

BRUNO TOLEDO SILVA

Influência dos anticorpos maternos na resposta imune induzida  
pela vacinação em bezerros Holandeses

São Paulo

2015

BRUNO TOLEDO SILVA

**Influência dos anticorpos maternos na resposta imune induzida pela vacinação em bezerros Holandeses**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

**Departamento:**

Clínica Médica

**Área de concentração:**

Clínica Veterinária

**Orientador:**

Profa. Dra. Viviani Gomes

De acordo: \_\_\_\_\_

Orientador

São Paulo  
2015

**Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP**

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

#### DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.3239 FMVZ	Silva, Bruno Toledo Influência dos anticorpos maternos na resposta imune induzida pela vacinação em bezerros Holandeses / Bruno Toledo Silva. -- 2015. 139 p. il.  Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2015.  Programa De Pós-Graduação: Clínica Veterinária.  Área de concentração: Clínica Veterinária.  Orientador: Profa. Dra. Viviani Gomes.  1. Vacinação. 2. Vírus da Diarreia Viral Bovina. 3. Herpesvírus Bovino tipo 1.. 4. Vírus Sincicial Bovino. 5. Vírus da Parainfluenza Bovina tipo 3. I. Título.
----------------	---



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

## CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Influência dos anticorpos maternos na resposta imune induzida pela vacinação em bezerros Holandeses", protocolado sob o nº 2574, utilizando 20 (vinte) bezerros, sob a responsabilidade do(a) Profa. Dra. Viviani Gomes, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião do dia seis de fevereiro de 2013.

We certify that the Research "Influence of maternal antibodies in vaccine immune response in Holstein calves", protocol number 2574, utilizing 20 (twenty) bovine, under the responsibility Profa. Dra. Viviani Gomes, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved at the meeting on 6 February of 2013.

São Paulo, 13 de agosto de 2015.

Denise Tabacchi Fantoni  
Presidente

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: SILVA, Bruno Toledo

Título: Influência dos anticorpos maternos na resposta imune induzida pela vacinação em bezerros Holandeses

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

## DEDICATÓRIA

*Este trabalho é dedicado*

*A Deus, pela bênção de viver.*

*A vocês que sempre me fizeram acreditar na realização dos meus sonhos e trabalharam muito para que eu pudesse realizá-los, meus pais, Antonio e Valéria.*

*À minha irmã Caroline, exemplo de mulher guerreira e batalhadora.*

*À minha avó Ronilda que me ensinou desde sempre como amar e respeitar os animais.*

*A minha orientadora, pesquisadora competente que me acolheu em sua equipe.*

## **AGRADECIMENTOS**

*Agradeço primeiramente a Deus por toda oportunidade colocada em minha vida, por ter me dado forças para seguir adiante e edificar tudo que conquistei até o dia de hoje, principalmente nos momentos mais difíceis. Que o Senhor possa continuar abençoando a mim e minha família para que tenhamos muitas outras realizações.*

*Agradeço aos meus pais, Antonio Candido da Silva e Valéria Maria Toledo Silva, por todo amor e carinho, apoio, compreensão, pelas palavras de calma, pela preocupação com a distância que nos separava, e principalmente, por todo sacrifício para que a realização deste meu sonho fosse possível. À minha irmã Caroline Toledo Silva, pelos momentos em que precisamos do apoio e confiança um do outro. À minha avó Ronilda Barbosa, por toda preocupação com seu neto e por me ensinar como amar os animais. Aos demais familiares que aqui não citei, mas que sempre estiveram ao meu lado, confiando em meu potencial e acreditando no profissional em que me moldei. Amo todos vocês.*

*À minha orientadora, Profa. Dra. Viviani Gomes pelas oportunidades e confiança creditada em meu trabalho. Sua paciência em ensinar, os conselhos e críticas, me alavancou pra mais esta vitória. Admiro seu conhecimento e todas as conquistas alcançadas. Os bons frutos são apenas reflexo de todo trabalho sério e competente que desempenha com sua equipe. Obrigado!*

*Aos parceiros de equipe: Sylvia Novo, que confiou em meu trabalho ao me indicar para a equipe e que foi companheira desde a graduação; Camila Baccili, por toda ajuda e aprendizado que tive com a veterana da turma; Juliana Reis, pelas risadas e auxílios com os bezerras. Agradeço ainda a Cynthia Silva e Vinícius Baldacim, que passaram pela equipe agregando conhecimentos e bons momentos.*

*Aos alunos de Iniciação Científica e estagiários, Raquel Marques, Ariana Henklein, Stephanie Blima, Pamella Lorenci e aos demais, por todo empenho, dedicação e disponibilidade para me auxiliar com os bezerras.*

*Aos residentes e aprimorandos da Clínica de Bovinos e Pequenos Ruminantes-CBPR dos anos de 2013, 2014 e 2015. Todos vocês contribuíram direta ou indiretamente nesta minha caminhada.*

*Aos Pós-graduandos da FMVZ, por dividirem experiências profissionais e momentos que nos renderam boas risadas. Levo comigo grandes amizades e ensinamentos. Sucesso à todos.*

*Ao ilustre diretor da FMVZ/USP Prof. Dr. Enrico Lippi Ortolani e aos admirados professores do Departamento de Clínica Médica: Profa. Dra. Alice Maria Melville Paiva Della Libera, Prof. Dr. Archivaldo Reche Junior, Profa. Dra. Carla Bargi Belli, Prof. Dr. Carlos Eduardo Larsson, Profa. Dra. Denise Saretta Schwartz, Prof. Dr. Enrico Lippi Ortolani, Prof. Dr. Fábio Celidonio Pogliani, Prof. Dr. Fernando José Benesi, Profa. Dra. Lílian Gregory, Profa. Dra. Márcia de Oliveira Sampaio Gomes, Profa. Dra. Marcia Mery Kogika, Profa. Dra. Maria Cláudia Araripe Sucupira, Profa. Dra. Maria Helena Matiko Akao Larsson, Profa. Dra. Mitika Kuribayashi Hagiwara, Profa. Dra. Raquel Yvona Arantes Baccarin, Profa. Dra. Silvia Regina Ricci e Prof. Dr. Wilson Roberto Fernandes.*

