

**LUIZ FELIPE LOURENÇO DE SOUZA**

**COMPARAÇÃO DE ISOLADOS DE HERPESVÍRUS BOVINO  
TIPO 5 (BoHV-5) COMO CANDIDATOS À VACINA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2006**

**LUIZ FELIPE LOURENÇO DE SOUZA**

**COMPARAÇÃO DE ISOLADOS DE HERPESVÍRUS BOVINO TIPO  
5 (BoHV-5) COMO CANDIDATOS À VACINA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 28 de julho de 2006

---

Prof<sup>ª</sup>. Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo  
(Co-orientadora)

---

Prof<sup>ª</sup>. Maria Aparecida S. Moreira

---

Prof. Paulo Sérgio de Arruda Pinto

---

Prof. Sérgio Oliveira de Paula

---

Prof. Mauro Pires Moraes  
(Orientador)

Ao meu pai, que apesar de não estar entre a gente é muito presente em todos os meus momentos. E todas as noites nos meus sonhos converso com ele. Hoje pretendo dormir mais cedo, temos muito que conversar.

À minha mãe Lourdes, minha alma gêmea que dedicou todos os momentos de sua vida para me proporcionar dias inesquecíveis como este, para me ver vencer.

À Aninha que desde então me incentivou incessantemente e que me acolheu com carinho e compreensão para que eu conseguisse concluir este trabalho.

## **DEDICO**

## **BIOGRAFIA**

LUIZ FELIPE LOURENÇO DE SOUZA, filho de Altamiro Rodrigues de Souza e Maria de Lourdes Lourenço Souza, nasceu em 10 de agosto de 1977, na cidade de Montes Claros, Minas Gerais.

Concluiu o curso fundamental e médio na Fundação Educacional de Montes Claros – FEMC (Escola Técnica) em 1995. Ingressou no curso de graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Montes Claros (UNIMONTES) – Montes Claros/MG em 2000, finalizando o curso em 2003.

Iniciou-se na pesquisa, como bolsista de iniciação científica, após estágio de 15 meses no Laboratório Experimental de Bioquímica (LEB) da Vallée S.A., em setembro de 2002 com o projeto “Avaliação da Inativação da Cepa Viral BHV-1 L.A. pela Etilenoimina Binária e Etilenoimina Binária Conjugada ao Formaldeído” .

Em março de 2004 manteve-se como estudante especial cursando as matérias do programa da pós-graduação e em agosto de 2004 foi aprovado para fazer parte do curso de Pós-graduação em nível de Mestrado do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus sobre todas as coisas.

À UFV pelo suporte tecnológico e por sua equipe docente de alta qualidade.

À Vallée que apesar de ter financiado meus estudos, confiou em meu trabalho.

Ao Prof. Mauro Pires Moraes que mesmo por um período distante se impôs a me ajudar e orientar. Sem sua ajuda não seria possível finalizar este trabalho. Meus sinceros agradecimentos.

À Carla Maria Freitas que mesmo antes de iniciar este trabalho nunca me deixou na mão. Nas dúvidas e dificuldades recorri a ela e sempre fui acolhido com muita atenção e conhecimento. À ela não existem palavras para agradecer. Nunca esquecerei de tudo que ela fez por mim.

Aos amigos de laboratório que me ajudaram e dedicaram parte de seus tempos compartilhando as dúvidas e acertos para que eu pudesse vencer esta batalha. Além dos companheiros incansáveis de coleta de sangue, principalmente Abelardo. Fica aqui minha gratidão.

Aos amigos que fiz em Viçosa que através de palavras amigas me incentivaram e me ajudaram a distrair nos momentos difíceis longe de casa.

À todos que diretamente ou indiretamente participaram deste trabalho. Meu muito obrigado.

## SUMÁRIO

EXTRATO.....	VII
ABSTRACT.....	IX
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1. DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA.....</b>	<b>3</b>
<b>2.2. CLASSIFICAÇÃO DO VÍRUS.....</b>	<b>4</b>
<b>2.3. ORGANIZAÇÃO DO GENOMA.....</b>	<b>5</b>
<b>2.4. PROTEÍNAS VIRAIS.....</b>	<b>6</b>
<b>2.5. MULTIPLICAÇÃO VIRAL.....</b>	<b>8</b>
<b>2.6. COMPARAÇÃO ENTRE BoHV-1 E BoHV-5.....</b>	<b>9</b>
<b>2.7. MODELOS EXPERIMENTAIS.....</b>	<b>10</b>
<b>2.8. PATOGENIA.....</b>	<b>11</b>
<b>2.8.1. PATOGENIA CELULAR.....</b>	<b>11</b>
<b>2.8.2. VIAS DE INFECÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>2.9. SINAIS CLÍNICOS.....</b>	<b>12</b>
<b>2.10. RESPOSTA IMUNE.....</b>	<b>14</b>
<b>2.11. DIAGNÓSTICO VIRAL E SOROLÓGICO.....</b>	<b>15</b>
<b>2.12. PROFILAXIA (MEDIDAS DE CONTROLE).....</b>	<b>17</b>
<b>3. OBJETIVO.....</b>	<b>19</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>20</b>
<b>4.1. CULTIVO DE CÉLULAS.....</b>	<b>20</b>

4.1.1.	CONTAGEM CELULAR.....	21
4.1.2.	CÁLCULO DA DENSIDADE CELULAR.....	21
4.2.	PRODUÇÃO DE VÍRUS.....	21
4.2.1.	DETERMINAÇÃO DO TÍTULO INFECCIOSO.....	22
4.3.	CURVA DE CRESCIMENTO VIRAL.....	23
4.4.	FORMULAÇÃO DA VACINA.....	23
4.4.1.	DILUIÇÃO DAS SUSPENÇÕES VIRAIS.....	23
4.4.2.	INATIVAÇÃO VIRAL.....	24
4.4.3.	PESQUISA DE VÍRUS ATIVO.....	24
4.4.4.	ADIÇÃO DE ADJUVANTE.....	24
4.5.	VACINAÇÕES E COLETAS DE SANGUE.....	25
4.5.1.	ANIMAIS.....	25
4.5.2.	VACINAÇÕES E COLETAS SANGUÍNEAS.....	25
4.6.	VIRUSNEUTRALIZAÇÃO.....	25
4.7.	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	26
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
5.1.	CINÉTICA DE INFECÇÃO.....	27
5.2.	PRODUÇÃO DE VÍRUS VACINAL.....	31
5.3.	SOROLOGIA DA RESPOSTA VACINAL.....	33
6.	CONCLUSÕES.....	37
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38



## RESUMO

SOUZA, Luiz Felipe Lourenço M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2006.  
**Comparação de isolados de Herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) como candidatos à vacina.** Orientador: Mauro Pires Moraes. Co-orientadores: Joaquin Hernán Patarroyo Salcedo e Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo.

O herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) é o agente etiológico da meningoencefalite bovina que apresenta alta morbidade em bovinos jovens. Devido à similaridade na morfologia do virion, efeito citopático na cultura de células e propriedades antigênicas, o BoHV-5 foi classificado erroneamente como herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1). Este vírus é responsável por doenças respiratórias e genitais, porém a doença causada pelo BoHV-5 apresenta sinais clínicos neurológicos, com isso o vírus foi considerado uma variante do mesmo agente com características de neuropatogenicidade. Estudos comparativos entre isolados de BoHV-5 revelaram 97% de similaridade protéica. No entanto, a região amino terminal da glicoproteína mais abundante do envelope viral, a gC, difere substancialmente. Esta glicoproteína está envolvida nas interações iniciais do vírus com a superfície celular, além de se apresentar como alvo para anticorpos com atividades neutralizantes. Este estudo objetivou selecionar um isolado do vírus BoHV-5, entre 5 isolados coletados em surtos da doença em diferentes propriedades, que confira maior antigenicidade em animais vacinados. As vacinas foram formuladas com os isolados ISO9898292, SV507, SV163, 1807 e EVI145 e administradas a 5 grupos de 10

ovelhas, as quais receberam duas doses vacinais por via intramuscular nos dias 0 e 21. Foram realizadas coletas de sangue para análise de produção de anticorpos por virusneutralização e acompanhamento de possíveis sinais clínicos até o 63º dia após a primo-vacinação. Foram observados dois picos na curva de anticorpos, o primeiro no dia 14, após a vacinação, onde os títulos de anticorpos variaram entre 4,50 (isolado ISO9898292) a 138,62 (isolado SV163). O segundo pico foi observado 14 dias após a revacinação onde os títulos variaram entre 7,77 (ISO9898292) a 1017,54 (1807). No 42º dia após a revacinação observou-se variação de título entre 3,84 (ISO9898292) a 305,97 (1807). A discrepância entre as médias de título de anticorpo de cada grupo de animais sugere uma menor antigenicidade do isolado ISO9898292 em relação aos demais, demonstrando uma possível variação entre os isolados, o que resulta em diferenças antigênicas. Todos os isolados, com exceção ao ISO9898292, mostraram-se eficazes na indução de anticorpos.

## ABSTRACT

SOUZA, Luiz Felipe Lourenço M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July of 2006.  
**Comparison of Bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) isolates as vaccine candidates.** Adviser: Mauro Pires Moraes. Co-Adviser: Joaquin Hernán Patarroyo Salcedo and Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo.

Bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) is the etiological agent of the bovine meningoencephalitis that presents high morbidity in young bovine. Due to the similarity in the morphology of the virion, cytopathic effect in cell culture and antigenic properties, the BoHV-5 was classified erroneously as BoHV-1 in the past. BoHV-1 is responsible for respiratory and genital diseases, however the disease caused by BoHV-5 presents neurological clinical signs. This virus has been considered a variant of the same agent (BoHV-1) with neuropathogenic characteristics. Comparative studies among isolates of BoHV-5 revealed 97% of proteic similarity. However, the amino-terminal region of the most abundant glycoprotein of the viral envelope, the gC, differs substantially. This glycoprotein is involved in the initial interactions of the virus with the cellular surface besides of presenting as target for antibodies with neutralizing activities. This study aimed at to select an isolate of BoHV-5, among 5 isolates collected in outbreaks in different properties in Brazil, presenting higher antigenicity in vaccinated animals. Vaccines were formulated using isolates ISO9898292, SV507, SV163, 1807 and EVI145 and administered to 5 groups of 10 sheeps, which have received two intramuscular doses on days 0 and 21. Collections of blood were accomplished for analysis of production of antibodies by virus-neutralization and

attendance of possible clinical signs to the 63rd day after the first vaccination. Antibodies titers averages ranged from 6,85 and 14,92 on the day 0 before the first vaccination. Antibody peak were on day 14, ranged from 4,50 (isolated ISO9898292) to 138,63 (isolated SV163). A second peak was observed 14 days after the booster ranged from 7,77 (ISO9898292) to 1017,54 (1807). In the 42nd day after the booster, it was observed titers variation from 3,84 (ISO9898292) to 305,97 (1807). The discrepancy among titers of antibody of each group of animals suggests a smaller antigenicity of isolated ISO9898292 in relation to the others, demonstrating a possible variation among the isolates, what results in antigenic differences. All isolates, with exception to ISO9898292, were effective in the induction of antibodies.

## 1. INTRODUÇÃO

O herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) é o agente etiológico da meningoencefalite bovina. Doença do sistema nervoso central (SNC) que se caracteriza histologicamente por meningoencefalite não-supurativa com necrose do córtex cerebral (ELIAS *et al.*, 2004).

A meningoencefalite causada pelo BoHV-5 é uma doença geralmente fatal em bovinos jovens, sendo responsável por expressiva mortalidade do rebanho em regiões onde a doença apresenta alta incidência (ROEHE *et al.* 1997). Infecções causadas pelo BoHV-5 já foram descritas em vários países da Europa, América do Norte, América do Sul, Canadá e Austrália. Alguns autores consideram que a incidência mais importante desta doença está presente no hemisfério sul incluindo a Austrália, Argentina e Brasil. No Brasil a meningoencefalite é freqüente no Rio Grande do Sul, Mato Grosso do Sul e Matogrosso, havendo casos relatados também nos Estados de São Paulo e Minas Gerais. Em todas as regiões a doença ocorre principalmente na forma de surtos com morbidade variável e letalidade alta, embora em alguns casos os animais possam sobreviver (ELIAS *et al.*, 2004).

