados. Embora as conseqüências clínico-patológicas da infecção concentrem-se principalmente no trato digestivo e respiratório, o vírus dissemina-se por vários

tecidos e órgãos (BAKER, 1995; ODEON **et al.**, 1999). Em geral, as lesões digestivas e respiratórias estão associadas com a infecção nos epitélios, como demonstrado pela detecção de antígenos nesses locais (Tabela 2). No entanto, apesar do quadro de infecção respiratória, os antígenos virais no pulmão restringiram-se às células mononucleares nos septos alveolares e não no epitélio pulmonar como observado anteriormente (ODEON **et al.**, 1999).

Os achados clínico-patológicos em casos de BVD aguda são geralmente indistinguíveis de casos de Doença das Mucosas (CARMAN **et al.**, 1998). Essas enfermidades, no entanto, podem ser distinguidas com base na sua epidemiologia e etiopatogenia. A Doença das Mucosas é uma enfermidade rara, que ocorre em animais persistentemente infectados, e está associada a uma co-infecção com amostras de BVDV, CP e NCP (BAKER, 1995). A BVD aguda resulta de infecção primária aguda com amostras NCP e ocorre freqüentemente em forma de surtos, nos quais vários animais são afetados (CARMAN **et al.**, 1998).

Em resumo os resultados obtidos demonstram que as duas amostras de BVDV – 2 são capazes de produzir manifestações clínicas severas, sobretudo em bezerros jovens. A patogenicidade e a virulência dessas amostras também possibilita a sua utilização como vírus de desafio em testes de proteção vacinal.

FONTES DE AQUISIÇÃO

a – MEM – Eagle's Minimal Essencial Medium Gibco – Gibco, Gran Island, NY, USA.

b – Penicillin-G Potassium Salt – Sigma, St. Louis, New Jersey, USA.

c – Estreptomicina – Inlab, Brasil.

d – Azium Solução - Schering-Plough Veterinária, Rio de Janeiro, RJ, BR.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAKER, J. C. The clinical manifestations of bovine viral diarrhoea infection. **Vet Clin North Am**, v.11, n. 3, p.425-446, 1995.

BARKER, I.K., VAN DREUMEL, A.A., PALMER, N. The alimentary system. In: JUBB, K.V.F., KENNEDY, P. C.; PALMER, N. **Pathology of domestic animals**. 4 ed. San Diego: Academic, 1993. v.2, Cap.1. p.1-318.

BOTTON, S.A., SILVA, A.M., BRUM, M.C.S., **et al.** Antigenic characterization of Brazilian bovine viral diarrhoea virus isolates by monoclonal antibodies and cross-neutralization. **Braz J Med Biol Res**, v.31, n.11, p.1429-1438, 1998.

CARMAN, S., VAN DRUMEL, T., RIDPATH, J.F., **et al.** Severe acute bovine viral diarrhoea in Ontario, 1993-1995. **J Vet Diagn Invest**, v.10, p.27-38, 1998.

- CORAPI, W.V., ELLIOTT, D., FRENCH, T.W., **et al.** Thrombocytopenia and hemorrhages in veal calves infected with bovine viral diarrhea virus. **J Am Vet Med Assoc**, v.196, n.4, p.590-596, 1990.
- DONIS, R. O. Molecular biology of bovine viral diarrhea virus and its interactions with the host. **Vet Clin North Am**, v.11, n.3, p.393-423, 1995.
- DUBOVI, E. J. Genetic diversity and BVD virus. **Comp Immun Microbiol Infect**, v.15, n.3. p.155-162, 1993.
- ELLIS, J.A., WEST, K.H., CORTESE, V.S., **et al.** Lesions and distribution of viral antigen following an experimental infection of young seronegative calves with virulent bovine virus diarrhea virus-type II. **Can J Vet Res**, v.62, p.161-169,1998.
- FLORES, E. F., GIL, L. H. V., BOTTON, S. A., **et al.** Clinical, pathological and antigenic aspects of bovine viral diarrhea virus (BVDV) type 2 isolates identified in Brazil. **Vet Microbiol**, v.77, p.175-183, 2000.
- GILLESPIE, J.H., BAKER, J.A., McENTEE, K.A. A cytopathogenic strain of virus diarrhea virus. **Cornell Vet**, v.50, p.73-79, 1960.
- HORZINEK, M.C. Pestivirus-taxonomic perspectives. **Arch Virol**, suppl.3, p.1-5, 1991.
- ODEON, A.C., KELLING, C.L., MARSHALL, D.J., **et al.** Experimental infection of calves with bovine viral diarrhea virus genotype II (NY - 93). **J Vet Diagn Invest**, v.11, p.221-228, 1999.
- OLAFSON, P., MacCALLUM, A. D., FOX, F. H. An apparently new transmissible disease of cattle. **Cornell Vet**, v.36, p.205-213, 1946.