*Agradeço especialmente a Profa. Dra. Alice Maria Melville Paiva Della Libera e toda sua equipe, pela amizade verdadeira construída, apoio incondicional e suporte científico quando mais precisei. Ao Prof. Dr. Fernando José Benesi pelos ensinamentos que contribuíram para esta minha formação. À Profa. Dra. Karina Medici Madureira por compartilhar conhecimentos e histórias, desde os tempos em que eu ainda não estava no mestrado. Ao Prof Dr Paulo Brandão e equipe, pela parceria e apoio de seu laboratório e estufa quando precisamos.*

*Ao Prof. Dr. David John Hurley e equipe, da "University of Georgia" pela paciência em nos ensinar suas técnicas e dividir conhecimentos de tantos anos de experiência. O senhor e sua família nos receberam de braços abertos, em sua casa e Universidade. Obrigado! Experiência como esta, levarei para vida toda!*

*Aos funcionários da Clínica de Bovinos e Pequenos Ruminantes- CBPR, pela ajuda essencial com o manejo dos meninos (bezerros). Em especial ao Luiz Cosmo Rodrigues, Edson Diogo, Francisco Antonio de Souza e Duque. E aos funcionários do Departamento de Clínica Veterinária, por todo suporte dado durante o experimento, seja ele de ordem científica ou pessoal. Agradeço a Cláudia Regina Stricagnolo, por sempre nos socorrer quando necessário; Samantha Ive Miyashiro, auxiliando com seus conhecimentos em hematologia; Clara Mori pela ajuda com as análises do colostro; e a Edna Santana que nos alegra com suas conversas e cantorias.*

*As amigadas que fiz durante o Mestrado, pelas circunstâncias da vida. Ana Carolina Paludo, obrigado pela irmandade, parceria e companhia em casa todos os dias. Carolina dos Anjos, pela amizade e parceria de longos anos (desde graduação), por me conhecer tão bem e me fazer tão bem! Pamella Lorenci, nossos caminhos se cruzaram na Universidade, mas trilhamos uma amizade e parceria sincera pra vida toda (por onde a gente passa é show!). Jefferson Lopes, meu amigo e amado companheiro, alegria dos meus dias!*

*Agradeço aos meus amigos, que mesmo geograficamente distantes sempre quiseram meu bem. Em especial Daiane Vieira, Juliana Freitas, João Antonio Galina, Gabriela Grabine, Beatriz Bernardi, Leandro Zancanaro. Amo vocês, queridos!*

*A parceria com o Laboratório de Vírus dos Bovídeos do Instituto Biológico, em especial a Profa. Dra. Edviges Maristela Pituco, Dra. Claudia Ribeiro e equipe, por toda parceria e suporte técnico com os testes de soroneutralização das viroses.*

*A parceria com a Zoetis intermediada pelo Fernando Braga e Enio Moro, que financiaram parcialmente os custos desta pesquisa.*

*A toda equipe da Fazenda Colorado, que gentilmente nos permitiu adquirir os bezerros para o estudo. Obrigado Natália Meirelles Sobreira, Sergio Soriano, Alex Sica e aos funcionários Genivaldo, Luan, Luiz, Marcos, Róger e Valdecí, por todo auxílio e ensinamento com os partos.*

*Ao Instituto de Zootecnia (APTA- Gado de Leite) onde pude auxiliar nos primeiros experimentos da equipe, absorvendo muitos conhecimentos profissionais. Obrigada à Juliana Rodrigues Pozzi Arcaro, Cláudia Rodrigues Pozzie Mariana Miranda e a todos os funcionários.*

*Ao Laboratório de Víruses Suínas do VPS, por ter nos cedido o espaço para utilização de ultra-centrífuga. Obrigado!*

*Não poderia deixar de agradecer a todos os bezerros utilizados neste estudo. A convivência diária me fez criar grande afeto por estes meninos!!!*

*À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo- FAPESP pela concessão do auxílio de pesquisa n°2012/02129-8, e pela bolsa de Treinamento Técnico Nível III, precursora do meu ingresso no programa de mestrado.*

*Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pela bolsa de mestrado cedida.*

*“Sem sonhos a vida não tem brilho.  
Sem metas, os sonhos não têm alicerces.  
Sem prioridades, os sonhos não se tornam reais.”*

*Augusto Cury*

*“Quando penso que cheguei ao meu limite,  
descubro que tenho forças para ir além.”*

*Ayrton Senna*

## RESUMO

SILVA, B. T. **Influência dos anticorpos maternos na resposta imune induzida pela vacinação em bezerros Holandeses.** [Influence of maternal antibodies in vaccine immune response in Holstein calves]. 2015. 139 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

O objetivo geral desta pesquisa foi avaliar a transferência de imunidade passiva e a sua influência na resposta vacinal para as viroses envolvidas na Doença Respiratória Bovina (DRB). Os dados obtidos nesta pesquisa estão apresentados em dois capítulos. **Capítulo 1** - Objetivou-se avaliar a dinâmica de anticorpos (Acs) específicos para as viroses respiratórias e subpopulações de linfócitos em bezerros do nascimento aos 240 dias (d) de vida. Para tanto, acompanhou-se a transferência de imunidade passiva de Acs específicos para as viroses respiratórias em 19 bezerros, destes cinco foram selecionados para acompanhamento da dinâmica de Acs neutralizantes e subpopulações de linfócitos dos 14 aos 240d. O colostro fornecido era proveniente de vacas doadoras vacinadas. A análise da qualidade individual do colostro revelou índice Brix  $\geq 21\%$ , observando-se forte correlação desses valores com proteína total ( $r = 0,942$  e  $P = 0,001$ ). Após 48 horas da ingestão do colostro, pôde-se observar soroconversão dos 19 animais (100%) para os agentes virais envolvidos na DBR. As medianas ( $\text{Log}_2$ ) encontradas foram de 12,3, 9,0, 5,0 e 8,5 para BVDV, BoHV-1, BRSV e BPIV-3. Dos 14 aos 240d os 5 bezerros avaliados, demonstraram declínio gradual dos títulos de Acs ( $\text{Log}_2$ ) para BVDV (12,8-3,3), BoHV-1 (10,0-3,3) e BPIV-3 (10,0-2,0), embora o BVDV não tenha apresentado soronegatividade até os 240d. Manifestações clínicas de broncopneumonia foram observadas em 4/5 (80%) bezerros dos 80 aos 135 d. BRSV (11,3-2,0) apresentou perfil diferenciado na dinâmica de anticorpos em relação às demais viroses. Não foram detectadas diferenças estatísticas entre os momentos para as viroses apesar das variações detectadas ( $P > 0,05$ ). A meia-vida e tempo para soronegatividade foram de  $36,2 \pm 6,1$  e  $367,01 \pm 68,7$ d para BVDV,  $50,7 \pm 18,0$  e  $239,67 \pm 66,88$ d para BoHV-1 e  $46,8 \pm 21,1$  e  $303,36 \pm 60,15$ d para BPIV-3. BRSV não respeitou modelo de regressão para cálculos de meia-vida e soronegatividade. Valores absolutos e relativos das populações de linfócitos não revelaram diferenças estatísticas entre os momentos ( $P > 0,05$ ). Contudo, a dinâmica

