

## Proteção fetal frente a desafio com o vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV) em ovelhas imunizadas com duas amostras de vírus modificadas experimentalmente<sup>1</sup>

Mário C.S. Brum<sup>2</sup>, Rudi Weiblen<sup>3</sup>, Eduardo F. Flores<sup>4</sup>, Edviges M. Pituco<sup>5</sup>, Fernando L. Tobias<sup>6</sup> e Evandro R. Winkelmann<sup>7</sup>

**ABSTRACT-** Brum M.C.S., Weiblen R., Flores E.F., Tobias F.L., Pituco E.M. & Winkelmann E.R. 2002. [Fetal protection against challenge with bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in pregnant ewes immunized with two strains experimentally attenuated.] Proteção fetal frente a desafio com o vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV) em ovelhas prenhes imunizadas com duas amostras de vírus atenuadas experimentalmente. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 22(2):64-72. Depto Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria (DMVP/CCR/UFSM), Santa Maria, RS 97105-900, Brazil. E-mail: flores@ccr.ufsm.br

Two isolates of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) submitted to multiple passages in tissue culture associated with ultraviolet irradiation were evaluated as vaccine virus 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.

<sup>1</sup>Aceito para publicação em 12 de abril de 2002.

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

<sup>2</sup>Médico Veterinário, aluno do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, UFSM.

<sup>3</sup>Departamento de Medicina Veterinária, Centro de Ciências Rurais (CCR), e do Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Centro de Ciências da Saúde, UFSM, Bolsista do CNPq (520161/97-1).

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

<sup>5</sup>Instituto Biológico de São Paulo, SP.

<sup>6</sup>Centro Universitário de Vila Velha, ES.

<sup>7</sup>Acadêmico de Medicina Veterinária, UFSM. Bolsista de Iniciação Científica, CNPq.

**RESUMO.**- Duas amostras do vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV) submetidas a múltiplas passagens em cultivo celular e exposição à radiação ultravioleta (UV) a cada passagem foram avaliadas como candidatos a vírus vacinais. As amostras foram testadas quanto à sua atenuação para bezerros e fetos ovinos, reatividade antigênica contra isolados de campo, 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 por 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 várias 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 forte resposta imunológica e proteção fetal contra o BVDV com o 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 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 (CSFV) e o vírus da Doença da Fronteira ou "border disease virus" (BDV) de ovinos (Horzinek 1991). Os pestivirus são vírus envelopados, com diâmetro entre 40 e 60nm, cujo genoma consiste de uma fita simples de RNA de 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 as 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 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 a infecção de fêmeas prenhes, e estão diretamente associadas à fase gestacional e ao tipo de amostra viral. A infecção de fêmeas prenhes pode cursar com reabsorção embrionária, abortamentos, 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 amostras 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 amostras 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, as 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 a amostras 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 amostras 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 pestivirus. 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. Edviges Maristela Pituco (Instituto Biológico, São Paulo, SP), respectivamente. As amostras NCP SV-126.8 e SV-260 utilizadas no desafio são amostras brasileiras caracterizados como pertencentes aos genótipos BVDV-1 e BVDV-2, respectivamente (Gil 1998). Os vírus utilizados nos testes de soroneutralização (SN) cruzada são amostras laboratoriais (BVDV-1, Singer; BVDV-2, 890), e as amostras 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 das amostras IBSP-2 (BVDV-1) e VS-253 (BVDV-2). A metodologia para a obtenção dos vírus modificados foi descrita em detalhes por BRUM (2002). Resumidamente, os vírus foram submetidos a sucessivas passagens em cultivo celular e clonagens associadas à exposição à radiação ultravioleta (UV) a cada passagem (BRUM, 2002). O tratamento foi realizado de forma paralela e individual, repetindo-se 20 vezes para a amostra VS-253 e 17 vezes para a amostra IBSP-2.