Os sinais neurológicos se caracterizam por depressão, anorexia, ptialismo, bruxismo, incoordenação, tremores musculares, cegueira e eventualmente morte (PIDONE *et al.*, 1999). A raiva bovina, amplamente disseminada no Brasil, tem sido considerada a suspeita clínica primária nos casos de meningoencefalite bovina em várias regiões do país. O diagnóstico diferencial é muito importante para a correta

interpretação clínica (GOMES *et al.*, 2002). Além da raiva, os sinais clínicos da doença podem ser confundidos com a pseudorraiva, a polioencefalomalacia, a intoxicação com chumbo e sais, entre outras (PEDRAZA & ALESSI, 2004).

Uma das principais diferenças para o controle das doenças causadas pelos herpesvírus é que os animais infectados transportam o vírus por toda vida (PIDONE *et al.*, 1999), e a maioria dos surtos relatados ocorreu após alguma prática de manejo envolvendo os rebanhos afetados. Isso confirma a patogenia da doença e o estabelecimento de latência do vírus, que é reativado desencadeando a doença quando os bovinos são submetidos a um estado de estresse (ELIAS *et al.*, 2004).

O controle das infecções causadas por herpesvírus está baseado principalmente na imunização com vacinas inativadas ou vacinas vivas modificadas. E os maiores índices de proteção observados entre os animais imunizados podem ser atribuídos a uma possível influência das diferenças antigênicas entre os isolados que compõem a vacina, o que resulta em uma resposta mais eficaz em termos de proteção. Com isso faz-se necessário um estudo comparativo entre isolados de BoHV-5 buscando selecionar a espécie mais antigênica para formulação de vacinas com alta capacidade de proteção.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Distribuição Geográfica

O Herpesvírus Bovino Tipo 5 (BoHV-5), ou vírus da encefalite bovina, é o agente etiológico da meningoencefalite bovina. Doença que acomete o sistema nervoso central (SNC) e caracteriza-se histologicamente por meningoencefalite não-supurativa com necrose do córtex cerebral (ELIAS *et al.*, 2004). A infecção geralmente é fatal em bovinos jovens, provocando elevado índice de mortalidade do rebanho em regiões onde sua incidência é alta (ROEHE *et al.* 1997). A doença foi descrita pela primeira vez em 1962 quando o vírus foi isolado a partir de um surto que matou vários bezerros na Austrália (PEDRAZA e ALESSI, 2004).

A real prevalência do BoHV-5 ainda não está esclarecida no mundo (VAN OIRSCHOT, 1998, OSORIO, 1998) citado por Quincozes (2005). Infecções causadas por esta estirpe já foram descritas em vários países da Europa, América do Norte, América do Sul, Canadá e Austrália. Porém, nos países do Hemisfério Norte há uma baixa prevalência de encefalites, o que pode estar relacionado aos programas de vacinação contra BoHV-1 (BELKNAP *et al.*, 1994, CASCIO *et al.*, 1999). Já nos países do hemisfério sul, incluindo a Austrália, Argentina e Brasil, há uma elevada incidência desta doença, apesar do vírus não ter caráter sazonal e nem preferência por raça ou sexo. Contudo as condições de criação parecem influenciar, uma vez que em rebanhos de criação intensiva e onde aglomeram-se animais de diferentes origens, surtos da doença são mais comuns (GEORGE, 1991). No Brasil a meningoencefalite é freqüente no Rio

Grande do Sul, Mato Grosso do Sul e Mato Grosso, com ocorrência de casos também nos estados de São Paulo e Minas Gerais conforme relatado por Gomes *et al.* (2002). Em todas as regiões a doença ocorre principalmente na forma de surtos com morbidade variável podendo atingir uma taxa de 25% e letalidade alta alcançando uma taxa de 100%, a duração do quadro clínico pode variar de 1 a 15 dias, com evolução média de 6 dias (SALVADOR *et al.*, 1998). Riet-Correa *et al.* (1996) relataram animais que sobreviveram até 7 dias após o início dos sinais clínicos, embora em alguns casos os animais possam recuperar (ELIAS *et al.*, 2004). A disseminação viral ocorre por aerossóis e secreções corpóreas, conforme Weiblen (1996), embora outros autores afirmem que apenas o contato entre mucosas tenha importância epidemiológica (SALVADOR, 1997).

## 2.2. Classificação do Vírus

Inicialmente, o BoHV-5 foi classificado como Herpesvírus Bovino Tipo 1 (BoHV-1) devido à similaridade na morfologia do virion, efeito citopático na cultura de células e propriedades antigênicas. O BoHV-1 é responsável por doenças respiratórias e genitais, sendo o BoHV-1.1 o agente etiológico da rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) e o BoHV-1.2 o agente etiológico da vulvovaginite pustular infecciosa (IPV) e balanopostite pustular infecciosa (IPB). Entretanto a doença causada pelo BoHV-5 apresenta sinais clínicos neurológicos. Diante disto, o vírus foi considerado uma variante do BoHV-1 com características de neuropatogenicidade. Em 1986, estudos subsequentes indicaram que os vírus diferem em propriedades genômicas e antigênicas, com isso a estirpe neuropatogênica foi denominada Herpesvírus Bovino Tipo 1.3 (BoHV-1.3) Delhon *et al.* (2003). Esta classificação foi aceita até 1992 quando o Comitê Internacional de Taxonomia Viral propôs uma nova classificação, na qual o vírus da encefalite bovina passou a ser denominado BoHV-5 (PEDRAZA e ALESSI, 2004).

O BoHV-5 pertence à família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*, gênero *Varicellovirus*. Os membros da família *Herpesviridae* caracterizam-se pela arquitetura do virion que possui peso molecular (PM) de  $95-150 \times 10^6$  Daltons (Da) (FENNER *et al.* 1993), e consiste de um núcleo que contém DNA linear de cadeia dupla



(dsDNA), uma cápside icosaédrica de aproximadamente 100 a 110 nm de diâmetro, contendo 162 capsômeros, algumas vezes apresenta material assimétrico que envolve a cápside denominado tegumento e um envelope que contém glicoproteínas virais (PEDRAZA e ALESSI, 2004). Além do mais, são compostos de 22% de lipídeos, principalmente de fosfolipídios, 2% de carboidratos e pequenas quantidades de poliaminas (DULBECCO e GINSBERG, 1980) citado por (QUINCOZES, 2005).

Os herpesvírus são sensíveis aos solventes lipídicos (ANDREWES *et al.*, 1978) como acetona, deoxicolato de sódio, clorofórmio, álcool etílico, éter etílico e algumas enzimas proteolíticas (GUSTAFSON, 1981) citado por (QUINCOZES, 2005). Andrewes *et al.* (1978) relataram que os herpesvírus são relativamente termolábeis, sensíveis a choques osmóticos (PORTERFIELD, 1989) citado por (QUINCOZES, 2005) e a extremos de pH. O BoHV-1 é estável a uma faixa de pH entre 6.0-9.0, mas lábil a pH 4.5-5.0 (GUSTAFSON, 1981) citado (QUINCOZES, 2005).

A família *Herpesviridae* é subdividida em três subfamílias: *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae*, e *Gammaherpesvirinae*. Os membros da subfamília *Alphaherpesvirinae* são classificados com base na susceptibilidade dos hospedeiros, ciclo reprodutivo relativamente curto, rápida propagação em cultura, destruição eficiente das células infectadas e a capacidade em estabelecer infecções latentes. Nesta subfamília estão incluídos os gêneros *Simplexvirus*, *Varicellovirus* (VZV), o Vírus da doença de Aujeszky, da rinopneumonite equina (FENNER *et al.*, 1993), o Vírus da doença Marek e o da laringotraqueite infecciosa (FIELDS, 1996).

### 2.3. Organização do genoma

O genoma do BoHV-5 possui 138.390 pb, 2.518 pb a mais que o genoma do BoHV-1, contém 75% de bases G+C (guanina e citocina) em sua composição e consiste de duas seqüências únicas: longa ou U<sub>L</sub> com 104.054 pb e curta ou U<sub>S</sub> com 9.548 pb (DELHON *et al.*, 2003). Tanto os nucleotídeos quanto as proteínas do BoHV-5 e BoHV-1 apresentam homologia superior à 85%. Com base nessas observações, utiliza-se a morfologia e estrutura do BoHV-1 para descrever parte das propriedades do BoHV-5 (FLORES *et al.*, 1998).

## 2.4. Proteínas Virais

O BoHV-5 possui aproximadamente 48 proteínas virais dentre elas, encontram-se as glicoproteínas do envelope (PIDONE *et al.*, 1999). Estas estão envolvidas nos processos de infecção viral, mediando o reconhecimento e adsorção às células alvo, penetração do vírion, fusão e disseminação do vírus célula a célula (ROIZMAN, 1996). Os *Alphaherpesvirus* codificam no mínimo 10 glicoproteínas que estão presentes no envelope do vírion (CHOWDHURY *et al.*, 2000). O genoma do BoHV-1 codifica 4 glicoproteínas ou complexos glicoprotéicos principais, designados gI (gB), gII (gE), gIII (gC) e gIV (gD), algumas das quais apresentam importante homologia com seus pares dos Herpes simplex vírus (HSV), BoHV-5 e do vírus da Pseudorraiva suína (PRV) (PIDONE *et al.*, 1999).

Algumas diferenças antigênicas foram detectadas entre as glicoproteínas do envelope do BoHV-1 e BoHV-5, a principal delas está no gene **UL44** que codifica a glicoproteína C (gC), sendo que a gC do BoHV-5 e do BoHV-1 diferem em 25% devido a deleção do aminoácido 35 na gC do BoHV-5. Isso ocasiona a remoção de dois potenciais sítios de glicosilação e um epítopo específico presentes na gC do BoHV-1 (DELHON *et al.*, 2003).

A gC é a mais abundante glicoproteína dos envelopes tanto do BoHV-1 quanto do BoHV-5, além de ser altamente imunogênica, o que confere uma predominância de anticorpos com atividade vírus-neutralizante contra esta glicoproteína. A gC do BoHV-1 tem massa molecular de aproximadamente 97kDa e é pouco maior que sua contrapartida no BoHV-5. A seqüência de nucleotídeos revelou que a ORF para gC do BoHV-5 sintetiza 50 aminoácidos a menos do que a “Open Reading Frame” (ORF) que codifica a gC do BoHV-1, explicando as diferenças observadas entre estas proteínas (OLDONI *et al.*, 2004). A gC afeta o neurotropismo, é importante para os altos níveis de replicação viral e expressão completa da virulência no SNC de coelhos, além de mediar a adsorção primária do vírus às células alvo via ligação às glicanas de superfície (DELHON *et al.*, 2003).

Estudos prévios demonstraram que os anticorpos monoclonais (MAbs) neutralizantes anti-BoHV-1 e BoHV-5 estão direcionados contra a gC. Isso demonstra que esta glicoproteína parece ancorar um número de epítopos conservados imunodominantes. Contudo a gC está entre as mais variáveis proteínas do BoHV-1 e

BoHV-5. De fato, o mapeamento da seqüência de aminoácidos revela que diferenças relevantes entre a gC do BoHV-1 e do BoHV-5 estão concentradas em um terço da proteína localizado na região amino-terminal, com apenas 23,5% de homologia entre os aminoácidos. Nesta região encontra-se grande parte dos epítomos específicos da gC. Em contraste, os outros dois terços localizados na terminação-carboxi dessas glicoproteínas possuem 90% de homologia. O alto grau de homologia nesta região explica a reatividade cruzada de MAbs anti-gC do BoHV-1 e BoHV-5 e pode contribuir a uma extensiva proteção cruzada observada entre estes vírus (OLDONI *et al.*, 2004).

Estudos com as glicoproteínas virais gB e gD através da utilização de MAbs revelaram que, assim como a gC, estas proteínas também são imunodominantes. Além disso, apresentam baixa diversidade antigênica entre elas, o que também pode contribuir para uma elevada neutralização cruzada entre o BoHV-1 e BoHV-5 (OLDONI *et al.*, 2004).