das subpopulações de linfócitos revelou aumento de células B CD21<sup>+</sup> até 150d; aumento nos valores relativos das subpopulações CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> principalmente aos 74-90d. Assim, pôde-se determinar uma janela de susceptibilidade a partir dos 74d especialmente ao BRSV e BoHV-1, momento que precede o aumento dos títulos de Acs após exposição natural. **Capítulo 2 –** Objetivou-se avaliar a influência dos Acs maternos na resposta imune para DRB induzida pela vacinação. Foram selecionados 23 bezerros recém-nascidos, distribuídos aleatoriamente entre 4 grupos experimentais: G1 – vacinado aos 14d e *booster* aos 44d; G2 – aos 90d e aos 120d; G3 – aos 180d e aos 210d. Além disso manteve-se um grupo controle não vacinado – CG1, CG2 e CG3. Os bezerros foram vacinados com a mesma vacina comercial empregada para vacinação das doadoras de colostro. Observou-se: (1) a vacina com BVDV inativado não promoveu aumento dos títulos de Acs para nenhum dos grupos avaliados; (2) G1 não demonstrou soroconversão para nenhuma das viroses, enquanto controle CG1 exibiu decréscimo dos títulos para BVDV, BoHV-1 e BPIV-3; (3) o BRSV apresentou baixa soroconversão no G2, enquanto o controle demonstrou altos títulos dos 44-120d; (4) não foi possível distinguir entre quais tempos ocorreram diferenças entre títulos ( $P > 0,0167$ ); (5) linfócitos B (CD21<sup>+</sup>) aumentaram do T0-T2 para G1, diminuíram para G2, e aumentaram no G3; (6) linfócitos T CD3<sup>+</sup> diminuíram ao longo do tempo para todos os grupos, exceto CG3; (7) apesar de oscilações, linfócitos T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e WC1<sup>+</sup> se mantiveram praticamente constantes até 240d, exibindo maiores proporções nos grupos vacinados; (8) a expressão do marcador CD25<sup>+</sup> foi mantida pelo grupo G1 até o T2, mas apresentou aumento no G2 e G3; (9) manifestações de broncopneumonias foram identificadas nos bezerros do grupo controle (4/5 - 80%) e podem ter exercido influência nas diferenças encontradas para as células entre os grupos. Em geral, a vacinação dos bezerros aos 90 (G2) e 180d (G3) manteve ou estimulou a produção de Acs para o BoHV-1, BRSV e BPIV-3, e a ativação das células T expressas pelo marcador CD25<sup>+</sup> pode ter sido responsável pela proteção dos bezerros frente à DRB. Assim, com base nos resultados, concluiu-se que a intensidade da imunidade dos bezerros induzida pela vacinação aumentou de acordo com o desenvolvimento etário e diminuição dos títulos de Acs maternos. A conclusão geral desta dissertação aponta para a necessidade precoce de imunização dos bezerros, especialmente pela susceptibilidade observada para BRSV e BPIV-3 aos 74-90d de vida. Entretanto, esta pesquisa não encontrou

resposta humoral induzida pela vacinação no grupo de bezerros vacinados aos 14 e 44 dias, apesar dos indícios de resposta imune celular. Assim, estudos futuros devem ser elaborados considerando estratégias para amplificar a resposta imune precoce dos bezerros para os agentes virais envolvidos na DRB.

Palavras-chave: Vacinação. Vírus da Diarreia Viral Bovina. Herpesvírus Bovino tipo 1. Vírus Sincicial Bovino. Vírus da Parainfluenza Bovina tipo 3.

## ABSTRACT

SILVA, B. T. **Influence of maternal antibodies in vaccine immune response in Holstein calves.** [Influência dos anticorpos maternos na resposta imune induzida pela vacinação em bezerros Holandeses]. 2015. 139 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

The main purpose of this research was to evaluate the transfer of passive immunity and its influence on vaccine response to the viruses involved in bovine respiratory disease (BRD). The data obtained in this study are presented in two chapters. **Chapter 1** - The objective was to evaluate the dynamics of specific antibodies to the respiratory viruses and lymphocyte subpopulations in the calves from birth to 240 days (d) of life. Thus, the transfer of passive immunity of specific antibodies to the respiratory viruses were assessed in 19 calves; from these, five were selected for monitoring the dynamic of neutralizing Abs and lymphocytes subpopulations from 14 to 240d. The colostrum was provided from donor vaccinated cows. The analysis of individual quality of the colostrum revealed Brix  $\geq 21\%$ , observing strong correlation of these values with total protein ( $r = 0.942$  and  $P = 0.001$ ). After 48 hours of colostrum intake, was observed seroconversion of the 19 animals (100%) for the viral agents involved in the DBR. The median ( $\text{Log}_2$ ) ratio found was 12.3, 9.0, 5.0 and 8.5 for BVDV, BoHV-1, BRSV and BPIV-3. The 5 calves followed from 14 to 240d showed gradual decline in antibody titers ( $\text{Log}_2$ ) to BVDV (12.8 to 3.3), BoHV-1 (10.0 to 3.3) and BPIV-3 (10, 0-2.0), although could not be detected seronegative calves for BVDV up to eight months of age. Clinical manifestations of bronchopneumonia were observed in 4/5 (80%) calves from 80 to 135 days of life. BRSV (11.3 to 2.0) showed a distinct profile in the dynamics of antibodies compared to other viruses. There were no statistical differences between times for viruses despite variations detected ( $P > 0.05$ ). The half-life and time to become seronegative were  $36.2 \pm 6.1$  and  $367.01 \pm 68.7$ d for BVDV,  $50.7 \pm 18.0$  and  $239.67 \pm 66.88$ d for BoHV-1 and,  $46.8 \pm 21.1$  and  $303.36 \pm 60.15$ d for BPIV-3. BRSV did not respect regression model to perform half-life and seronegative calculations. Absolute and relative values of lymphocyte populations revealed no statistical differences between times ( $P > 0.05$ ). However, the dynamics of lymphocyte subpopulations showed increase in B cells  $\text{CD}21^+$  up to 150d; increase in the relative values of  $\text{CD}4^+$ ,  $\text{CD}8^+$  and  $\text{CD}3^+\text{CD}4^-\text{CD}8^-$