- PELLERIN, C., HURK, J.V.D., LECOMTE, J., **et al.** Identification of a new group of bovine viral diarrhea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. **Virology**, v.203, p.260-268, 1994.
- REBBHUN, W.C., FRENCH, T.W. PERDRIZET, J.A., **et al.** Thrombocytopenia associated with acute bovine virus diarrhea infection in cattle. **J Vet Int Med**, v.3, n.1, p.42-46, 1989.
- RIDPATH, J. F., BOLIN, S., DUBOVI, E. J. Segregation of bovine viral diarrhea virus into genotypes. **Virology**, v.206, p.66-74, 1994.
- RIDPATH, J. F., NEIL, J. D., FREY, M., **et al.** Phylogenetic, antigenic and clinical characterization of type 2 BVDV from North America. **Vet Microbiol**, v.77, p.145-155, 2000.
- SCHERER, C.F.C, FLORES, E. F., WEIBLEN, R., **et al.** Experimental infection of pregnant ewes with bovine viral diarrhea virus type 2 (BVDV 2): effects on the pregnancy and fetus. **Vet Microbiol**, v.79, p.285-299, 2001.
- STROFFREGEN, B., BOLIN, S.R., RIDPATH, J.F., **et al.** Morphologic lesions in type 2 BVDV infections experimentally induced by strain BVDV2-1373 recovered from a field case. **Vet Microbiol**, v.77, p.157-162, 2000.
- WALZ, P.H., BELL, T.G., STEFICEK, B. A., **et al.** Experimental model of type II bovine viral diarrhea virus-induced thrombocytopenia in neonatal calves. **J Vet Diagn Invest**, v.11, p.505-514, 1999.

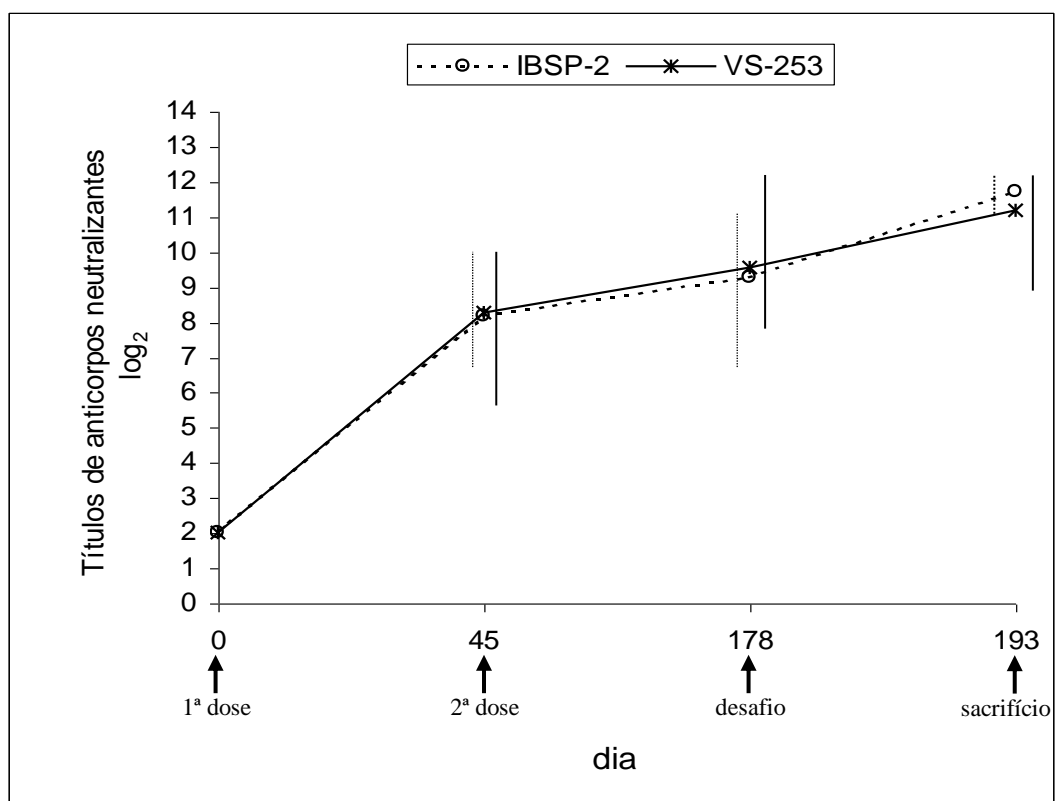


Figura 1 - Evolução dos títulos médios (GMT) de anticorpos neutralizantes contra as amostras vacinais em ovinos imunizados com duas amostras modificadas do vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV).