A gD é uma das glicoproteínas importantes envolvidas na neutralização. Aparentemente esta glicoproteína é responsável pela penetração do vírus na célula hospedeira e possivelmente participa da adsorção viral e fusão celular. Por sua vez, a gB está envolvida com proteínas celulares responsáveis pelos efeitos citopáticos (ECP) ocasionados pela infecção com o BoHV-1 (PIDONE *et al.*, 1999).

As gE e gI parecem ser importantes na virulência e propagação de vários herpesvírus, como tem sido demonstrado em estudos com modelos animais. Dispensáveis para replicação em cultivos celulares, os genes para gE e gI são conservados em todos *Alphaherpesvirus*. Estas glicoproteínas associam-se uma à outra logo após sua síntese formando o complexo gE-gI. Para alguns herpesvírus, o complexo gE-gI funciona como receptor para o domínio Fc da imunoglobulina G o que pode representar um mecanismo na evasão da imunidade humoral. *In vitro*, este complexo está envolvido na transmissão viral célula a célula, possivelmente pela promoção da fusão celular ou liberação do vírus (CHOWDHURY *et al.*, 2000).

Mutantes PRV deletados para gE e gI possuem neurotropismo restrito e reduzidos fenótipos de virulência. Existem também evidências de que o gE-gI atua na entrada do PRV em alguns circuitos neurais. Nos herpes simplex vírus tipo 1 (HSV-1), mutantes deletados para gE e gI apresentam eficiência de propagação no sistema nervoso reduzida quando comparados ao tipo selvagem. Adicionalmente, o complexo

gE-gI facilita o movimento do HSV através da junção extensiva formada entre os neurônios *in vivo* (CHOWDHURY *et al.*, 2000).

A deleção do gene **gE** para BoHV-1, como em outros *Alphaherpesvirus*, é suficiente para reduzir sua virulência em bovinos (CHOWDHURY *et al.*, 2000). Estudos também relatam que a gE do BoHV-5 é importante para uma propagação neural eficiente e neurovirulência no SNC. Contudo não tem nenhum papel na penetração do vírus através da via olfatória (CHOWDHURY *et al.*, 2000).

## 2.5. Multiplicação Viral

O processo de infecção viral inicia quando glicoproteínas do envelope viral, incluindo a gC e a gB, reconhecem e ligam-se a receptores celulares específicos de sulfato de heparana da membrana celular (ROIZMAN, 1996; BABIUK *et al.*, 1996; MEYER *et al.*, 1998). A adsorção do vírus à superfície celular ativa um processo mediado por glicoproteínas virais, onde pelo menos 5 glicoproteínas (gB, gD, gH, gL e gK) estão envolvidas no processo de fusão e penetração viral (WILD *et al.*, 1998).

Os processos de transcrição e replicação do DNA viral ocorrem no núcleo das células infectadas, enquanto que a síntese protéica viral, dá-se no citoplasma (ROIZMAN, 1996). A transcrição dos genes virais é regulada temporalmente, havendo três classes de RNA mensageiro (mRNA) denominadas: genes  $\alpha$  ou “imediatamente precoces”,  $\beta$  ou “precoces” e  $\gamma$  ou “tardios”, que são transcritos pela RNA polimerase II celular (FENNER *et al.*, 1993; ROIZMAN, 1996). Genes  $\alpha$  e  $\beta$  codificam enzimas ou proteínas que complexam-se ao DNA viral, enquanto que a maioria dos genes  $\gamma$  codificam proteínas estruturais (FENNER *et al.*, 1993).

Os genes  $\alpha$  são os primeiros a serem transcritos. Participam deste processo proteínas do tegumento em interação com fatores de transcrição celular. As  $\alpha$ -proteínas iniciam o processo de transcrição dos genes  $\beta$  (ROIZMAN, 1996). Funcionalmente, as  $\beta$ -proteínas estão envolvidas na regulação da transcrição das  $\alpha$ -proteínas, suprimindo-as, e das  $\gamma$ -proteínas, promovendo-as. As  $\gamma$ -proteínas juntamente com as  $\alpha$ -proteínas estando envolvidas no processo de replicação do genoma viral (FENNER *et al.*, 1993). Nesta fase, o DNA viral pode ser encontrado na forma circular ou linear (ROIZMAN, 1996).

O DNA viral sintetizado é processado e “empacotado” em capsídeos imaturos recém-formados (ROIZMAN, 1996).

O processo de maturação do vírion envolve as etapas de formação do nucleocapsídeo e a associação do nucleocapsídeo com áreas da camada interna da membrana nuclear adquirindo assim, o envelope viral (FENNER *et al.*, 1993; ROIZMAN, 1996). No citoplasma, há acúmulo de vírions maduros causando lise da membrana plasmática celular. Os vírions também acumulam-se dentro de vesículas, utilizando-se do Complexo de Golgi para serem exportados para o meio extracelular ou ocorre a dispersão das partículas virais célula à célula (ROIZMAN, 1996).

## 2.6. Comparação entre BoHV-1 e BoHV-5

O BoHV-1 e BoHV-5 assemelham-se em aspectos estruturais, biológicos, antigênicos e moleculares, além de possuírem 85% de homologia em seus DNAs (PEDRAZA e ALESSI, 2004). A principal diferença entre os vírus é a habilidade em invadir, replicar no SNC e causar a doença neurológica, porém ambos possuem neurotropismo e estabelecem latência nos gânglios sensoriais trigêmeo e sacro, após inoculação intranasal e conjuntival. O SNC do bovino possui receptores tanto para as estirpes nervosas BoHV-5, quanto para todas as variantes do BoHV-1 estudadas. Contudo, estudos comprovaram diferenças entre o BoHV-1 e BoHV-5 no gene **IE1** e nos genes que codificam as proteínas *bTIF* e VP8, as quais poderiam explicar o tropismo diferencial que caracteriza estas cepas (PIDONE *et al.*, 1999).

Estudos com anticorpos monoclonais demonstram diferenças antigênicas expressivas entre as glicoproteínas do envelope viral do BoHV-1 e do BoHV-5. Neste sentido, resultados obtidos *in vitro* por cinética de neutralização revelaram que o BoHV-1.1 e o BoHV-1.2 possuem semelhanças antigênicas, ao passo que as diferenças que existem com a cepa nervosa são significativas. Apesar destas diferenças, a proteção cruzada entre o BoHV-1 e BoHV-5 através de imunização ativa e passiva já foi demonstrada experimentalmente em bovinos. Essa reatividade sorológica cruzada tem sido responsável, em parte, pela baixa prevalência do BoHV-5 e pela ocorrência rara da doença neurológica em países que vacinam regularmente contra o BoHV-1 (BELTRÃO *et al.*, 2000). Porém, a ocorrência de proteção cruzada entre BoHV-1 e BoHV-5 é

ainda controversa. Uma possível proteção cruzada entre estes vírus seria de interesse para estratégias de imunização e produção de vacinas (OLDONI *et al.*, 2004).

## 2.7. Modelos Experimentais

Com o objetivo de estudar a patogenia da encefalite causada pelo BoHV-5, têm-se utilizado como modelos experimentais coelhos, ovelhas e bovinos (PEDRAZA e ALESSI, 2004). Apesar de representarem modelos diferentes, a infecção neurológica provocada pelo BoHV-5 em bovinos e coelhos apresenta características similares (BELTRÃO *et al.*, 2000).

Camundongos, entretanto, não são utilizados para o estudo da patogênese do BoHV-1 ou BoHV-5 pois estes animais possuem um mecanismo imune antiviral, ainda pouco conhecido, mediado por interferon que neutraliza diretamente a replicação e propagação do vírus, ou indiretamente, modulando a resposta imune imediatamente após a infecção (ABRIL *et al.*, 2004). Desta forma, os camundongos possuem resistência às infecções causadas por ambos vírus. Por outro lado, a patogênese de infecções neurológicas causadas por dois outros *Alphaherpesvirus* neurotrópicos, o HSV e o PRV, é amplamente estudada em camundongos (SILVA *et al.*, 1999). BoHVs e HSV-1 utilizam o mesmo receptor para infecção das células, no entanto, apenas o HSV-1 pode facilmente infectar camundongos. Diante disto, foi possível comprovar que os fatores relativos à permissividade celular são mais importantes para a evolução da infecção do que os fatores relacionados à adsorção e entrada do vírus. Com isso tais fatores também são responsáveis pela restrição de replicação dos BoHVs em camundongos (ABRIL *et al.*, 2004).

## **2.8. Patogenia**

### **2.8.1. Patogenia Celular**

As principais vias de entrada do BoHV-1 são as mucosas respiratória ou genital (GIBBS e RWEYEMAMU, 1977). A entrada dos herpesvírus é mediada por várias glicoproteínas do envelope viral. O vírus geralmente penetra nas células via fusão do envelope com a membrana plasmática ou por endocitose. Os herpesvírus utilizam várias glicoproteínas que mediam a ligação, fusão e penetração (WILD *et al.*, 1998).

O mecanismo de entrada do BoHV-1 e do BoHV-5 em células MDBK (Madin Darby Bovine Kidney) envolve ligação à superfície celular, fusão das membranas, sinalização para a conclusão do processo de invaginação, perfuração da membrana plasmática sem perda substancial de material citoplasmático, geração de energia para dirigir a partícula viral no citoplasma e defusão e restauração da membrana plasmática após total entrada do vírus (WILD *et al.*, 1998).

A fase de adsorção leva entre 0 a 30 segundos após incubação à 37°C, neste momento todos os vírus se encontram extracelular, porém alguns podem estar ligados à membrana plasmática. Entre 30 a 40 segundos de incubação à 37°C, o envelope de alguns vírus encontra-se parcialmente fundido com a membrana plasmática externa. Nesta fase, apenas três camadas, resultantes da fusão, das duas bicamadas são visíveis, sugerindo que a camada externa do envelope viral encontra-se fundida com a camada externa da membrana plasmática. A fusão completa ocorre aos 45 segundos de incubação sendo que a camada externa do envelope viral funde-se com a camada interna da membrana plasmática e vice-versa, resultando em uma interseção das membranas no local da fusão. Em seguida ocorre a penetração que é caracterizada por invaginação e/ou perfuração da membrana plasmática no local de fusão. Após 50 segundos de incubação os vírus podem ser detectados no citoplasma celular. E em aproximadamente 15 minutos estes já encontram-se próximos aos poros nucleares (WILD *et al.*, 1998).

O crescimento dos herpesvírus causa distúrbios na arquitetura celular, com o aparecimento de inclusões intra-nucleares, marginação da cromatina e destruição dos nucléolos. O acúmulo de DNA viral recentemente sintetizado pode ser observado através do desenvolvimento de uma massa basofílica no núcleo celular. À medida que os capsídeos vão se formando, estes migram-se para o citoplasma. É através desta

migração que os vírus adquirem o envelope quando brotam através da membrana nuclear, causando morte celular (FENNER *et al.*, 1993).

### 2.8.2. *Vias de Infecção*

A replicação primária do vírus ocorre nas células epiteliais, bem como em células da submucosa e tecido conjuntivo, podendo permanecer nas secreções nasais e linfonodos do trato respiratório por mais de 9 dias. Após a infecção primária, ocorre uma viremia transitória, raramente detectada (GIBBS e RWEYEMAMU, 1977), que precede o aparecimento de anticorpos específicos no animal (PASTORET *et al.*, 1982). A partir das mucosas, o vírus é transportado por monócitos aos órgãos alvo incluindo sistema nervoso, trato digestivo ou feto (WYLER *et al.*, 1989) citado por (QUINCOZES, 2005).

Nos casos de meningoencefalites, o vírus chega ao cérebro através das ramificações maxilares e mandibulares do nervo trigêmeo ou através dos bulbos olfatórios e/ou das meninges a partir do osso etmóide (PIDONE *et al.*, 1999). Porém, o sistema olfatório não constitui a única via de acesso do BoHV-5 ao SNC de coelhos, uma vez que, a interrupção cirúrgica dessa via reduziu drasticamente, mas não preveniu a invasão do SNC pelo BoHV-5 a partir da cavidade nasal (BELTRÃO *et al.*, 2000).

A ocorrência de meningoencefalite fatal em coelhos inoculados pela via intraconjuntival indica que outras vias nervosas também podem ser utilizadas pelo BoHV-5 para invadir o cérebro de coelhos. No entanto, o surgimento tardio da doença e o menor índice de morbidade entre os animais infectados pela conjuntiva sugerem que a invasão por essa via é menos eficiente quando comparada com a via olfatória (BELTRÃO *et al.*, 2000).