subpopulations, mainly to 74-90d. Thus, it was possible to determine a window of susceptibility since 74d especially for BRSV and BoHV-1, moment that precede the increase in antibody titers after natural exposure. **Chapter 2** - The objective was to evaluate the influence of maternal antibodies in the immune response to respiratory viruses induced by vaccination. Was selected 23 newborn calves that were randomly distributed in four groups: G1 - vaccinated at 14d and booster at 44d; G2 - vaccinated at 90d and booster at 120d; G3 - vaccinated at 180d and booster at 210d. Furthermore were kept a non-vaccinated control group - CG1, CG2 and CG3. Calves were vaccinated with the same commercial vaccine in the colostrum donors. From these, could be observed: (1) the vaccine with inactivated BVDV did not promote increase of antibodies titers in any of the assessed groups; (2) G1 did not demonstrated seroconversion for any of the viruses while CG1 control exhibited decrease in the titers for BVDV, BoHV-1 and BPIV-3; (3) BRSV had low seroconversion in G2, while the control showed high titers from 44 to 120d; (4) where the differences between times occurred could not be distinguished ( $P < 0.0167$ ); (5) B cells ( $CD21^+$ ) increased from T0 to T2 for G1, decreased for G2, and increased for G3; (6) T lymphocytes  $CD3^+$  decreased over time for all groups except for CG3; (7) despite variations, T lymphocytes  $CD4^+$ ,  $CD8^+$  and  $WC1^+$  remained almost constant until 240d, displaying greater proportions in the vaccinated groups; (8) the expression of the  $CD25^+$  marker was maintained in the vaccinated group G1 up to T2, whereas vaccination promoted an increase of this expression in G2 and G3; (9) clinical manifestations of bronchopneumonia were identified in the control group (4/5 calves - 80%) and may have influence on the differences found for the cells between the groups. In general, vaccination of calves at 90 (G2) and 180d (G3) maintained or stimulated the production of Abs to BoHV-1, BRSV and BPIV-3, and the activation of T cells expressed by the  $CD25^+$  marker may have been responsible for the protection of calves from BRD. Thus, based on the results, it was concluded that the intensity of the immunity induced by vaccination of calves increased according to the age of development and decay of maternal antibody titers. The general conclusion of this research, points to the need for early immunization of calves, especially by the susceptibility observed for BRSV and BPIV-3 from 74-90d of life. However, this research didnot found humoral response induced by vaccination in the group of calves vaccinated at 14 and 44 days, despite the evidence of cellular immune

response. Thus, future studies should be designed considering strategies to amplify the early immune response of calves to the viral agents involved in the BRD.

Keywords: Vaccination. Bovine Viral Diarrhea Virus. Bovine Herpesvirus type 1  
Bovine Syncytial Virus. Bovine Parainfluenza virus type 3.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Esquema de infecção fetal pelo Vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) e formação de bezerros persistentemente infectados (PI) e com Doença das mucosas – São Paulo – 2015.....	36
Figura 2 –	Assistência aos recém-nascidos e colostragem dos bezerros imediatamente após nascimento, São Paulo – São Paulo – 2015.....	53
Figura 3 -	Etapas inicialmente executadas para análise dos eventos no software Flowjo, obtidos nos ensaios de citometria de fluxo. As fluorescências FL1 (c), FL2 (d) e FL3 (e), foram determinadas e calibradas a partir dos anticorpos WC1 <sup>+</sup> , CD25 <sup>+</sup> e CD3 <sup>+</sup> , respectivamente. - São Paulo – 2015.....	62
Figura 4 -	Ensaio de avaliação linfócitos CD3+CD4 <sup>+</sup> e CD3+CD8 <sup>+</sup> (FL1), determinadas a partir da fluorescência de CD3 <sup>+</sup> (FL3) por WC1 <sup>+</sup> (FL1) - São Paulo – 2015.....	63
Figura 5 -	Ensaio de avaliação da população B CD21 <sup>+</sup> (FL3) - São Paulo – 2015.....	63
Figura 6 –	Correlação linear de Pearson entre porcentagens do índice Brix e proteínas totais presentes no colostro – São Paulo – 2015.....	66
Figura 7 –	Comportamento individual dos títulos de anticorpos específicos para as viroses respiratórias em bezerros Holandeses dos 14 aos 240d de vida – São Paulo -2015.....	69
Figura 8 –	Valores relativos (%) deas populações e subpopulações de linfócitos e marcador de ativação (CD25 <sup>+</sup> ) em bezerros Holandeses dos 14 aos 240 dias de vida – São Paulo – 2015.....	72
Figura 9 –	Vacinação de bezerros com vacina comercial polivalente– São Paulo – 2015.....	89

Figura 10 -	Títulos de anticorpos específicos para as viroses respiratórias em bezerros Holandeses vacinados e controle – São Paulo – 2015.....	99
Figura 11 –	Valores absolutos (células x 10 <sup>3</sup> /μL) e relativos dos linfócitos totais, linfócitos B (CD21 <sup>+</sup> ), linfócitos T (CD3 <sup>+</sup> ) e suas subpopulações e marcador de ativação CD25 <sup>+</sup> em bezerros Holandeses submetidos à diferentes protocolos de vacinação – São Paulo – 2015.....	107
Figura 12 –	Valores absolutos (células x 10 <sup>3</sup> /μL) e relativos dos linfócitos totais, linfócitos B (CD21 <sup>+</sup> ), linfócitos T (CD3 <sup>+</sup> ) e suas subpopulações e marcador de ativação CD25 <sup>+</sup> em bezerros Holandeses submetidos à diferentes protocolos de vacinação – São Paulo – 2015.....	108