**Teste de inocuidade para bovinos.** Foram utilizados cinco bovinos machos, com idade entre 8 e 12 meses, soronegativos e livres do BVDV. Quatro animais foram imunizados com 1 ml do

sobrenadante de cultivos celulares infectados com cada amostra viral, contendo  $10^{6,88}$  DICC<sub>50</sub> (doses infectantes para 50% dos cultivos celulares) da amostra IBSP-2 e  $10^{6,51}$  DICC<sub>50</sub> 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 soroc conversão foi monitorada por 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  $10^{6,51}$  DICC<sub>50</sub> (IBSP-2) e  $10^{6,64}$  DICC<sub>50</sub> (VS-253). Após a inoculação, os animais foram monitorados clinicamente 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 úteros e fetos foram coletados para pesquisa de vírus.

**Avaliação de proteção fetal.** Para o estudo de proteção fetal, utilizaram-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  $10^{7,31}$  DICC<sub>50</sub> (IBSP-2) e  $10^{6,61}$  DICC<sub>50</sub> (VS-253) pela via IM na primeira aplicação e doses de  $10^{6,51}$  DICC<sub>50</sub> (IBSP-2) e  $10^{6,54}$  DICC<sub>50</sub> (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, pela inoculação de uma suspensão viral (5ml) contendo  $10^{6,64}$  DICC<sub>50</sub> (SV-126.8) ou  $10^{6,51}$  DICC<sub>50</sub> (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 pela 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 pela 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 (aprox. 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, utilizaram-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 CO<sub>2</sub> a 37°C. Realizaram-se três passagens com intervalos de 72 horas. Para os vírus CP, detectou-se a presença de vírus pela observação do efeito citopatogênico, e para os vírus NCP empregou-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 pela 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 várias amostras 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 a doses constantes do vírus (100-250 DICC<sub>50</sub>/cavidade). Células MDBK foram utilizadas como indicador da replicação viral. O monitoramento da replicação viral foi realizado pela observação de efeito citopatogênico para as amostras CP ou por 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 os títulos de 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<sub>2</sub> do título de anticorpos.

## RESULTADOS

Os vírus candidatos a amostras vacinais foram obtidos por sucessivas passagens em cultivo de células MDBK, associado à exposição a 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 a amostras vacinais serão denominados de vírus modificados.

**Teste de inocuidade para bovinos.** Para o teste de inocuidade para bovinos, utilizaram-se cinco bezerras, 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 em 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, utilizaram-se quatro ovelhas prenhes com idade gestacional entre 85 e 105 dias. Após a inoculação dos vírus, não observaram-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 Fig. 1 e no 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 =

Quadro 1. Anticorpos neutralizantes contra os vírus homólogos, induzidos pela imunização de ovelhas com duas amostras modificadas (VS-253 e IBSP-2) do vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV)

Animal	nº	Dia pós-vacinação							
		zero		45		178 (desafio)		194 (sacrifício)	
		VS 253	IBSP-2	VS 253	IBSP-2	VS 253	IBSP-2	VS 253	IBSP-2
Vacinados	14	< 4	< 4	256	512	512	256	1024	4096
	39	< 4	< 4	1024	256	1024	128	4096	2048
	49	< 4	< 4	128	256	256	256	> 4096	4096
	54	< 4	< 4	128	64	512	512	4096	4096
	131	< 4	< 4	1024	1024	2048	2048	4096	> 4096
	142	< 4	< 4	512	128	512	512	1024	> 4096
	155	< 4	< 4	256	512	512	2048	512	2048
	231	< 4	< 4	256	256	2048	1024	4096	2048
	242	< 4	< 4	512	1024	> 4096	1024	4096	> 4096
	250	< 4	< 4	256	128	256	512	2048	> 4096
257	< 4	< 4	128	256	512	1024	2048	> 4096	
Controles	51	< 4	< 4	< 4	< 4	< 4	< 4	< 4	16
	222	< 4	< 4	< 4	< 4	< 4	< 4	8	32
	235	< 4	< 4	< 4	< 4	< 4	< 4	8	8
	268	< 4	< 4	< 4	< 4	< 4	< 4	16	32