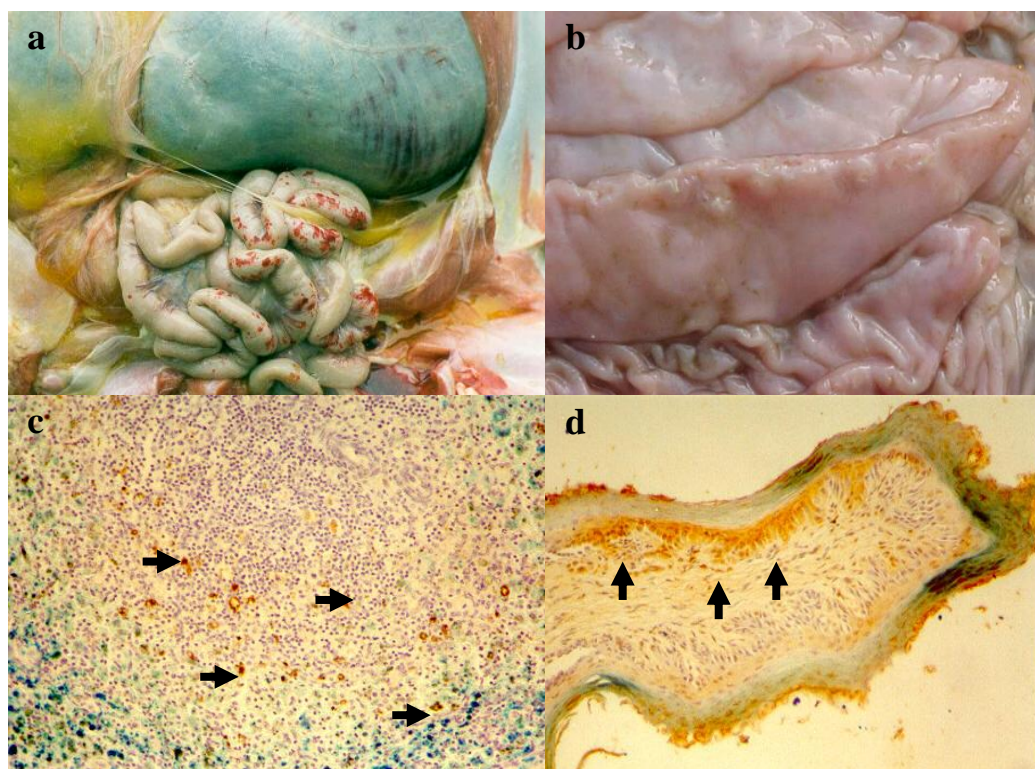


Figura 1 – Tecidos de bezerros inoculados com amostras brasileiras do vírus da Diarréia Viral Bovina-2; (a) Equimoses e sufusões na serosa do rúmen e intestino delgado do animal nº 82. (b) Edema, congestão, úlceras e erosões no abomaso do animal nº 81. (c) Presença de antígeno viral difuso no citoplasma de células epiteliais do rúmen (pontas de setas). (d) Células mononucleares na polpa branca do baço, positivas para antígenos virais (pontas de setas). Técnica de imuno-histoquímica utilizando o anticorpo monoclonal 15c5 e sistema Avidina Biotina. Substrato diaminobenzidina (DAB). Coloração por hematoxilina, magnificação 250x.

Tabela 1 – Achados clínicos e patológicos em bezerros inoculados com amostras brasileiras do vírus da Diarréia Viral Bovina tipo-2 (BVDV - 2).