## 2.9. **Sinais Clínicos**

Os sinais neurológicos causados pela doença caracterizam-se por depressão profunda, anorexia, ptialismo, bruxismo, incoordenação, tremores musculares, isolamento do rebanho (SALVADOR *et al.*, 1998), corrimento nasal e ocular, salivação excessiva,



decúbito com movimento de pedalagem (HILL *et al.*, 1984), cegueira e morte (PIDONE *et al.*, 1999). As lesões típicas correspondem a uma meningoencefalite necrosante aguda, não supurativa, amplamente distribuída, que pode variar de grau leve a severo. Estas podem acometer desde a porção frontal do telencéfalo até a medula espinhal. Isso explica as diversas manifestações neurológicas observadas nos animais infectados. Lesões no diencéfalo e córtex cerebral, incluindo a região occipital estão relacionadas aos sintomas de depressão profunda, alternada com períodos de excitação e cegueira. Já manifestações como torção, incoordenação, opistótono e tremores musculares, em geral, estão associadas a lesões no tronco encefálico, cerebelo e medula cervical (ELIAS *et al.*, 2004, PEDRAZA e ALESSI, 2004).

Formas nervosas associadas com comprometimento do sistema digestivo e/ou respiratório foram relatados (BARENFUS *et al.*, 1963). Embora o vírus não seja primariamente associado à doença respiratória, a inoculação experimental com BoHV-5 pode causar sinais clínicos respiratórios leves e transitórios (HALL *et al.*, 1966).

A raiva bovina, amplamente disseminada no Brasil, tem sido considerada a suspeita clínica primária nos casos de meningoencefalite bovina em várias regiões do país. Além da raiva, os sinais clínicos da doença podem ser confundidos com a pseudorraiva, polioencefalomalacia, intoxicação com chumbo e sais (PEDRAZA e ALESSI, 2004), listeriose e encefalopatia espongiiforme bovina (GOMES *et al.*, 2002).

A meningoencefalite causada por BoHV-5 é epidemiológica e clinicamente semelhante à polioencefalomalacia (PEM), doença que acomete ruminantes, e é caracterizada por necrose da substância cinza do córtex cerebral atribuída a distúrbios no metabolismo da tiamina. Como também pode ocorrer associada a vários outros fatores, como intoxicação por cloreto de sódio (síndrome de privação de água), envenenamento por chumbo (LEMOS e NAKASATO, 2001) citado por (ELIAS *et al.*, 2004) e altos níveis de H<sub>2</sub>S intra-ruminal causados por excesso de enxofre na dieta (LORENAGAN *et al.*, 1998) citado por (ELIAS *et al.*, 2004).

Lesões macroscópicas no SNC nem sempre são observadas na meningoencefalite causada por BoHV-5 (BARENFUS *et al.*, 1963, HALL *et al.*, 1966). Quando estas ocorrem, o córtex cerebral pode apresentar áreas de coloração amarelada ou acinzentada. Ocasionalmente, essas áreas apresentam-se deprimidas podendo-se observar cavitação da substância cinzenta (SALVADOR *et al.*, 1998). Congestão das meninges, petéquias e edema no cérebro e cerebelo foram descritos em animais de 1 a 4

meses (DIAS *et al.*, 1982). Além disso, Pedraza e Alessi (2004) observaram aspecto finamente granular do córtex, às vezes associado com hemorragias, principalmente submeníngeas, enquanto Riet-Correa e colaboradores (1996) observaram achatamento das circunvoluções cerebrais, protusão do cerebelo através do forâmen magno e congestão das meninges. De fato, durante a ocorrência de surtos no Mato Grosso foram descritos congestão encefálica difusa, hemorragias submeníngeas multifocais, achatamento de circunvoluções cerebrais e áreas de malacia (ELIAS *et al.*, 2004).

## **2.10. Resposta Imune**

As discussões sobre o papel da imunidade humoral e imunidade mediada por células nas infecções por herpesvírus têm sido relatadas desde a década de 70 (GIBBS e RWEYEMAMU, 1977).

O principal mecanismo de imunidade específica contra infecções virais estabelecidas é desempenhado por linfócitos T citotóxicos (LTC) que apresentam marcadores CD8+. Os LTC CD8+ reconhecem antígenos virais processados no interior das células em associação com moléculas do complexo de histocompatibilidade principal classe I (MHC-I), presentes em todos os tipos de células nucleadas. Os LTC induzem a lise das células infectadas pelo vírus, estimulando enzimas intracelulares que degradam o genoma viral, bem como a secreção de citocinas com atividade de interferon (IFN) (ABBAS *et al.*, 2005).

A infecção viral estimula diretamente a produção de IFN $\alpha$  pelas células infectadas, sendo o mais potente sinal para a síntese de citocinas. O IFN $\alpha$  possui três atividades principais: induzir as células adjacentes a um estado antiviral pela resistência à infecção viral e inibição da replicação viral, ativar o potencial lítico das células “Natural Killer” (NK) e aumentar a expressão de moléculas da classe I do MHC nas células infectadas por vírus (ABBAS *et al.*, 2005).

Bovinos expostos ao BoHV-1 secretam interferon (IFN) tipo 1 tanto nas secreções nasais como vaginais. A produção imediata deste pode ser importante para a rápida proteção local nos estágios adiantados da infecção. O BoHV-1 é um indutor de IFN muito eficaz, por não ser tão susceptível a ele como muitos outros vírus. As células NK também aumentam em número logo após a infecção por BoHV-1. Finalmente, sabe-

se que *in vitro* o BoHV-1 altera a capacidade funcional do macrófago alveolar bovino (PIDONE *et al.*, 1999).

Na imunidade humoral, a resposta primária é caracterizada pela formação de anticorpos das classes IgM e IgG, sendo que, os anticorpos neutralizantes dirigidos contra as glicoproteínas de superfície, provavelmente possuem importância na imunidade a longo prazo. Sua detecção é possível por meio da virusneutralização em 8 a 12 dias pós-infecção e persiste 5 anos em média, porém essa persistência requer alguma re-estimulação. A atividade neutralizante pode ser também detectada em secreções nasais e genitais devido a presença de imunoglobulina A (IgA) (PIDONE *et al.*, 1999).

Bovinos recém nascidos dispõem de anticorpos via colostro, principalmente nas primeiras 12 horas pós parto (fundamentalmente IgG1), porém não produzem uma proteção absoluta, apenas diminuem a agressividade da infecção (PIDONE *et al.*, 1999).

A lise celular mediada por anticorpo-complemento participa temporariamente da infecção e pode também ser importante na fase tardia de recuperação ou durante a recrudescência de infecções latentes (PIDONE *et al.*, 1999). Contudo, o papel dos anticorpos é questionável em relação à prevenção da disseminação do vírus, de fato como outros vírus, o BoHV-1 pode escapar da ação destes através de pontes intercelulares e/ou de ramificações nervosas.

### **2.11. Diagnóstico Viral e Sorológico**

O diagnóstico virológico de infecções por BoHV-1 e BoHV-5 é realizado através da identificação de antígenos virais sobre secreções ou tecidos de animais infectados, do isolamento do vírus em cultivos celulares ou, ainda, através de métodos moleculares de diagnóstico (ROEHE *et al.*, 1997b). O vírus é excretado nas secreções nasais de 10 a 11 dias após a infecção, período correspondente ao tempo de incubação e início dos sinais clínicos da doença (BAGUST e CLARK, 1972) citado por Quincozes (2005).

O isolamento viral é a técnica padrão para a detecção de BoHV-1 e BoHV-5 (ROEHE *et al.*, 1997b). Para sua execução, suspensões de tecidos ou secreções são colocadas sobre cultivos de células. Após um período de incubação variável (1 à 5 dias), a presença de vírus é detectada pelo efeito citopático (ECP) característico

(arredondamento celular, vacuolização, agrupamento das células e desprendimento do tapete celular) causado no cultivo celular (WEIBLEN *et al.*, 1992). Neste momento, o isolamento viral pode ser confirmado. Porém no isolamento viral em cultivo celular não é possível a caracterização do herpesvírus como tipo 5, uma vez que, a metodologia empregada é a mesma para o isolamento do BoHV-1 (ROEHE, 1996) citado por Quincozes (2005). O diagnóstico, buscando a identificação dos herpesvírus, pode ser obtido através das provas de imunofluorescência direta (ID) ou imunoperoxidase (IPX). Estes testes dependem essencialmente do tipo de anticorpos empregados para a detecção do antígeno. Se realizados com soros policlonais, provavelmente serão incapazes de diferenciar entre amostras de BoHV-1 e BoHV-5. Entretanto, se realizados com anticorpos monoclonais tipo-específicos, poderão ser capazes de diferenciar estes vírus (ROEHE *et al.*, 1997b).

Com relação à sorologia para a detecção de anticorpos contra o BoHV-5, os testes empregados são os mesmos para BoHV-1 (RIET-CORREA *et al.*, 1996). As técnicas mais utilizadas incluem a virusneutralização e o ensaio imuno-enzimático (ELISA). Outras técnicas como a hemaglutinação passiva, gel difusão e fixação de complemento são citados, embora menos utilizados na rotina de laboratório (ROEHE, 1996) citado por Quincozes (2005).

O teste sorológico padrão para a detecção de anticorpos anti-BoHV é a prova de virusneutralização (VN). O teste é confiável e específico. Os animais positivos apresentam títulos médios entre 8 e 64. Ocasionalmente são obtidos títulos mais altos e alguns animais parecem desenvolver títulos muito baixos ou não detectáveis (GIBBS e RWEYEMAMU, 1977).

Em 1970, Black demonstrou pela primeira vez a utilização da técnica de VN em microplacas para a IBR. O autor apresentou como vantagens um grande ganho de tempo, menor trabalho e custos para o teste, quando comparados à forma antiga de utilização de tubos de vidro contendo cultivo celular. A maioria dos laboratórios de diagnóstico virológico veterinário utilizam a VN, isolada ou juntamente com outros ensaios (WEIBLEN *et al.*, 1992).

## 2.12. Profilaxia (Medidas de Controle)

Os principais fatores que vêm contribuindo para a difusão da infecção causada pelos herpesvírus são a introdução nos rebanhos de animais oriundos de leilões ou de importações, sem exigências sanitárias necessárias para prevenir a infecção, a crescente utilização de confinamentos para a engorda de animais, a não obrigatoriedade do controle virológico do sêmen comercializado no país e, principalmente, a falta de informação dos criadores, das autoridades e veterinários sobre estas viroses (SILVA *et al.*, 1998). A presença de animais portadores favorece a perpetuação do vírus no rebanho, uma vez que, eles têm recorrências da infecção eliminando o vírus e, quando a porcentagem de vacas infectadas é alta, elas infectam o rebanho jovem antes da idade reprodutiva (ROEHE *et al.*, 1997b).

A erradicação da doença mediante a identificação e eliminação dos animais sorologicamente positivos ainda é utilizada em algumas regiões onde a prevalência do vírus é baixa, contudo este método ocasiona perdas econômicas significativas (PEDRAZA e ALESSI, 2004).

Devido a isso, a infecção por herpesvírus bovino tem sido controlada e prevenida através da combinação de uma variedade de práticas de manejo e com um bom programa de vacinação (DONKERSGOED e BABIUK, 1991).

Variadas formas de controle e erradicação foram propostas por diversos pesquisadores. Na Europa, a utilização de vacinas com marcadores genéticos, juntamente com o manejo higiênico-sanitário adequado, vêm alcançando resultados positivos no que se refere ao controle desta virose (VAN OIRSCHOT *et al.*, 1996).

No Brasil, o controle da doença baseia-se principalmente na vacinação com vacinas convencionais, incluindo as vacinas vivas modificadas e as inativadas. Contra o BoHV-1 estão disponíveis no mercado as vacinas contendo o vírus vivo atenuado, termossensíveis, marcadas gE<sup>-</sup> e inativadas, sendo que, as vacinas contra o BoHV-5 tendem a seguir as mesmas linhas das vacinas contra BoHV-1. A utilização dessas vacinas objetiva, principalmente, reduzir as mortes no rebanho após infecção e desse modo diminuir o impacto econômico das infecções pelo vírus (VAN OIRSCHOT *et al.*, 1996).