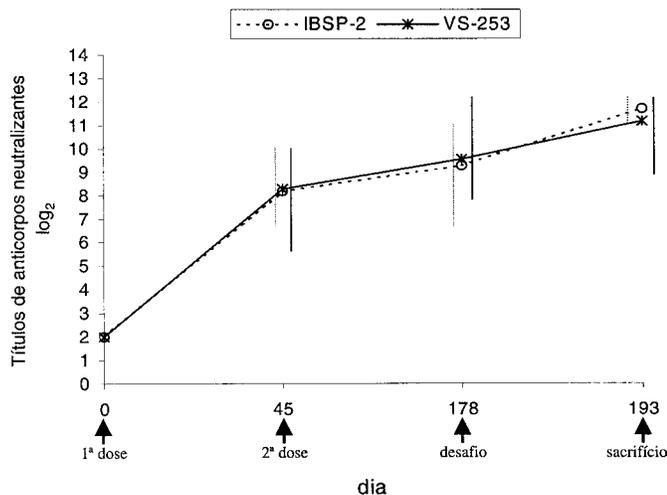


Fig. 1 - Títulos médios (GMT) de anticorpos neutralizantes contra as amostras vacinais em ovinos imunizados com duas amostras modificadas do vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV).

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 (Fig. 1). Os títulos individuais frente às amostras homólogas a diferentes intervalos estão apresentados no Quadro 1.

Com o soro coletado no dia do desafio, realizaram-se testes de neutralização cruzada contra amostras-padrão e contra amostras locais de BVDV-1 e BVDV-2. Os títulos neutralizantes verificados nos 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 a diferentes vírus. Observaram-se diferenças de títulos de até 7 vezes (8 para 1024) para alguns pares de soro-vírus. Em ge-

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)

Animal	BVDV-1										BVDV - 2				
	Homóloga	Padrão	Isolados brasileiros							Homóloga	Padrão	Isolados brasileiros			
	IBSP-2	Singer	SV-126.8	UFSM-4	UFSM-1	SV-126.1	SV-153.1	UFSM-3	SV-152.1	VS 253	890	SV-260	LV-96	SV-63	
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 nº	Feto nº	Vírus de desafio	Vírus						Tecidos fetais
				Dia pós-desafio						
				1	3	6	9	12	15	
Vacinadas	39	1	SV-260	+ <sup>a</sup> (sn <sup>b</sup> )	+ (sn)	- <sup>c</sup>	-	-	-	-
	49	1	SV-260	+ (sn)	+ (sn)	-	-	-	-	-
	54	2	SV-260	-	+ (sn)	-	-	-	-	-
	131	1	SV-260	-	+ (sn)	-	-	-	-	-
	250	1	SV-260	-	+ (sn e lc <sup>d</sup> )	+ (lc)	-	-	-	-
	14	1	SV-126.8	-	+ (sn e lc)	-	-	-	-	-
	142	1	SV-126.8	-	+ (sn)	-	-	-	-	-
	155	1	SV-126.8	-	+ (sn)	-	-	-	-	-
	231	1	SV-126.8	-	+ (sn)	-	-	-	-	-
	242	1	SV-126.8	+ (sn)	+ (sn)	+ (lc)	-	-	-	-
	257	1	SV-126.8	-	+ (sn)	-	-	-	-	-
Controles	51	1	SV-260	-	+ (sn e lc)	+ (lc)	-	-	-	+ (pl, t e p) <sup>e</sup>
	268	1	SV-260	+ (sn)	+ (sn)	-	-	-	-	+ (lf, pl e p)
	222	1	SV-126.8	-	+ (sn e lc)	+ (lc)	-	-	-	+ (pl, b e p)
	235	2	SV-126.8	+ (sn)	+ (sn e lc)	-	-	-	-	+ (lf, pl, b, t e p) + (pl e p)

<sup>a</sup>Amostra positiva para vírus;

<sup>b</sup>sn = secreção nasal;