	Animal	Amostra	Sinais clínicos	Achados de necropsia	Microscopia
Grupo A	80	SV - 260	Apatia, hipertermia, secreção nasal, úlceras e erosões na língua e decúbito. Sacrificado <i>in extremis</i> no dia 7 pi.	Úlceras e erosões na língua e esôfago, edema pulmonar.	Úlceras e erosões na língua com infiltrado mononuclear, edema da submucosa e muscular do abomaso, pneumonia fibrinosa aguda.
	83	SV - 260	Apatia, hipertermia, úlceras e erosões na língua e almofada dental, conjuntivite, secreção nasal muco-purulenta, dispnéia, anemia e melena. Decúbito, morreu no dia 12 pi.	Úlceras e erosões na língua, almofada dental e abomaso. Edema pulmonar e do abomaso. Equimoses e sufusões subepicárdicas e subendocárdicas no ventrículo esquerdo e em áreas multifocais na mucosa do intestino delgado. Petéquias e equimoses na superfície do baço.	Úlceras e erosões na língua e abomaso. Depleção linfóide nos linfonodos e placas de Peyer.
	81	LV - 96	Apatia, hipertermia, úlceras e erosões na língua, secreção nasal muco-purulenta e dispnéia. Sacrificado <i>in extremis</i> no dia 8 pi.	Úlceras e erosões na língua, edema pulmonar e do abomaso, congestão na válvula íleo-cecal.	Úlceras e erosões na língua e rúmen. Edema da submucosa e muscular, úlceras do abomaso com proliferação de tecido fibroso. Depleção linfóide nos linfonodos e placas de Peyer.
	82	LV - 96	Apatia, hipertermia, úlceras e erosões na língua, conjuntivite secreção nasal muco-purulenta diarréia aquosa, melena e tempo de coagulação aumentado. Morreu no dia 11 pi.	Úlceras e erosões na língua, rúmen e abomaso. Edema pulmonar e do abomaso. Equimoses e sufusões na serosa do rúmen, baço, intestino delgado e ceco. Intussuscepção de um segmento intestinal. Petéquias na mucosa da bexiga. Área hemorrágica no rim.	Úlceras e erosões na língua, abomaso e rúmen. Depleção linfóide nos linfonodos e placas de Peyer.
Grupo B	100	SV - 260	Apatia, hipertermia, secreção nasal muco-purulenta, diarréia com muco e melena. Recuperou-se.	-----	-----
	101	SV - 260	Apatia, hipertermia, secreção nasal muco-purulenta, estertores respiratórios, lesões ulceradas na língua, gengiva e bochecha. Recuperou-se.	-----	-----
	102	SV - 260	Hipertermia, secreção nasal muco-purulenta e diarréia. Recuperou-se.	-----	-----
	103	SV - 260	Apatia, hipertermia, secreção nasal muco-purulenta, úlceras na língua e diarréia. Recuperou-se.	-----	-----
Controle	104		Hipertermia passageira.	-----	-----

Tabela 2 – Distribuição de vírus e antígenos virais em tecidos de bezerros inoculados com amostras brasileiras do vírus da Diarréia Viral Bovina tipo - 2 (BVDV – 2)..

Órgão/tecido	Animal	Vírus				Antígenos virais
		80	81	82	83	
Língua		+ ^a	+	+	+	Células epiteliais em áreas focais da mucosa, células mononucleares no espaço perivascular
Tonsila		+	+	+	+	Células mononucleares
Pulmão		+	+	+	- ^b	Células mononucleares nos septos alveolares; espaços perivascular e peribronquial.
Linfonodos retrofaríngeos		+	+	+	+	Células mononucleares nos folículos linfóides, na cápsula e nos septos.
Linfonodos mediastínicos		-	+	+	+	Células mononucleares nos folículos linfóides, na cápsula e nos septos.
Linfonodos mesentéricos		+	+	+	-	Células mononucleares nos folículos linfóides, na cápsula e nos septos.
Rúmen		-	-	+	-	Células epiteliais em áreas focais da mucosa, células mononucleares no espaço perivascular
Intestino delgado		-	+	+	+	Células epiteliais em áreas focais da mucosa, células mononucleares no espaço perivascular
Intestino grosso		-	+	+	+	Células epiteliais em áreas focais da mucosa, células mononucleares no espaço perivascular
Placas de Peyer		-	+	+	+	Linfócitos e células mononucleares
Baço		+	+	+	-	Linfócitos e células mononucleares na polpa branca e vermelha
Esôfago		+	+	+	+	NT ^c
Abomaso		+	+	+	+	NT
Ceco		+	+	+	+	NT
Válvula íleo-cecal		-	+	+	-	NT
Reto		+	+	+	+	NT
Rins		+	-	+	-	NT
Bexiga		NT	+	+	+	NT
Parótida		+	+	+	+	NT
Tireóide		+	+	+	+	NT
Fígado		-	+	+	-	NT
Pâncreas		NT	+	+	-	NT
Coração		+	+	+	+	NT
Cérebro		+	-	+	+	NT
Cerebelo		+	-	+	+	NT
Hipófise		-	+	+	+	NT
Timo		+	+	+	+	NT
Medula óssea		NT	-	+	-	NT

a - isolamento positivo

b - isolamento negativo

c - amostra não testada

CONCLUSÕES

Os resultados dos experimentos realizados permitem concluir que:

- As duas amostras modificadas do vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV) possuem baixa patogenicidade para terneiros quando inoculadas pela via intramuscular;

- Os vírus modificados mantiveram a capacidade de infecção transplacentária em ovinos;

- A imunização de ovelhas com os vírus modificados induziu títulos altos de anticorpos neutralizantes contra os vírus homólogos e títulos variados contra amostras de BVDV-1 e BVDV-2;

- A resposta imunológica induzida pela imunização com os vírus modificados foi capaz de prevenir a infecção fetal em ovelhas prenhes frente ao desafio;

- A inoculação das amostras brasileiras de BVDV-2 (SV-260 e LV-96) reproduziu vários aspectos clínicos e patológicos da infecção natural pelo BVDV-2;

- As amostras brasileiras de BVDV-2 foram mais virulentas para bezerros mais jovens;

- A inoculação de bezerros jovens com as amostras SV-260 e LV-96 pode ser utilizada como desafio em testes de proteção vacinal contra o BVDV.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAKER, J. C. The clinical manifestations of bovine viral diarrhea infection. **Vet Clin North Amer**, v. 11, n. 3, p. 425 - 445, 1995.
- BOLIN, S. R. Control of bovine viral diarrhea infection in animals by use of vaccination. **Vet Clin North Amer**, v. 11, n. 3, p. 615 - 625, 1995.
- BOTTON, S. A ., SILVA, A. M., BRUM, M.C.S. *et al.* Antigenic characterization of Brazilian bovine viral diarrhea virus isolates by monoclonal antibodies and cross-neutralization. **Bras J Med Bio Res** v. 31, n 11, p. 1429-1438, 1998.
- DONIS, R. O. Molecular biology of bovine viral diarrhea virus and its interactions with the host. **Vet Clin North Amer**, v. 11, n. 3, p. 393 - 423, 1995.
- DUBOVI, E. J. Genetic diversity and BVD virus. **Comp Immun Microbiol Inf Dis**, v. 15, p. 155-162, 1992.
- FLORES, E. F., GIL, L. H. V. G., BOTTON, S. A., *et al.* Clinical, pathological and antigenic aspects of bovine viral diarrhea virus (BVDV) type 2 isolates identified in Brazil. **Vet Microbiol**, v. 77, p.175-183, 2000.

HORZINEK, M. C. Pestiviruses-taxonomic perspectives. **Arch Virol** [suppl. 3], p. 1-5, 1991.

HOUE, H. Epidemiology of bovine viral diarrhoea virus. **Vet Clin North Amer**, v. 11, n. 3, p. 521 - 547, 1995.

McCLURKIN, A.W., LITLEDIKE, R. C., CULTIP, R. C. *et al.* Production of cattle immunotolerant to bovine viral diarrhoea virus. **Can J Comp Med** v.48, p.156-161, 1984.

PELLERIN, C., VAN DEN HURK, J., LECOMTE, J. Identification of a new group of bovine viral diarrhoea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. **Virology**, v. 203, p. 260-267, 1994.

RIDPATH, J., BOLIN, S., DUBOVI, E. Segregation of bovine viral diarrhoea virus into genotypes. **Virology**, v. 205, p. 66-74, 1994.

van OIRSCHOT, J. T., BRUSCHKE, C. J. .M., van RIJN, P. A. Vaccination of cattle against bovine viral diarrhoea. **Vet Microbiol** v. 64, p. 169-183, 1999.

van RIJN, P.A., van GENNIP, H.G.P., LEENDERTSE, C.H., *et al.* Subdivision of the Pestivirus genus based on envelope glycoprotein E2. **Virology**, v. 237, p. 337-348, 1997.

VOGEL, F.S.F., FLORES, E.F., WEIBLEN, R., *et al.* Magnitude, duração e especificidade da resposta sorológica em bovinos vacinados contra o vírus da Diarréia Viral Bovina. **Ciência Rural**, v. 32, n. 1, p. 83-89, 2002.