A produção de vacinas virais inativadas envolve a propagação do vírus em cultivo “*in vitro*”, e sua virulência é perdida, sem alterar a imunogenicidade de suas

proteínas, à medida que o vírus é inativado por tratamentos químicos ou físicos (PASTORET, 1997). As vacinas inativadas contra os BoHVs são tratadas com formaldeído, etanol ou etilenamina e por inativação por calor ou irradiação UV. As glicoproteínas do envelope viral são essenciais na resposta imune antiviral (DUQUE *et al.*, 1989), desta forma, novos métodos de inativação viral na produção de vacinas vêm sendo testados, sendo que, os mais promissores são aqueles que atingem o ácido nucléico viral sem prejudicar as proteínas de interesse. Alterações na estrutura do ácido nucléico viral podem levar à inativação do patógeno (KASERMANN *et al.*, 2001).

As vantagens das vacinas inativadas sobre as vacinas atenuadas permanecem no fato que não provocam aborto nem disseminação viral após vacinação e o estabelecimento de infecção latente pela cepa vacinal é impossível, além de permitir a fabricação de vacinas polivalentes, por não ter interferência com a produção de anticorpos contra outro antígeno. São perfeitamente toleradas e, apesar da eficácia destas vacinas estar sujeitas a controvérsia, segundo alguns resultados concretos seriam efetivas para o controle das infecções causadas por BoHVs (PIDONE *et al.*, 1999).

### **3. OBJETIVO**

Comparar cinco BoHV-5 isolados em diferentes regiões brasileiras quanto à cinética de produção em cultivo de células e a sua antigenicidade em ovinos.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

Esse trabalho originou-se através da parceria Vallée S.A. com a Universidade Federal de Viçosa – UFV, sendo que a formulação das vacinas, curva de crescimento e virusneutralização foram realizados no Laboratório Experimental de Bioquímica (LEB) – Vallée S.A. e as vacinações e coletas de sangue foram realizados no Laboratório de Virologia do Departamento de Veterinária Preventiva – UFV e no Sítio Boa Vista, Córrego do Latão - zona rural de Coimbra.

### **4.1. Cultivo de Células**

No presente estudo foram utilizadas células MDBK (Madin Darby Bovine Kidney) provenientes do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) e, originalmente depositadas na American Type Culture Collection (ATCC). As células foram cultivadas em Meio Essencial Mínimo – MEM (GIBCO®) estéril, acrescido de piruvato de sódio, bicarbonato de sódio, penicilina G potássica, sulfato de neomicina, anfotericina B e soro fetal bovino. A densidade celular inicial foi de  $2,0 \times 10^5$  células/mL.

Garrafas do tipo Roux foram utilizadas para multiplicação celular com aumento de escala de acordo com crescimento. As células partiram da garrafa Roux T162 para garrafa Roller de onde foram distribuídas em 6 garrafas T162, sendo 5 usadas para infecção e 1 usada como controle. Os cultivos foram mantidos incubados em estufa BOD a 37°C em sistema fechado. Os repiques celulares foram realizados a cada 72 horas utilizando-se tripsina a 37°C para descolamento da monocamada.



#### **4.1.1. Contagem Celular**

Após o processo de tripsinização as células foram ressuspensas em meio de cultura fresco e, 0,5mL de suspensão celular foram coletados para procedimento de contagem em câmara de Neubauer.

Foram adicionados à suspensão celular 0,5mL de corante vital azul de tripan para determinação da viabilidade celular por exclusão do corante, diluindo-se a amostra quando necessário com tampão fosfato salino (PBS).

#### **4.1.2. Cálculo da Densidade Celular**

Para a determinação da densidade celular em função do volume utilizou-se a fórmula 1 e para o número de células totais a fórmula 2. A viabilidade celular foi calculada pela fórmula 3.

- 1)  $\text{Células/mL} = \text{n}^\circ \text{ células contadas} / \text{n}^\circ \text{ quadrantes} \times \text{fator diluição} \times 10^4$
- 2)  $\text{Células totais} = \text{células/mL} \times \text{volume suspensão}$
- 3)  $\text{Viabilidade} = \text{n}^\circ \text{ células viáveis} \times 100 / \text{n}^\circ \text{ total de células contadas}$

#### **4.2. Produção de Vírus**

Foram utilizados 6 isolados de BoHV-5 incluindo: SV163, SV507, 1807, EVI145, ISO9898292 e A509, sendo este último utilizado na virusneutralização. A origem dos isolados segue conforme tabela 1. A propagação dos vírus foi realizada em três passagens em células MDBK, utilizando-se meio livre de soro e “*multiplicity of infection*” (MOI) de 0,5. Após atingir efeito citopático (ECP) de 90%, os vírus foram recolhidos e clarificados por meio de centrifugação a 3000 RPM por 15 minutos a 4°C e armazenados em ultrafreezer a -70°C até o momento do uso.

Tabela 1 – Origem dos isolados de BoHV-5

Isolados de BoHV-5	Origem
SV507	Laboratório da UFSM, Departamento de Microbiologia e Parasitologia – Setor de Virologia - isolado proveniente de surto no RS.
SV163	Laboratório da UFSM, Departamento de Microbiologia e Parasitologia – Setor de Virologia - isolado proveniente de surto no RS ou MS.
EVI145	Laboratório Desidério Finamor, Eldorado do Sul, RS.
1807	Laboratório da UFSM, Departamento de Microbiologia e Parasitologia – Setor de Virologia.
IB ISO9898292	Laboratório de Vírus de Bovídeos, Instituto Biológico.
A509	Laboratório da UFSM, Departamento de Microbiologia e Parasitologia – Setor de Virologia.

#### 4.2.1. Determinação do Título Infeccioso

Células MDBK foram distribuídas em microplacas de 96 cavidades (CORNING COSTAR®) na densidade de 200.000 células/mL, sendo que, cada cavidade recebeu 100µL de suspensão celular 24 horas antes da titulação propriamente dita.

As amostras virais coletadas foram diluídas de forma seriada ( $10^{-1}$  a  $10^{-8}$ ). Em seguida procedeu-se com descarte do sobrenadante celular das microplacas e adição de 100µL da suspensão viral diluída em cada cavidade.

Cada diluição viral ocupou duas colunas da microplaca (16 cavidades) em ordem decrescente de concentração, sendo que, as duas últimas colunas constituíram o controle de células, não recebendo suspensão viral, a qual foi substituída por 100µL de MEM livre de soro fetal bovino (SFB).

As placas foram incubadas em estufa a 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C por 72h. Após este período foi efetuada a leitura das mesmas e determinado o título infeccioso de cada placa em “50% tissue culture infectious dose” (TCID<sub>50</sub>/mL), segundo o método de Reed e Muench (1938).

### **4.3. Curva de Crescimento Viral**

Células MDBK foram distribuídas em microplacas de 24 cavidades na densidade de 200.000 células/mL, sendo que, cada cavidade recebeu 3mL de suspensão celular 24 horas antes de serem infectadas. Em seguida procedeu-se com o descarte do sobrenadante celular das microplacas e adição de meio de infecção. As monocamadas celulares foram infectadas na m.o.i 0,5 utilizando cada isolado, em duplicata, contidos nas vacinas: SV163, SV507, 1807, EVI 145, ISO9898292 e o isolado A509 utilizado no teste de virusneutralização. Dessa forma, cada placa continha dois isolados utilizados em duplicatas organizados em linhas e cada coluna correspondeu a um tempo de coleta dos sobrenadantes. As placas foram incubadas em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C e as coletas foram realizadas de 4 em 4 horas durante 24 horas de cultivo. Durante as coletas cada cavidade foi monitorada de acordo com o ECP na monocamada celular. As suspensões virais foram recolhidas após centrifugação a 3000 RPM por 15min a 4°C e foram mantidas em ultrafreezer a -70°C até serem titulados.

### **4.4. Formulação da Vacina**

O cultivo celular para produção das vacinas, assim como a produção viral foram mencionados nos itens 4.1. e 4.2 respectivamente.

#### **4.4.1. Diluição das Suspensões Virais**

Após determinação do título infeccioso as suspensões virais foram diluídas no sentido de uniformizar o título vacinal de acordo com o menor título infeccioso viral obtido. A suspensão viral constituiu de 40% do volume final da vacina com um título vacinal mantido em  $10^{7,4}$  TCID<sub>50</sub>/dose.

#### **4.4.2. Inativação Viral**

As suspensões virais foram inativadas com 3mM de etilenoimina binária (BEI) por 24 horas em agitador orbital sob agitação de 75 RPM. O BEI foi preparado a partir da bromo-etilenoamina hidro-brometo (BEA) pela reação com hidróxido de sódio 0,2N a 37°C, sob agitação de 75 RPM em agitador orbital durante 60 minutos, sendo esta solução utilizada imediatamente após o preparo. Após o tempo de inativação o BEI foi neutralizado com tiosulfato de sódio 2% v/v de BEI.

#### **4.4.3. Pesquisa de Vírus Ativo**

Para pesquisa de vírus ativo (PVA) foram cultivadas células MDBK em meio de cultivo descrito no item 4.1.1 em garrafas roux T25, sendo utilizadas duas garrafas para cada amostra viral e uma como controle negativo. A densidade celular inicial foi de 200.000 células/mL.

A PVA foi realizada em três passagens consecutivas, sendo que em cada uma delas as células foram cultivadas por 48 horas antes do recebimento da amostra viral. O sobrenadante celular foi descartado e em seguida adicionados 9mL de meio de cultivo livre de soro e 1mL da suspensão viral teste. Nas duas passagens subsequentes 1mL da suspensão viral foi substituído por 1mL do sobrenadante celular da passagem anterior. O controle negativo recebeu 10mL de meio MEM sem soro. As garrafas foram incubadas por 120 horas na primeira passagem e 72 horas nas posteriores e acompanhadas diariamente para visualização microscópica de possível efeito citopático.

#### **4.4.4. Adição de Adjuvante**

Como adjuvante foi utilizado o hidróxido de alumínio  $\text{Al(OH)}_3$ , padronizado pela Vallée S.A., na quantidade de 20% do volume final da vacina que foi mantido a 4°C *overnight* sob agitação de 100RPM em agitador orbital. O pH foi mantido entre 7,2 e 7,6 e controlado com bicarbonato de sódio 7,5% e ácido clorídrico 1N. Além do hidróxido de alumínio também utilizou-se saponina (Kerry®) a 0,06%.

## **4.5. Vacinações e Coletas de Sangue**

### **4.5.1. Animais**

Para o presente estudo foram utilizadas 55 ovelhas adultas escolhidas de forma aleatória e de ambos os sexos da raça Santa Inês, provenientes do Sítio Boa Vista, Córrego do Latão - zona rural de Coimbra. Os animais foram divididos em 5 grupos, sendo 10 para cada vacina e os cinco restantes foram utilizados como sentinelas.

### **4.5.2. Vacinação e Coletas Sanguíneas**

O esquema de vacinação adotado consistiu de duas doses vacinais no dia 0 e 21, por via intramuscular. O volume da dose vacinal foi de 5mL com título vacinal mantido em  $10^{7,4}$  TCID<sub>50</sub>/dose..

Foram realizadas 7 coletas de sangue nos dias 0, 7, 14, 21, 35, 49, 63. Para as coletas foram utilizados tubos “vacutainers” e coletados aproximadamente 7ml de sangue por vez de cada animal. O sangue foi coletado da veia jugular dos animais e as coletas nos dias 0 e 21 foram realizadas antes da vacinação.

Após a coleta, as amostras de sangue foram mantidos em temperatura ambiente para coagulação. Após este período, o soro de cada amostra foi coletado em tubos tipo eppendorfs e centrifugados a 4000 RPM por 5 min a 25°C. Os soros obtidos foram armazenados em freezer a -4°C.