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores medianos e amplitude de variação para os títulos de anticorpos específicos para as viroses respiratórias em bezerros Holandeses às 48 horas de vida – São Paulo -2015.....	67
Tabela 2 – Valores medianos ( $\log_2$ ) e antilog de anticorpos específicos para as viroses respiratórias dos 14 aos 240 dias de vida – São Paulo -2015.....	68
Tabela 3 – Valores de meia-vida de anticorpos neutralizantes e tempo estimado para soronegatividade para BVDV, BoHV-1, BRSV e BPIV-3 – São Paulo -2015.....	69
Tabela 4 - Medianas dos valores absolutos ( $10^3/\mu\text{L}$ ) e relativos (%) das populações e subpopulações de linfócitos e marcador de ativação ( $\text{CD}25^+$ ) em bezerros Holandeses dos 14 aos 240 dias de vida – São Paulo – 2015.....	71
Tabela 5 – Frequência de bezerros Holandeses soropositivos para as viroses respiratórias em grupos vacinados e controle – São Paulo – 2015.....	90
Tabela 6 – Títulos de anticorpos específicos para as viroses respiratórias em bezerros Holandeses vacinados e controle – São Paulo – 2015.....	91
Tabela 7 – Títulos de anticorpos neutralizantes individuais ( $\log_2$ ) para BVDV em bezerros Holandeses vacinados e controle– São Paulo – 2015.....	100
Tabela 8 – Títulos de anticorpos neutralizantes individuais ( $\log_2$ ) para BoHV-1 em bezerros Holandeses vacinados e controle– São Paulo – 2015.....	101
Tabela 9 – Títulos de anticorpos neutralizantes individuais ( $\log_2$ ) para BRSV em bezerros Holandeses vacinados e controle– São Paulo – 2015.....	102

Tabela 10 – Títulos de anticorpos neutralizantes individuais ( $\log_2$ ) para BPIV-3 em bezerros Holandeses vacinados e controle– São Paulo – 2015.....	103
Tabela 11 - Valores absolutos (células x $10^3/\mu\text{L}$ ) e relativos dos linfócitos totais, linfócitos B (CD21 <sup>+</sup> ), linfócitos T (CD3 <sup>+</sup> ) e suas subpopulações e marcador de ativação CD25 <sup>+</sup> em bezerros Holandeses submetidos à diferentes protocolos de vacinação – São Paulo – 2015.....	106

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Escore para avaliação da viabilidade do bezerro recém-nascido pela escala de APGAR – São Paulo – 2015.....	53
Quadro 2 –	Especificações e diluições de anticorpos monoclonais primários e secundários selecionados para a marcação das subpopulações de linfócitos - São Paulo – 2015 .....	61
Quadro 3 –	Porcentagens Brix e valores de proteína total mensurados em “pool” de colostro fornecido a 19 bezerros Holandeses – São Paulo -2015.....	65
Quadro 4 -	Escore para avaliação da viabilidade do bezerro recém-nascido pela escala de APGAR – São Paulo – 2015.....	84
Quadro 5 -	Protocolo de vacinação empregado para a imunização dos grupos experimentais – São Paulo – 2015.....	87
Quadro 6 –	Apresentação dos grupos experimentais segundo a sua identificação, data de nascimento e procedência – São Paulo – 2015.....	88
Quadro 7 -	Momentos padronizados para colheitas das amostras de sangue e soro de bezerros dos grupos vacinados e controles - São Paulo – 2015.....	89

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>APCs</b>	<i>Antigen Presenting Cell</i>
<b>BoHV-1</b>	Herpesvírus Bovino Tipo-1
<b>BRSV</b>	Vírus Sincicial Bovino
<b>BPIV-3</b>	Vírus da Parainfluenza Bovina Tipo-3
<b>BVDV</b>	Vírus da Diarreia Viral Bovina
<b>CCS</b>	Contagem de Células Somáticas
<b>d</b>	dias
<b>DBR</b>	Doença Respiratória Bovina
<b>dL</b>	Decilitro
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ECP</b>	Efeito Citopático
<b>EDTA</b>	<i>Ethylene Diamine Tetraacetic Acid</i>
<b>FC</b>	Frequência Cardíaca
<b>FITC</b>	<i>Fluorescent Isothiocyanate</i>
<b>FSC</b>	<i>Forward Scatter</i>
<b>g</b>	gramas
<b>GMT</b>	<i>Geometric Mean Titer</i>
<b>IFN</b>	<i>Interferon</i>
<b>IGF</b>	<i>Insulin-like growth fator</i>
<b>Igs</b>	Imunoglobulinas
<b>IL</b>	Interleucina
<b>L</b>	Litros
<b>log</b>	Logaritmo
<b>MDBK</b>	<i>Madin Darby Bovine Kidney</i>
<b>MEM</b>	Meio Essencial Mínimo
<b>mg</b>	Miligramas
<b>MHC</b>	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
<b>mM</b>	Milimolar
<b>MN</b>	Mononucleares
<b>NK</b>	<i>Natural Killer</i>

<b>p.n.</b>	pós nascimento
<b>PAMPs</b>	<i>Pathogen Associated Molecular Pattern</i>
<b>PBS</b>	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
<b>RT-PCR</b>	<i>Real Time Polymerase Chain Reaction</i>
<b>PE</b>	<i>Phycoerythrin</i>
<b>PERCP</b>	<i>Peridinin-Chlorophyll Proteins</i>
<b>PMN</b>	Polimorfonucleares
<b>PRRs</b>	<i>Pattern Recognition Receptors</i>
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>RPMI</b>	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
<b>SN</b>	Soroneutralização
<b>SSC</b>	<i>Side Scatter</i>
<b>TCID</b>	<i>Tissue Culture Infective Doses</i>
<b>TCR</b>	<i>T cell Receptor</i>
<b>TGF</b>	<i>Transforming Growth Factor</i>
<b>TLRs</b>	<i>Toll Like Receptors</i>
<b>TNF</b>	<i>Tumor Necrosis Factor</i>