VOGEL, F.S.F., SCHERER, C.F.C., FLORES, E.F., *et al.* Resposta sorológica e avaliação de proteção fetal em ovelhas prenhes vacinadas contra o vírus da diarréia viral bovina (BVDV). **Ciência Rural**, v. 31, n. 5, p. 831-838, 2001.

Quadro 2 - Atividade neutralizante do soro de ovelhas imunizadas com os vírus modificados, frente às amostras homólogas e isolados do vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV-1 e BVDV-2).

Vírus	BVDV-1									BVDV - 2				
	Animal	Homóloga	Padrão	Isolados brasileiros						Homóloga	Padrão	Isolados brasileiros		
				EMP-2	Singer	SV-126.8	UFSM-4	UFSM-1	SV-126.1			SV-153.1	UFSM-3	SV-152.1
14	256	512	1024	NT*	128	256	8	64	NT	512	NT	16	8	NT
39	128	>4096	256	2048	2048	512	256	512	1024	1024	128	> 4096	512	1024
49	256	256	512	256	512	128	32	128	128	256	128	32	16	256
54	512	512	512	128	128	128	16	64	64	512	256	64	16	512
131	2048	512	> 4096	512	256	2048	128	1024	128	2048	512	256	128	4096
142	512	512	128	256	64	512	32	128	128	512	256	128	16	1024
155	2048	512	1024	256	128	512	64	256	128	512	512	64	32	64
231	1024	4096	4096	1024	512	4096	32	256	256	2048	1024	256	128	512
242	1024	> 4096	4096	128	128	> 4096	8	512	128	> 4096	1024	32	32	4096
250	512	256	512	64	32	128	32	64	64	256	256	8	8	128
257	1024	512	1024	1024	128	512	16	128	256	512	128	64	16	1024

* Amostra não testada.

Quadro 3 - Presença de vírus em secreções nasais, sangue e tecidos uterinos e fetais de ovelhas vacinadas com os vírus modificados e desafiadas com amostras heterólogas do vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV).

Animal (n°)	Feto (n°)	Vírus de desafio	Vírus							
			Dia pós-desafio						Tecidos fetais	
			1	3	6	9	12	15		
<i>Vacinadas</i>	39	SV-260	+ ^a (sn ^b)	+ (sn)	- ^c	-	-	-	-	-
	49	SV-260	+ (sn)	+ (sn)	-	-	-	-	-	-
	54	SV-260	-	+ (sn)	-	-	-	-	-	-
	131	SV-260	-	+ (sn)	-	-	-	-	-	-
	250	SV-260	-	+ (sn e lc ^d)	+ (lc)	-	-	-	-	-
	14	SV-126.8	-	+ (sn e lc)	-	-	-	-	-	-
	142	SV-126.8	-	+ (sn)	-	-	-	-	-	-
	155	SV-126.8	-	+ (sn)	-	-	-	-	-	-
	231	SV-126.8	-	+ (sn)	-	-	-	-	-	-
	242	SV-126.8	+ (sn)	+ (sn)	+ (lc)	-	-	-	-	-
257	SV-126.8	-	+ (sn)	-	-	-	-	-	-	
<i>Controles</i>	51	SV-260	-	+ (sn e lc)	+ (lc)	-	-	-	-	+ (pl, t e p) ^e
	268	SV-260	+ (sn)	+ (sn)	-	-	-	-	-	+ (lf, pl e p)
	222	SV-126.8	-	+ (sn e lc)	+ (lc)	-	-	-	-	+ (pl, b e p)
	235	SV-126.8	+ (sn)	+ (sn e lc)	-	-	-	-	-	+ (lf, pl, b, t e p) + (pl e p)

^a - Amostra positiva para vírus;

^b - sn - secreção nasal;

^c - Amostra negativa para vírus;

^d - lc - Leucócitos;

^e - lf (líquido fetal), pl (placentomas), b (baço), t (timo) e p (pulmão).

Santa Maria 11 de dezembro de 2001.

Coordenação do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária
Nesta Universidade

Venho através deste informar que a defesa formal de dissertação de mestrado do aluno **Mário Celso Sperotto Brum** intitulada "***Vacina experimental contra o vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV): avaliação da inocuidade, eficácia e modelo para testes de proteção vacinal***" está marcada para o dia 07 de janeiro de 2002, às 14 horas na sala 4131, prédio 20, e a comissão examinadora será composta por Rudi Weiblen (Orientador/Presidente), Luiz Carlos Kreutz e Eduardo Furtado Flores. Sendo o que tinha para o momento,

Mário Celso Sperotto Brum