**4.**

## **4.6. Virusneutralização**

Os testes de virusneutralização (VN) foram realizados em microplacas de 96 cavidades (CORNING COSTAR®). A primeira coluna de cada microplaca constituiu o controle de células, não recebendo soro nem suspensão viral, a qual foi substituído por 100µL de MEM livre de SFB. Já a segunda coluna constituiu o controle de toxicidade do soro. Esta coluna recebeu a suspensão celular e soro não diluído. A diluição do soro

se deu entre as colunas de duas placas consecutivas e foram utilizadas diluições na base 2 crescentes do soro, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024, 1:2048, 1:4096. Dessa forma, cada diluição do soro ocupou uma coluna da microplaca (8 cavidades) em ordem decrescente de concentração. Posteriormente às diluições, cada cavidade recebeu uma dose constante de vírus, contendo 100 TCID<sub>50</sub>/50µL do isolado BoHV-5 A509, com exceção das colunas 1 e 2. Após incubação da mistura soro-vírus por 12h a 37°C, em estufa de CO<sub>2</sub> uma suspensão de células MDBK de 50µL na concentração de 300.000 células/mL foi adicionada, seguida de incubação em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C. A leitura dos testes foi realizada após 96h de incubação, por meio do monitoramento do efeito citopático. Foram considerados os títulos de anticorpos neutralizantes as maiores diluições do soro capazes de inibir a replicação viral e conseqüente produção de efeito citopático. Cada soro foi testado em duplicata e a medida de anticorpos neutralizantes foi calculada pela média aritmética das repetições.

Posteriormente aos testes de VN utilizando o isolado A509, foram realizados novos testes de VN para as amostras dos isolados BoHV-5 1807, SV507 e ISO9898292 utilizando o próprio isolado ISO9898292. Para estes testes foram respeitados os mesmos procedimentos das VN realizados anteriormente, alterando apenas o isolado.

#### **4.7. Análises Estatísticas**

A resposta de anticorpos com atividade neutralizante anti-BoHV-5 de cada grupo de animais foi expressa em títulos médios geométricos (GMT), sendo que estes foram analisados por meio da análise de variância. As médias foram comparadas utilizando o teste Tukey adotando o nível de 5% de probabilidade.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Cinética de Infecção

Os resultados referentes às cinéticas de infecção dos diferentes isolados de BoHV-5 estão apresentados na figura 1. Observando a figura 1, nota-se que apesar de serem da mesma espécie viral BoHV-5, os isolados seguem comportamentos diferenciados de crescimento em cultivo celular.

Para o isolado BoHV-5 A509 houve variação significativa do título inicial em 4 horas de infecção em que o título variou em aproximadamente 1 log TCID<sub>50</sub>/mL e em 12 horas com variação de 1,58 log TCID<sub>50</sub>/mL do título inicial, representados por picos na curva de crescimento. Como este, para os isolados SV507, EVI145, 1807 e SV163 também foram detectadas variações do título infeccioso inicial acima de 1 log TCID<sub>50</sub>/mL em 4 horas de infecção. Porém para o isolado SV507 não foi detectado outro aumento significativo de título durante o ensaio, mantendo o título infeccioso próximo de 7 log TCID<sub>50</sub>/mL. Para os isolados EVI145 e 1807 também houve variação significativa do título inicial às 12 horas de infecção com variação de 2,31 e 1,88 log TCID<sub>50</sub>/mL respectivamente. Para o isolado SV163 houve também aumento detectável do título infeccioso inicial às 24 horas com variação de 2,77 log TCID<sub>50</sub>/mL. Já para o isolado ISO9898292 o aumento do título infeccioso detectável a partir do inicial foi de 0,88 log TCID<sub>50</sub>/mL em 8 horas de infecção e às 24 horas com variação de 2,27 log TCID<sub>50</sub>/mL.

O aumento diferenciado do título infeccioso entre os isolados de acordo com o tempo das coletas utilizadas, sugere que cada isolado possui tempo diferenciado para concluir seu ciclo de replicação.

A determinação do título infeccioso de cada ponto da curva de crescimento foi efetuada a partir do sobrenadante das amostras, não sendo realizada lise celular. Isso abrangiu apenas as partículas virais que se encontravam extracelularmente. Desta forma a queda de título infeccioso em determinados pontos das curvas de crescimento sugere pontos em que os vírus produzidos tornam invadir novas células.



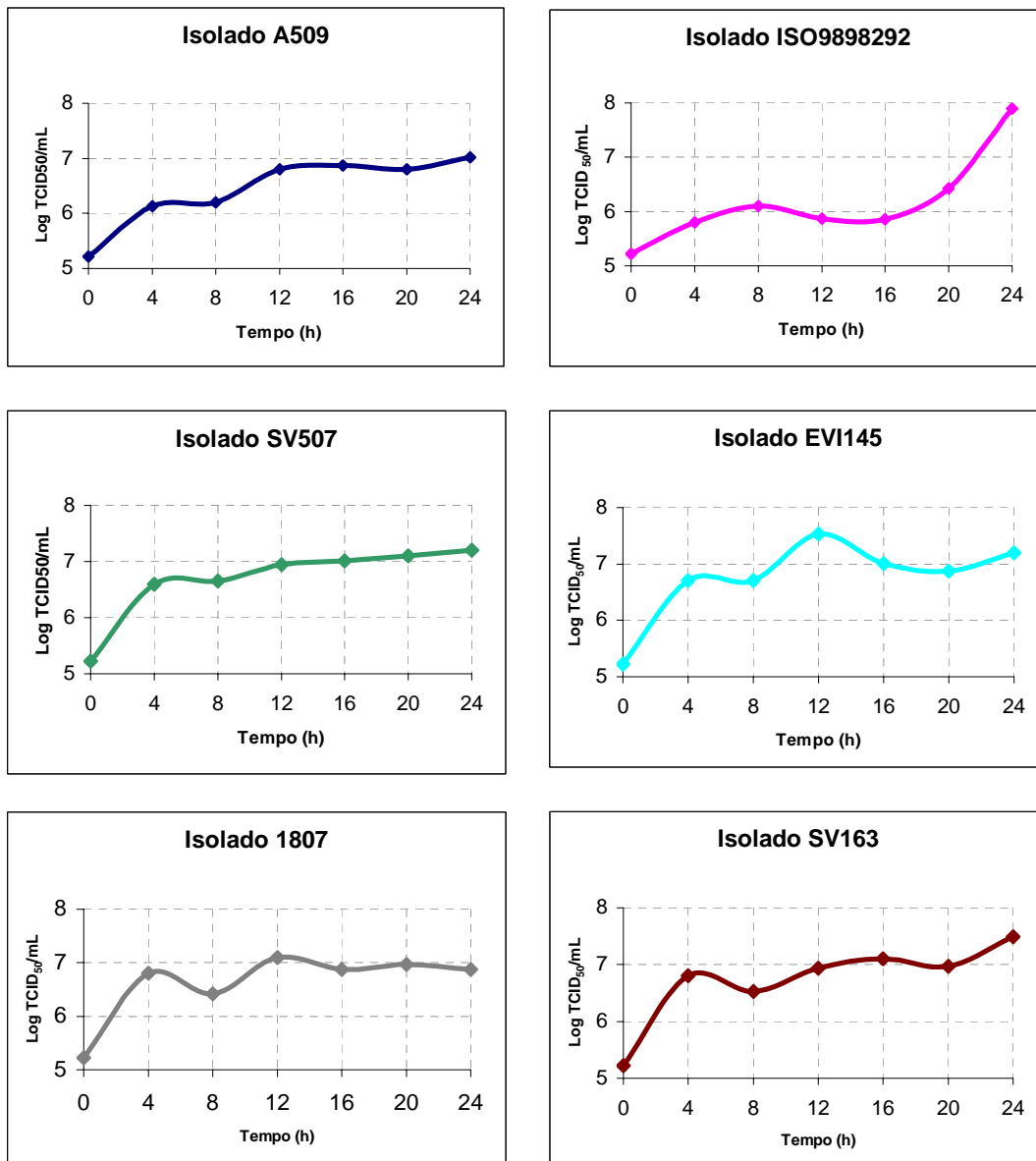


Figura 1 – Cinética de produção de partículas com capacidade infectante de diferentes isolados de BoHV-5 em cultura de células MDBK.

Durante a cinética de crescimento, o monitoramento por efeito citopático (ECP) mostrou que todos os isolados, com exceção do ISO9898292, destruiu completamente a monocamada celular. De acordo com o comportamento dos isolados, foi observado o início de ECP por volta das 10 horas de infecção, sendo que o isolado BoHV-5 ISO9898292 iniciou o ECP em torno de 16 horas. A destruição completa da monocamada foi observada em torno de 16 horas, com exceção do isolado BoHV-5 ISO9898292 que aos 24 horas de cultivo possuía ECP de aproximadamente 80%. Além disso, segundo a tabela 2 nota-se que o título infeccioso máximo para cada isolado é alcançado em diferentes tempos de infecção e normalmente está associado ao maior grau de destruição celular que pode ser usado como referencial de coleta dos BoHVs. Isso sugere que cada isolado possui seu tempo de coleta específico, uma vez que, busca-se alcançar títulos infecciosos elevados nos processos de produção de vacinas virais.

Um dos problemas enfrentados na produção viral *in vitro* é a produção de partículas defectivas que são regularmente observadas em sucessivas passagens do vírus em MOIs elevadas (KIRKWOOD e BANGHAM, 1994). A produção dessas partículas compete com o vírus selvagem levando a produção cada vez menor destes (FRANK, 2000). Isso pode explicar o comportamento dos isolados A509, SV507, EVI145, 1807 e SV163 que produziu completa destruição da monocamada celular em um curto espaço de tempo, além de títulos relativamente elevados nas primeiras 12 horas de infecção. O que pode ter influenciado no título final destes isolados que se mostraram menores que o isolado ISO9898292.

Por outro lado o isolado ISO9898292 manteve os títulos infecciosos baixos durante 20 horas de infecção e ECP mais lento, proporcionando um maior período de infecção. Com isso o vírus permaneceu maior tempo dentro das células, gerando maior número de partículas virais integras por célula. Isso sugere que, este isolado está mais adaptado às células utilizadas na cinética de crescimento. Segundo (AHAMED *et al.*, 2004) os vírus adaptados às células hospedeiras possuem maior infectividade e menor virulência, causando menor dano à monocamada celular. De fato, apenas o isolado ISO9898292 possuía passagens consecutivas nas células utilizadas neste ensaio. Estudos realizados por Ahamed e colaboradores (2004) mostraram que só após a quarta passagem o Vírus da doença Newcastle começou a se adaptar em células Vero demonstrando ECP mais padronizado.

Tabela 2 – Título infeccioso máximo alcançado pelos diferentes isolados de BoHV-5 em função do tempo de infecção

Isolados	Título infeccioso máximo (Log TCID <sub>50</sub> /mL)	Tempo de infecção (h)
A509	7,02	24
ISO9898292	7,89	24
SV507	7,20	24
EVI145	7,53	12
1807	7,10	12
SV163	7,49	24

## 5.2. Produção de Vírus Vacinal

Após conhecer o comportamento de cada isolado, os vírus foram tratados individualmente. Posteriormente ao processo de infecção os isolados foram monitorados de acordo com o ECP causado na monocamada celular. As coletas foram realizadas à medida que cada isolado alcançou ECP de aproximadamente 90% (figura 2B). A tabela 3 mostra os resultados de títulos infecciosos em diferentes passagens dos isolados de BoHV-5 utilizados para formulação das Vacinas. Apesar da primeira passagem dos vírus possuírem títulos infecciosos altos, esta não foi tomada como referencia, pois não foi respeitada a dose infectante  $MOI = 0,5$ . Esta passagem como a posterior foi realizada apenas com a finalidade de adaptação dos isolados em células MDBK utilizadas no laboratório Experimental de Bioquímica (LEB) – Vallée S.A.. Os isolados só foram utilizados para produção das vacinas após a terceira passagem em monocamada celular conforme tabela - 3. Como já era esperado, cada isolado alcançou diferentes títulos infecciosos. A diluição das suspensões virais para o menor título infeccioso manteve o mesmo número de partículas virais nas vacinas produzidas.