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\gamma$	Gamma
$\delta$	Delta
$\mu$	Micro
®	Marca Registrada
>	Maior que
$\leq$	Menor ou igual que
<	Menor que
%	Porcentagem
<b>G</b>	Força G
=	Igual
+	Positivo
-	Negativo
$\pm$	Mais ou menos

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	28
2	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	31
2.1	RESPOSTA IMUNE À VÍRUS.....	31
2.2	VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA (BVDV).....	33
2.3	HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 1 (BoHV-1) .....	38
3.4	VÍRUS RESPIRATÓRIO SINCICIAL BOVINO (BRSV) .....	41
2.5	VÍRUS DA PARAINFLUENZA BOVINA TIPO 3 (BPIV-3) .....	43
2.6	DESENVOLVIMENTO DA RESPOSTA IMUNE DO RECÉM-NASCIDO.	45
2.7	IMUNIZAÇÃO BEZERROS.....	47
	<b>CAPÍTULO 1 - IMUNIDADE PASSIVA COLOSTRAL PARA AS</b>	
	<b>VIROSES ENVOLVIDAS NA DOENÇA RESPIRATÓRIA BOVINA</b> .....	50
3	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	51
4	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	52
4.1	OBTENÇÃO DOS BEZERROS.....	52
4.2	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	54
4.2.2	<b>Soroneutralização</b> .....	54
4.2.3	<b>Reação em cadeia da Polimerase em Tempo Real</b> .....	55
4.3	COLOSTRAGEM.....	56
4.4	ISOLAMENTO E MANUTENÇÃO.....	56
4.5	COLHEITA DE AMOSTRAS.....	57
4.6	PROVAS LABORATORIAIS.....	58
4.6.7	<b>Colostro</b> .....	58
4.6.8	<b>Bezerros</b> .....	59
4.7	ESTATÍSTICA.....	64
5	<b>RESULTADOS</b> .....	64
5.1	ANÁLISES DO COLOSTRO.....	65
5.2	BEZERROS.....	67
5.2.1	<b>Exame do estado geral</b> .....	67
5.2.2	<b>Imunidade humoral</b> .....	67
5.2.3	<b>Subpopulações de linfócitos e ativação celular (CD25<sup>+</sup>)</b> .....	70
6	<b>DISCUSSÃO</b> .....	73

6.1	ANÁLISES DO COLOSTRO.....	73
6.2	ANTICORPOS SÉRICOS.....	74
6.3	POPULAÇÕES E SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS.....	78
7	<b>CONCLUSÕES</b> .....	78
	<b>CAPÍTULO 2 – INFLUÊNCIA DOS ANTICORPOS MATERNOIS NA RESPOSTA IMUNE INDUZIDA PELA VACINAÇÃO EM BEZERROS HOLANDESES</b> .....	82
8	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	83
9	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	84
9.1	OBTENÇÃO DOS BEZERROS.....	84
9.2	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	85
9.3	COLOSTRAGEM.....	85
9.4	ISOLAMENTO E MANUTENÇÃO.....	86
9.5	GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	87
9.6	COLHEITA DE AMOSTRAS.....	89
9.7	PROVAS LABORATORIAIS.....	90
9.7.1	<b>Soroneutralização</b> .....	90
9.7.2	<b>Subpopulações de Linfócitos</b> .....	91
9.8	ESTATÍSTICA.....	92
10	<b>RESULTADOS</b> .....	94
10.1	RESPOSTA HUMORAL INDUZIDA PELA VACINAÇÃO.....	94
10.2	LINFÓCITOS E SUAS SUBPOPULAÇÕES.....	103
11	<b>DISCUSSÃO</b> .....	109
11.1	RESPOSTA HUMORAL INDUZIDA PELA VACINAÇÃO.....	109
11.2	SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS.....	114
12	<b>CONCLUSÕES</b> .....	117
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	118

## 1 INTRODUÇÃO

A susceptibilidade do recém-nascido bovino está associada a placenta do tipo sinepteliocorial, que propicia ambiente uterino estéril por impedir a passagem de macromoléculas. Em contrapartida, os bezerros nascem com sistema imune enfraquecido devido a hipogamoblobulinemia e ausência de memória imunológica (BARRINGTON; PARRISH, 2001). Além disso, as alterações hormonais maternas ocorridas na gestação podem modular a resposta imune para Th2, em concomitância com a supressão da resposta Th1 (WEGMANN et al., 1993). Soma-se a estes fatores a imunossupressão gerada pelo cortisol materno e fetal que resulta em leucograma de estresse nos primeiros quatro dias de vida, caracterizado por leucocitose por neutrofilia e eosinopenia nos primeiros quatro dias de vida, associada com a diminuição da atividade funcional dos fagócitos (NOVO et al., 2015).

O bezerro recém-nascido apresenta predomínio da subpopulação de linfócitos  $TCR\gamma\delta^+$  (25%), em relação ao  $CD8^+$  (10%) e  $CD4^+$  (20%). Linfócitos B representam apenas 4% dos linfócitos circulantes ao nascimento. Com o desenvolvimento do bezerro, observa-se diminuição da população de células  $TCR\gamma\delta^+$  e aumento dos linfócitos B. Proporções de células semelhantes ao bovino adulto são atingidas apenas na puberdade (KAMPEN et al., 2006).

Diante do contexto apresentado, pode-se pressupor que bovinos jovens em desenvolvimento pode apresentar resposta imune limitada aos microrganismos, devido à imaturidade dos mecanismos de proteção do nascimento à puberdade (CORTESE, 2009). Assim, a adoção de medidas para amplificar a imunidade e diminuir a susceptibilidade às doenças são fundamentais para garantir a sobrevivência destes animais.

A primeira medida para prover assistência imunológica aos bezerros é a administração do colostro devido aos elevados teores de imunoglobulinas, além de células, citocinas e outros componentes solúveis, que podem ser absorvidos pela mucosa intestinal até 24 horas pós-nascimento - p.n. (BARRINGTON; PARRISH, 2001). A concentração de anticorpos maternos decresce com o avançar da idade até atingir quantidades insuficientes para protegê-los, em contrapartida, ACs residuais podem bloquear a resposta imune ativa induzida pela vacinação (ELLIS et al.,

2001).ACs maternos são detectados na circulação dos recém-nascidos bovinos até os seis meses de idade (MENANTEAU-HORTA et al., 1985).