<sup>c</sup>Amostra negativa para vírus;

<sup>d</sup>lc = Leucócitos;

<sup>e</sup>lf = líquido fetal, pl = placentomas, b - baço, t = timo e p = pulmão.

ral, os títulos neutralizantes frente a amostras brasileiras de BVDV-1 foram superiores aos títulos contra amostras brasileiras 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 pela 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 os 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 observaram 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 amostras 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 imunizações com duas doses não sejam comuns para vacinas com vírus vivo, demonstrou-se que é possível obter-se 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 das amostras testadas, 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 amostras vacinais (Botton et al. 1998). A inclusão de uma amostra 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 utilizada para atenuar vírus para a 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 perderam 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 amostras 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). No caso específico das amostras testadas, apenas o potencial de infecção fetal foi testado. Estudos adicionais para verificar a estabilidade genética (potencial de reversão a virulência) e possíveis propriedades imunossupressivas seriam recomendáveis antes de utilizarem essas amostras como vacina.

Os títulos de anticorpos neutralizantes induzidos pela imunização foram muito superiores aos detectados em bovinos e ovinos imunizados com vacinas inativadas, principal-

mente 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 a 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 pela 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 antígenicamente 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, pela 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 duas amostras já havia sido demonstrada anteriormente (Brusckhe 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 (Brusckhe et al. 1997). A imunidade conferida pela infecção natural pode induzir proteção fetal, porém a infecção transplacentária pode ocorrer quando utiliza-se amostras antígenicamente 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 (Dubovi 1992, Potgieter 1995). 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 associados a anticorpos sem atividade neutralizante tenham tido participação decisiva na 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 as amostras testadas; porém, observou-se uma variação marcante nos títulos entre animais e diferentes amostras. Em geral, os títulos maiores foram contra os isolados brasileiros 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 aos isolados de BVDV-2 brasileiros, provavelmente pelo fato da amostra de BVDV-2 vacinal (VS-253) ser norte-americana. Essa amostra é antigenicamente diferente das amostras brasileiras 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 as amostras brasileiras deste genótipo. Nesse sentido, a inclusão de várias amostras antigenicamente diferentes e representativas das amostras 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 pela 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 amostras 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.* 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.
- Brum M.C. 2002. Vacina experimental contra o vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV): avaliação da inocuidade, eficácia e modelo para testes de proteção vacinal. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, RS. 63p.
- Bruschke C.J.M., Moormann R.J.M., Oirschot J.T. van & Rijn P.A. van 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., Rijn P.A. van, Moormann R.J.M. & Oirschot J.T. van 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 diarrhoea virus (BVDV) and characterization of genomes of BVDV from Brazil. *Vet. Microbiol.* 63:85-97.
- Carman S., Drumel T. van, Ridpath J.F., Hazlett M., Alves D., Dubovi E.J., Tremblay R., Bolin S.R., Godkin A. & Anderson, N. 1998. Severe acute bovine viral diarrhoea 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 diarrhoea 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 diarrhoea 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 diarrhoea 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, RS. 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, Chap. 2, p. 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.
- Oirschot J.T. van, Bruschke C.J.M. & Rijn P.A. van 1999. Vaccination of cattle against bovine viral diarrhoea. *Vaccine* 17:169-183.
- 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., Hurk J. van den, 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 America* 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.
- Rijn P.A. van, Gennip H.G.P. van, Leendertse C.H., Bruscke C.J.M., Paton D.J., Moormann R.J. & Oirschot J.T. van 1997. Subdivision of the Pestivirus genus based on envelope glycoprotein E2. *Virology* 237:337-348.
- 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*. Chap. 16: Serological epidemiology. Butterworth, London, 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 diarréa viral bovina. *Ciência Rural*, Santa Maria, 30(1):129-135.
- 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 Diarréa Viral Bovina. *Ciência Rural*, Santa Maria, 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 diarréa viral bovina (BVDV). *Ciência Rural*, Santa Maria, 31 (5):831-838.