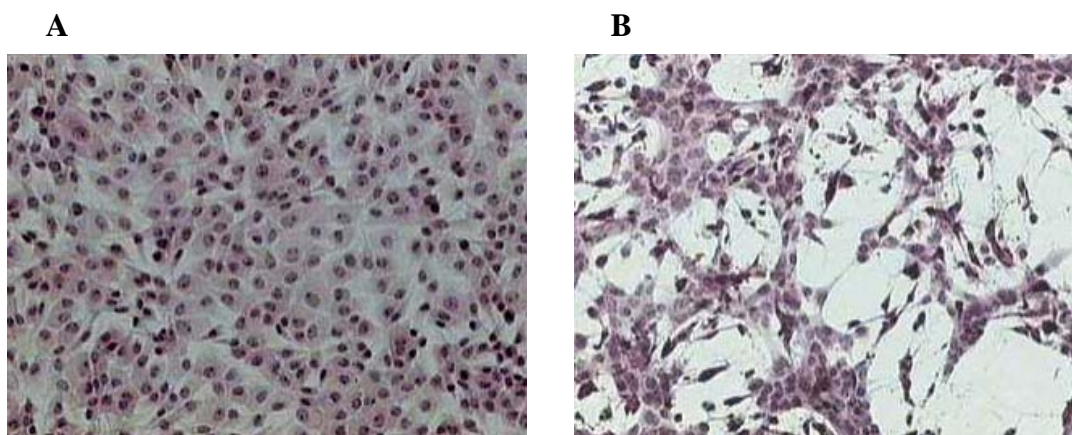


Figura 2 – (A) Monocamada de células MDBK com 72h de cultivo. (B) Efeito citopático de 90% do isolado BoHV-5 IB ISO9898292 em células MDBK em 28h de incubação. Nas duas figuras as monocamadas foram coradas com H&E e observadas com aumento de 100X.

Tabela 3 – Títulos infecciosos em Log TCID<sub>50</sub>/mL dos isolados de BoHV-5 propagados em células MDBK na etapa de produção das vacinas

Isolados de BoHV-5	1 <sup>a</sup> passagem	2 <sup>a</sup> passagem	3 <sup>a</sup> passagem
IB ISO9898292	7,25	6,19	7,10
SV163	7,71	6,71	7,25
EVI145	7,55	6,76	7,51
SV507	7,67	6,89	7,76
1807	7,73	6,88	7,75

### 5.3. Sorologia da resposta vacinal

Os resultados obtidos nos testes de virusneutralização (VN) para pesquisa de anticorpos anti-BoHV-5 encontram-se na tabela 4 e figura 3A. Devido a sua alta especificidade e sensibilidade, a técnica de VN tem sido utilizada como referência no sorodiagnóstico do BoHV-1 (CORTEZ *et al.*, 2001; OIE, 2002). Assim como para o BoHV-1, o teste mostrou ser eficaz em identificar os anticorpos específicos contra os isolados de BoHV-5. Isso pode ser comprovado pelo perfil da curva dos isolados, com exceção do ISO9898292, que demonstrou dois picos referentes aos títulos de anticorpos alcançados pelos grupos de animais após vacinação e revacinação respectivamente (ABBAS *et al.*, 2005).

De acordo com o perfil da curva demonstrado pelo isolado ISO9898292 não houve resposta antigênica significativa nos diferentes pontos de coleta do soro. Segundo a figura 3A, o primeiro pico foi demonstrado 14 dias após a vacinação, onde os títulos de anticorpos variaram entre 23,08 pelo isolado SV507 a 138,63 pelo isolado SV163. O segundo pico foi observado 14 dias após a revacinação onde os títulos variaram entre 301,35 pelo isolado EVI145 a 1017,54 pelo isolado 1807. No 42º dia após a revacinação observou-se variação de título entre 82,47 (EVI145) a 305,97 (1807). A discrepância entre as médias de título de anticorpos de alguns grupos de animais sugere diferenças antigênicas, demonstrando uma possível variação entre os isolados.

Para comparação das médias foi adotado o Teste Tukey ao nível de significância de 5% de probabilidade e foi tomado como referência os picos da curva de anticorpos e o último dia de coleta a título de análise dos resultados. De acordo com a análise estatística realizada os isolados de BoHV-5 1807, EVI145, SV163, SV507 não diferiram estatisticamente entre si no 14º dia após a primeira vacinação que refere-se ao primeiro pico da curva (tabela 4). Já no 35º dia após a primeira vacinação, segundo pico, houve divergência estatisticamente significativa de títulos de anticorpos entre os animais vacinados com os isolados de 1807, EVI145 e ISO9898292. No 63º dia, referente ao último ponto de coleta, os isolados de BoHV-5 1807, EVI145, SV163, SV507 não diferiram estatisticamente entre si. Sendo que em todos os casos em questão o isolado BoHV-5 ISO9898292 diferiu dos demais. (BELTRÃO *et al.*, 2000) relataram que os maiores índices de proteção observados entre coelhos imunizados contra BoHV-

1 podem ser atribuídos à possíveis diferenças antigênicas entre os isolados que compõem a vacina.

Apesar de não ser objetivo desse estudo, Oldoni *et al.* (2004) relataram que a gC é a mais abundante glicoproteína de envelope além de ser altamente imunogênica, porém está entre as mais variáveis proteínas do BoHV-5. Isso poderia explicar as divergências dos títulos de anticorpos encontrados durante as coletas. Assim como a gC, a gB e gD também são imunodominantes. Em conjunto, estas glicoproteínas conferem predominância de anticorpos com atividade virusneutralizante, porém diferentemente da gC, apresentam baixa diversidade antigênica (OLDONI *et al.* 2004). Outra possível explicação para as diferenças antigênicas encontradas seria a síntese diferenciada dessas glicoproteínas entre os isolados.

De acordo com a VN, onde foi utilizado o isolado ISO989292 na constituição do teste (figura 3B), não houve leitura detectável do título de anticorpos para os isolados 1807 e SV507. O não reconhecimento dos anticorpos produzidos contra os isolados BoHV-5 1807 e SV507 ao isolado ISO9898292 demonstram diferenças antigênicas que podem ser causadas por possíveis variações em glicoproteínas imunodominantes de superfície. Apesar de haver título de anticorpos detectáveis para o próprio isolado ISO9898292, ficou comprovado que este isolado possui baixa capacidade antigênica. Além de que, a curva de titulação de anticorpos não seguiu o mesmo comportamento padrão das demais, demonstrando apenas um pico (figura 3B), o que não é característico em respostas imunes entre animais vacinados (ABBAS, 2005). A baixa síntese de glicoproteínas antigênicas também poderia explicar o comportamento antigênico desse isolado.

Outra questão que deve ser levada em consideração é o número de passagens em células *in vitro* que o isolado ISO9898292 foi submetido, o que poderia provocar possíveis alterações genotípicas que ocasionam mudanças estruturais expressivas nas glicoproteínas responsáveis pelas respostas antigênicas dos animais vacinados.

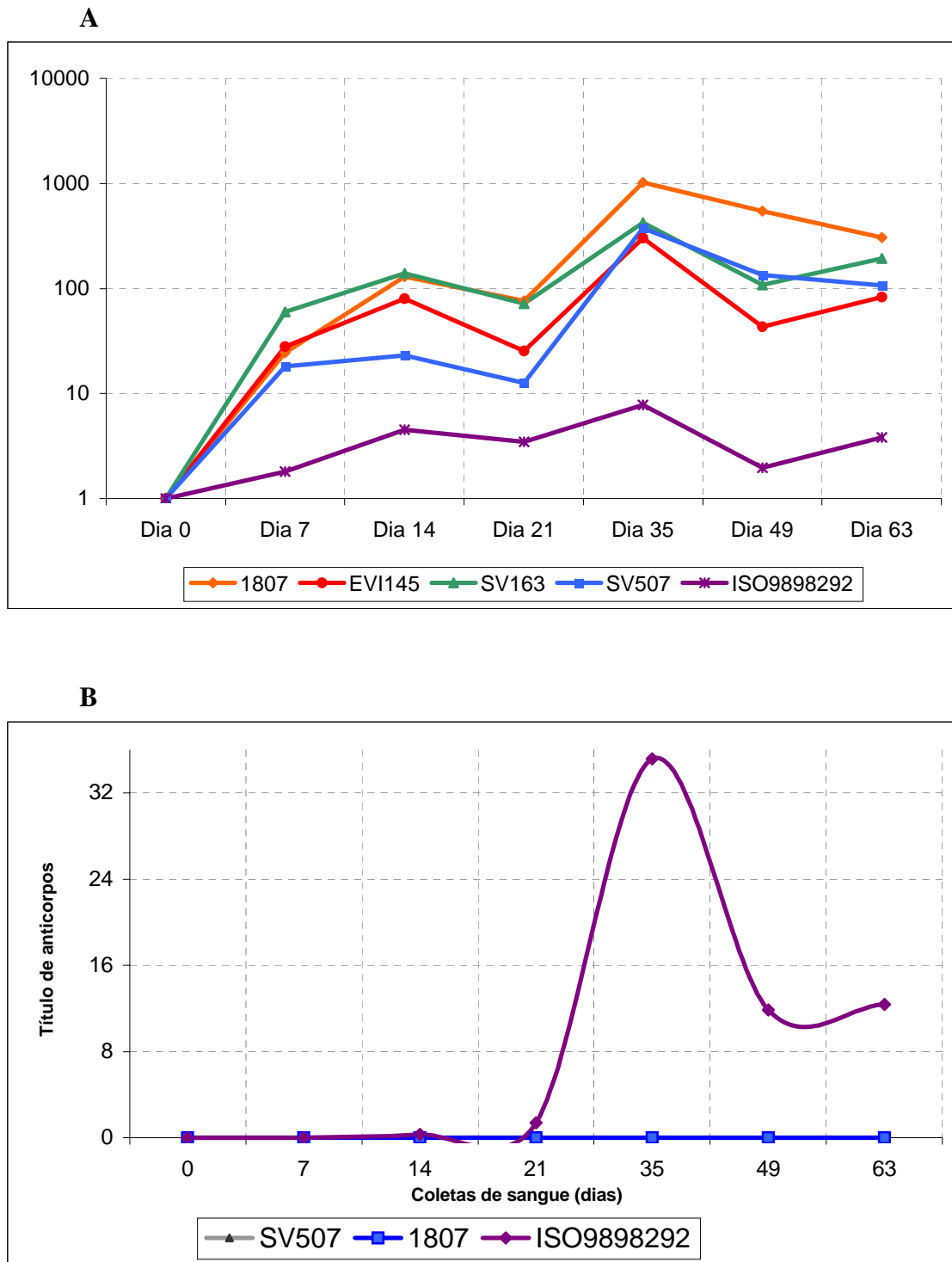


Figura 3 – Título de anticorpos de grupos de animais medidos pela técnica de virusneutralização em diferentes tempos de coleta do soro. As coletas foram realizadas nos dias 0, 7, 14, 21, 35, 49, 63. (A) Resposta sorológica entre grupos de animais vacinados com diferentes isolados de BoHV-5. Para o teste de VN foi utilizado o isolado BoHV-5 A509. (B) Resposta sorológica entre grupos de animais vacinados com os isolados 1807, SV507 e ISO9898292. No teste VN foi utilizado o isolado BoHV-5 ISO9898292.