O efeito negativo dos anticorpos maternos na resposta imune induzida pela vacinação em bezerros é um grande desafio para o estabelecimento de protocolos de vacinação. Pode ser agravado por todas os fatores específicos do sistema de criação responsáveis pelas variações na concentração de ACs do colostro e na taxa absorptiva dessas substâncias pelo recém-nascido. Aguardar a completa metabolização dos ACs maternos para iniciar os protocolos de vacinação pode ser tardio dependendo da precocidade de exposição do hospedeiro (CHASE; HURLEY; REBER, 2008).

Este cenário tem sido foco de estudos direcionados aos agentes virais envolvidos na DRB, pois essa enfermidade é a principal causa de mortalidade de bezerras de leite do segundo mês de vida ao desmame (VIRTALA et al., 1996).A DRB possui carácter multifatorial, com inúmeras associações entre agentes virais e bacterianos, hospedeiro e condições ambientais (ACKERMANN; DERSCHEID; ROTH, 2010). Dentre os agentes virais, destacam-se o Vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV), Herpesvírus Bovino tipo 1 (BoHV-1), Vírus Sincicial Bovino (BRSV) e Vírus da Parainfluenza Bovina tipo 3 (BPIV-3) (HÄGGLUND et al., 2007). Estes vírus causam danos ao trato respiratório superior e comprometem a resposta imune do hospedeiro, favorecendo as infecções por patógenos secundários e conseqüentemente a manifestação aguda da doença (ACKERMANN; DERSCHEID; ROTH, 2010).

As limitações apresentadas à respeito da vacinação precoce dos bezerros para a DRB é agravada em nosso país, pois o uso de vacinas vivas para o BVDV não é permitido no território brasileiro (FLORES et al., 2005). Este fato impossibilitou a comercialização das vacinas intranasais, compostas por cepas de BVDV vivas e atenuadas, que estimulariam resposta imune de mucosas sem influência dos anticorpos maternos (ENDSLEY et al., 2003; RIDPATH et al., 2003). O cenário brasileiro impossibilita o uso das informações geradas em outros países devido às diferentes imunogenicidades induzidas pelas vacinas contendo o BVDV inativado ou vivo e atenuado.

Diante do exposto, a hipótese desta pesquisa é que a imaturidade do sistema imunológico de bezerros jovens e a presença de anticorpos maternos circulantes interfere na resposta imune humoral e celular induzida pela vacinação. Assim, o

objetivo geral desta pesquisa foi avaliar a transferência de imunidade passiva e a sua influência na resposta vacinal para as viroses envolvidas na DRB. Os objetivos específicos deste estudo foram: a) avaliar a dinâmica das subpopulações de linfócitos e anticorpos específicos para as viroses respiratórias, do nascimento aos oito meses de idade; b) avaliar a influência dos anticorpos maternos na resposta imune vacinal para as viroses respiratórias.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 RESPOSTA IMUNE À VÍRUS

As respostas imunitárias à vírus podem ser divididas naquelas que previnem a infecção (humoral) e aquelas que ajudam na recuperação (humoral e celular) (BABIUK; VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK; TIKOO, 1996), sendo essa resposta especialmente modulada por interferons. Os antígenos virais possuem um padrão molecular denominado PAMP (*Pathogen-associated molecular pattern*), que são reconhecidos pelas células do hospedeiro, especialmente as células apresentadoras de antígenos (*Antigen-presenting cell* - APC). Receptores do tipo Toll (*Toll Like Receptors*- TLR) 3, TLR7, TLR8 e TLR9 reconhecem RNA de dupla fita, resultando na sinalização intracelular mediadas pelas proteínas RIG-1 e MDA5 que desencadeiam a ativação do gene que codifica o interferon gama (IFN- $\gamma$ ) (TIZARD, 2008)

Células dendríticas plasmocitóides, reconhecem os antígenos por meio de seus receptores PRRs (*Pattern recognition receptor*). Uma vez identificadas, as partículas virais são fagocitadas e conjugadas ao Complexo de Histocompatibilidade Principal (*Major Histocompatibility Complex* - MHC) do tipo II nos fagolisossomos. Na superfície celular são então reconhecidos pelos linfócitos T auxiliares. Simultaneamente, estas células sintetizam grandes quantidades de IFN- $\alpha$  que ativa a citotoxicidade mediada pelas células NK, além de direcionar algumas respostas de linfócitos T  $\gamma/\delta$ . Assim, essa APC participa na ativação de linfócitos T virgens (*naïve*), proliferação de linfócitos T de memória e linfócitos T antígeno-específicos (HAERYFAR, 2005).

As células NK também participam da resposta imune inata, e são responsáveis pela citotoxicidade em células infectadas por vírus. Estas células são estimuladas pelo interferon produzido no início da infecção viral. NK também sintetizam IFN- $\gamma$ , que por ação direta podem reduzir a gravidade das infecções virais bem antes do desenvolvimento do aparecimento da citotoxicidade específica dos linfócitos T (ABBAS; LITCHMAN; PILAI, 2008).

A imunidade adquirida, para ser completa, necessita da resposta imune mediada por células. Ao infectarem as células, as partículas virais são conjugadas aos MHC tipo I. As células hospedeiras são então reconhecidas como estranhas, e são destruídas por citotoxicidade mediada pelos linfócitos T. Em caso de vírus não citopáticos, a infecção em macrófagos pode ser persistente, assim essas células precisam ser ativadas pelo IFN- $\gamma$  para que os agentes virais sejam destruídos (YEWDELL; HAERYFAR, 2005).

Os capsídeos virais e as proteínas do envelope também são antigênicos, e por isso grande parte das respostas imunológicas antivirais é dirigida contra esses componentes. O contato com o antígeno e as citocinas produzidas pelos linfócitos T auxiliares, estimulam os linfócitos B a se multiplicarem de forma rápida e abundante. As células resultantes dessa proliferação podem ter dois destinos: a grande maioria se diferencia em plasmócitos, e uma minoria se diferencia em células de memória. Os anticorpos podem impedir a invasão celular bloqueando a adsorção dos vírions às células-alvo, estimulando a fagocitose dos vírus, desencadeando a virólise mediada pelo sistema complemento ou causando o agrupamento dos vírus, o que reduz o número de unidades infecciosas disponíveis para a invasão celular. Além disso, os anticorpos podem destruir antígenos virais expressos pelas células infectadas (BATISTA; HARWOOD, 2009).