Tabela 4 – Título Médio Geométrico (GMT) de anticorpos anti-BoHV-5 pela técnica de virusneutralização, de grupos de animais vacinados por diferentes isolados. As médias seguidas por uma mesma letra na mesma coluna não diferem entre si, pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Isolados	Dia 0		Dia 7		Dia 14		Dia 21		Dia 35		Dia 49		Dia 63	
1807	1,00	a	24,49	ab	129,66	a	76,02	a	1017,54	a	548,43	a	305,97	a
EVI145	1,00	a	28,15	a	79,77	a	25,30	ab	301,35	b	43,08	bc	82,47	a
SV163	1,00	a	60,03	ab	138,63	a	71,82	ab	424,47	ab	108,07	ab	193,61	a
SV507	1,00	a	18,22	ab	23,08	ab	12,56	ab	375,25	ab	134,96	ab	106,31	a
ISO9898292	1,00	a	1,80	b	4,50	b	3,46	b	7,77	c	1,97	c	3,84	b



## 6. CONCLUSÕES

- Os isolados A509, SV507, EVI145, 1807 e SV163 apresentaram comportamento distinto do isolado ISO9898292 durante a cinética de crescimento em células MDBK.
- O isolado ISO9898292 demonstrou baixa capacidade antigênica.
- Os isolados 1807, EVI145, SV163, SV507 são potenciais candidatos na utilização de vacinas contra a meningoencefalite bovina.
- As vacinas experimentais produzidas mostraram-se eficientes na indução de anticorpos nos grupos de animais vacinados.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Imunologia Celular e Molecular**. Livraria e Editora Revinter Ltda, 2005, 439p.
- ABRIL, C.; ENGELS, M.; LIMAN, A. *et al.* Both viral and host factors contribute to Neurovirulence of bovine herpesviruses 1 and 5 in interferon receptor-deficient mice. **Journal of Virology**, v.78, p.3644-3653, 2004.
- AHAMED, T.; HOSSAIN, K. M.; BILLAH, M. M. *et al.* Adaptation of Newcastle Disease Virus (NDV) on Vero Cell Line. **International Journal of Poultry Science**, v.3, p.153-156, 2004.
- ANDREWES, S. C.; PEREIRA, H. G.; WILDY, P. **Viruses of vertebrates**. Fourth edition, London, Ballière Tindal. 1978a. Cap. 15, p. 312-330.
- BABIUK, L.A.; VAN DRUNEN LITTEL-VAN DER HURK, S.; TIKOO, S.K. Immunology of bovine herpesvirus 1 infection. **Veterinary Microbiology**. v.53, p.31-42, 1996.
- BARENFUS, M.; DELLI QUADRI. C. A.; McINTIRE, R, W. *et al.* Isolation of infectious bovine rhinotracheitis virus from calves with meningoencephalitis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 143, p. 725-728, 1963.
- BELKNAP, E. B.; COLLINS, J. K.; AYERS, V. K.; SCHULTHEISS, P. C. Experimental infection of neonatal calves with neurovirulent bovine herpesvirus type 1.3. **Veterinary Pathology**, v. 31, p. 358-365, 1994.
- BELTRÃO, N.; FLORES, E.F.; WEIBLEN, R. *et al.* Infecção e enfermidade neurológica pelo herpesvírus bovino tipo 5 (BHV-5): coelhos como modelo experimental. **Pesq. Vet. Bras.**, v.20, n.4, p.144-150, 2000.

BLACK, J.W. Use of the microtiter serum neutralization test for the diagnosis of IBR, BVD, and other bovine and porcine viral diseases. In: ANNUAL MEETING US LIVESTOCK SANITARY ASSOCIATION, 74<sup>th</sup>, 1970. **Proceedings...** Livestock Sanitary association, 1970. p.515-521.

CARON, L.; FORES, E.F.; WEIBLEN, R. *et al.* Latent infection by bovine herpesvirus type-5 in experimentally infected rabbits: virus reactivation, shedding and recrudescence of neurological disease. **Veterinary Microbiology**, v.84, p.285-295, 2002.

CASCIO, K.E.; BELKNAP, E.B.; SCHULTHESIS, P.C. *et al.* Encephalitis induced by bovine herpesvirus 5 and protection prior vaccination on infection with bovine herpesvirus 1. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 11, p. 134-139. 1999.

CHOWDHURY, S.I.; LEE, B.J.; OZKUL, A. *et al.* Bovine Herpesvirus 5 Glycoprotein E is Important for Neuroinvasiveness and Neurovirulence in the Olfactory Pathway of the Rabbit. **Journal of Virology**, v.74, p.2094-2106, 2000.

CORTEZ, A.; HEINEMANN, M.B.; ALFIERI, A.A. *et al.* Comparação das técnicas de ELISA indireto e de soroneutralização na detecção de anticorpos contra o BHV-1 em amostras de soro bubalino (*Bubalus bubalis*).

DELHON; MORAES, M.P.; LU, Z. *et al.* Genome of bovine herpesvirus 5. **Journal of Virology**, v.77, n.19, p.10339-10347, 2003.

DIAS, L.E.; MAISONNAVE, J.; GUARINO, H. *et al.* Rinotraqueíte Infeciosa Bovina (IBR), descrição de um quadro clínico em terneros de tambo. Anais III Congr. Nac. Veterinaria, Montevideo, p. 521-527.

DONKERSGOED, J. V.; BABIUK, L. A. Diagnosis and managing the respiratory form of infectious bovine rhinotracheitis. **Veterinary Medicine**, v. 86, n. 1, p.86-94, 1991.

DUQUE, H.; MARSHALL, R.L.; ISRAEL, B.A. *et al.* Effects of formalin inactivation on bovine herpes virus-1 glycoproteins and antibody response elicited by formalin-inactivated vaccines in rabbits. **Vaccine**, v.7, p.513-520, 1989.

ELIAS, F.; SCHILD, A. L.; RIET-CORREA, F. Meningoencefalite e encefalomalacia por Herpesvírus bovino-5: distribuição das lesões no sistema nervoso central de bovinos naturalmente infectados. **Pesq. Vet. Bras.**, v.24, n.3, p.123-131, 2004.

FENNER, F.J.; GIBBS, E.P.; MURPHY, F.A. *et al.* **Veterinary Virology**, 2<sup>a</sup> ed. San Diego: Academic Press, 1993. 666p.

FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. **Fundamental Virology**, 3<sup>a</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins. 1996.

FLORES, E. F.; SILVA, A. M.; WEIBLEN, R. Neuropatogenicidade do herpesvírus bovino tipo 5 (HVB-5). In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE HERPESVÍRUS BOVINO (TIPO 1 E 5) E VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA (BVDV), 1998, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria, RS, 1998. p. 127-136.

FRANK, S. A., Within-host Spatial Dynamics of Viruses and Defective Interfering Particles. **J. Theor. Biol.**, v.206, p.279-290, 2000.

GEORGE, L. W. Understanding the encephalitis form of the infectious bovine rhinotracheitis. **Food Animal Practice**, p. 335-337, 1991.

GIBBS, E. P.; RWEYEMAMU, M. M. Bovine herpesviruses. Part 1. Bovine herpesvirus 1. **Veterinary Bulletin**, v. 47, n. 5, p. 317-343, 1977.

GOMES, L.I.; ROCHA, M.A.; COSTA, E.A. *et al.* Detection of bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) in cattle in Southeast Brazil. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.54, n.2, p.217-220, 2002.

HALL, W.T.K.; SIMMONS, G.C.; FRENCH, E.L. *et al.* The pathogenesis of encephalitis caused by the infectious bovine rhinotracheitis virus. **Australian Veterinary Journal**, n.42, p.229-237, 1966.

HILL, B. D.; HILL, M. W. M.; CHUNG, Y. S. *et al.* Meningoencephalitis in calves due to bovine herpesvirus type 1 infection. **Australian Veterinary Journal**, n. 61, p. 242-243, 1984.

KASERMANN, F.; WYSS, K; KEMPF, C. Virus inactivation and protein modifications by ethyleneimines. **Antiviral Research**, v.52, p.33-41, 2001.

KIRKWOOD, T. B. L.; BANGHAM, R. M., Cycles, chaos, and evolution in virus cultures: A model of defective interfering particles. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.91, p.8685-8689, 1994.

LEMAIRE, M.; WEYNANTS, V.; GODFROID, J. *et al.* Effects of Bovine Herpesvirus Type 1 Infection in Calves with Maternal Antibodies on Immune Response and Virus Latency. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, n.5, p.1885-1894, maio 2000.

MEYER, A.L.; HANON, E.; GEORLETTE, D.; PASTORET, P.P.; THIRY, E. Bovine herpesvirus type 1 glycoprotein H is essential for penetration and propagation in cell culture. **Journal of General Virology**, v.79, p.1983-1987, 1998.

**Manual of standards for diagnostic tests and vaccines: for lists A and B diseases of mammals, birds and bees.** 2.ed. Paris: OIE, 1992. 783p.

OLDONI, I.; WEIBLEN, INKELMANN, M. A. *et al.* Production and characterization of monoclonal antibodies to a Brazilian bovine herpesvirus type 5. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.37, p.213-221, 2004.

PASTORET, P. P.; THIRY, E.; BROCHIER, B.; DERBOVEN, G. Bovid herpesvirus 1 infection of cattle: pathogenesis, latency, consequences of latency. **Ann. Rech.Vét.**, v. 13, n. 3, p. 221-235, 1982.

PASTORET, P.P. **Veterinary Vaccinology**. 1.ed. Amsterdam: Elsevier Science B. V., 1997.

PEDRAZA, F.J.; ALESSI, A.C. Encefalitis bovina por herpesvirus bovino tipo 5 (HVB-5). Uma revisão. **Rev Col Cienc Pec**, v.17, n.2, p.148-155, 2004.

PEREZ, S.E.; BRETSCHEIDER, G.; LEUNDA, M. R. *et al.* Primary Infection, Latency, and Reactivation of Bovine Herpesvirus Type 5 in the Bovine Nervous System. **Vet. Pathol.**, v.39, p.437-444, 2002.

PIDONE, C.L.; GALOSI, C.M.; ETCHEVERRIGARAY, M.E. Herpesvirus Bovino 1 y 5. **Analecta Veterinária**, v.19, n. 1/2 p. 40-50, 1999.

QUINCOZES, C.G. **Prevalência e Fatores de Risco Associados às Infecções pelos Herpesvírus Bovino Tipo 1 e 5 (BHV-1 e 5) e pelo Vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV) nos Rebanhos dos Municípios de Santa Vitória do Palmar e Chuí**. Pelotas, 2005. 117f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Veterinária, UFPel, 2005.

RIET-CORREA, F.; MOOJEN, V.; ROEHE, P.M. Viroses confundíveis com febre aftosa. **Ciência Rural**, v.26, p.323-332, 1996.

REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating 50% endpoints. **Am J Hyg**, v. 27, p. 493- 497, 1938.

ROEHE, P.M.; ALMEIDA, R.S.; TEIXEIRA, M.F.B. *et al.* Atualização no diagnóstico e controle de infecções por herpesvírus bovinos tipos 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5). **Biológico**, São Paulo, v. 59, n.2, p. 27-32, 1997b.

ROEHE, P.M.; SILVA, T.C.; NARDI, N.B. *et al.* Diferenciação entre os vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (BHV-1) e herpesvírus da encefalite bovina (BHV-5) com anticorpos monoclonais. **Pesq. Vet. Bras.**, v.17, n.1, p.41-44, 1997.

ROIZMAN, B. **Herpesviridae**. Fields Virology. Chapter 71, p. 2221-2230. 1996.

SALVADOR, S. C. **Meningoencefalite em bovinos causada por herpesvírus bovino-5 no Mato Grosso do Sul e São Paulo**. Pelotas, 1997. 64f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Veterinária, UFPel, 1997.

SALVADOR, S.C.; LEMOS, R.A.A.; RIET-CORREA, F. *et al.* Meningoencefalite em bovinos causada por herpesvírus bovino-5 no Mato Grosso do Sul e São Paulo. **Pesq. Vet. Bras.**, v.18, p.75-82, 1998.

SILVA, A. M.; FLORES, E. F.; WEIBLEN, R. *et al.* Pathogenesis of meningoencephalitis in rabbits by bovine herpesvirus type-5 (BHV-5). **Revista de Microbiologia**, v.30, p.22-31, 1999.

VAN OIRSCHOT, J.T.; KAASHOEK, M.J.; RIJSEWIJK, F.A.M. Advances in the development and evaluation of bovine herpesvirus 1 vaccines. **Veterinary Microbiology**, v. 53, n. 1- 2, p. 43-54, 1996.

VOGEL, F.S.F.; FLORES, E.F.; WEIBLEN, R. *et al.* Atividade Neutralizante anti-herpesvírus bovino tipos 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5) no soro de bovinos imunizados com vacinas contra o BHV-1. **Ciência Rural**, v.32, n.5, p.881-883, 2002.

WEIBLEN, R.; MORAES, M.P.; REBELATTO M. C. *et al.* Bovine herpesvirus isolates. **Revista de Microbiologia**, v.27, n.3, p.208-211, 1996.

WEIBLEN, R.; KREUTZ, L. C.; CANABARRO, T. F. *et al.* Isolation of bovine herpesvirus 1 from preputial swabs and semen of bull with balanoposthitis. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.4, p. 341-343, 1992.

WILD, P.; SCHRANER, E.M.; PETER, J.; LOEPFE, E.; ENGELS, M. Novel entry pathway of bovine herpesvirus 1 and 5. **Journal of Virology**. v.72, p.9561-9566, 1998.