A ligação com os anticorpos não destrói os vírus, já que o rompimento dos complexos vírus-anticorpo pode liberar vírions infecciosos. As imunoglobulinas que neutralizam os vírus são as imunoglobulinas G (IgG) e a IgM, presentes no soro, e a IgA encontrada nas secreções. A IgE talvez também apresente um papel protetor, já que humanos deficientes quanto à síntese desta molécula são acometidos por graves infecções respiratórias (TIZARD, 2008).

A duração da memória imunológica aos vírus é altamente variável. Assim, anticorpos dirigidos contra os vírus podem persistir por muitos anos na ausência desses patógenos. Por outro lado, devido aos perigos oriundos da citotoxicidade persistente, os linfócitos T citotóxicos morrem logo após a eliminação do vírus. Os linfócitos T de memória podem, no entanto, sobreviver por muitos anos (TIZARD, 2008).

## 2.2 VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA (BVDV)

O BVDV pertence à família *Flaviviridae*, do gênero *Pestivirus* e foi originalmente descrito por dois grupos de pesquisa na América do Norte em 1946 (CHILDS, 1946; OLAFSON; MACCALLUM, FOX, 1946). Possuem partículas virais esféricas, um capsídeo de simetria icosaédrica e um envelope de composição lipídica. O genoma viral é composto por moléculas de RNA fita simples, não segmentado, de polaridade positiva e organizado em uma longa “*open reading frame*” (janela de leitura - ORF). Esta é traduzida em uma única poliproteína que sofre clivagem, originando entre 10 a 12 polipeptídios estruturais e não estruturais (BAKER, 1995, GOENS 2002).

Segundo Donis (1995), as proteínas não-estruturais do genoma do BVDV (N<sup>pro</sup>, P7, NS2/3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B) estão envolvidas no processo de replicação viral. As proteínas estruturais C, E<sup>ms</sup>, E1 e E2 exercem funções importantes no revestimento protetor do RNA viral e permitem a entrada e saída das partículas virais das células infectadas do hospedeiro. Dentre estas, a glicoproteína E2 é responsável pela adsorção do vírus a receptores específicos nas células. Seus epítomos possuem uma região de hipervariabilidade ou *Hot Spot* responsáveis pela alta frequência de mutações e recombinações genéticas (BAKER 1995, DONIS 1995, LINDENBACH et al., 2007).

Existem dois grupos antigênicos distintos de BVDVs a partir de isolados de campo, BVDV-1 e BVDV-2 (DONIS, 1995, RIDPATH, 2010). Um grupo atípico nomeado como ‘*HoBi*’-likevírus ou BVDV-3 (LIU et al., 2009) também vêm sendo relatado e está associado a doença clínica em bovinos (DECARO et al., 2011; WEBER et al., 2014a). Com base no efeito de replicação em cultivos celulares, BVDV também é classificado em dois biótipos: citopático (*cytopathic* - CP) e não-citopático (*non cytopathic* - NCP) (GILLESPIE; BAKER; McENTEE, 1960). O vírus CP provoca extensos danos nas células do cultivo entre 48 a 72 horas, enquanto os isolados NPC causam pouca ou nenhuma mudança na morfologia celular. Além disso, os biótipos NPC constituem a maioria dos isolados de campo e estão associados às infecções naturais, enfermidades entéricas, reprodutivas, congênitas.

No Brasil, existem diversas pesquisas que demonstraram a disseminação do BVDV entre os estados brasileiros desde o seu primeiro relato em 1968 (CORREA et al., 1968). Weber et al. (2014c) relataram que a infecção em bovinos é endêmica e

representa cerca de 22-67% dos animais e 43-90% dos rebanhos. Contudo, a percentagem de animais soropositivos varia de acordo com localização e o tipo de exploração, e o impacto de outras espécies animais na epidemiologia do BVDV no Brasil ainda é desconhecido. No estado de São Paulo, estima-se que a prevalência para o BVDV varia entre 35 e 86,4% (LANGONI et al., 1995; ALEXANDRINO et al., 2011).

A diversidade genética observada é refletida na presença dos genótipos BVDV-1, BVDV- 2 e BVDV-3 '*Hobi*' – *like*. Bianchi et al. (2011) e Weber et al. (2014b) encontraram semelhantes distribuições do BVDV-1 e BVDV-2 no Brasil, com frequências que variaram de 40-57% e 42-45%, respectivamente. Em relação ao BVDV-3 pouco se sabe. É importante ressaltar que os genótipos brasileiros do BVDV-2 são geneticamente distintos dos norte-americanos, europeus, asiáticos e australianos, que frequentemente são utilizados como cepas de vacinas e de referência para testes de soroneutralização (WEBER et al., 2014c).

O BVDV pode ser transmitido pelas vias horizontal e vertical. A infecção pelo BVDV NCP em fêmeas prenhas imunossuprimidas no início da gestação, por volta de 40 a 142 dias, sofrem infecção fetal em 100% dos casos e originam bezerros imunotolerantes e persistentemente infectados - PI (Figura 1). Além disso, a infecção fetal pode promover malformações congênitas múltiplas no sistema nervoso central, morte fetal, abortamento em qualquer período da gestação, mumificação, retardo no crescimento fetal, nascimento de bezerros fracos e debilitados (LINDBERG, 2003).

O PI é a principal fonte de infecção no rebanho (FLORES, 2012) porque não apresentam ACs ou doença clínica ao nascimento. Estes animais podem desenvolver a Doença das Mucosas quando infectados pelo biótipo CP, geralmente fatal ao redor de seis a 18 meses de idade (LINDBERG, 2003). Além disso, foi observada maior incidência (48%) de doenças respiratórias dentre os bezerros PI (LONERAGAN et al., 2005; RIDPATH, 2010), sendo que no Brasil a prevalência de animais PI nos rebanhos é de cerca de 1,2% (OLIVEIRA, 1996).

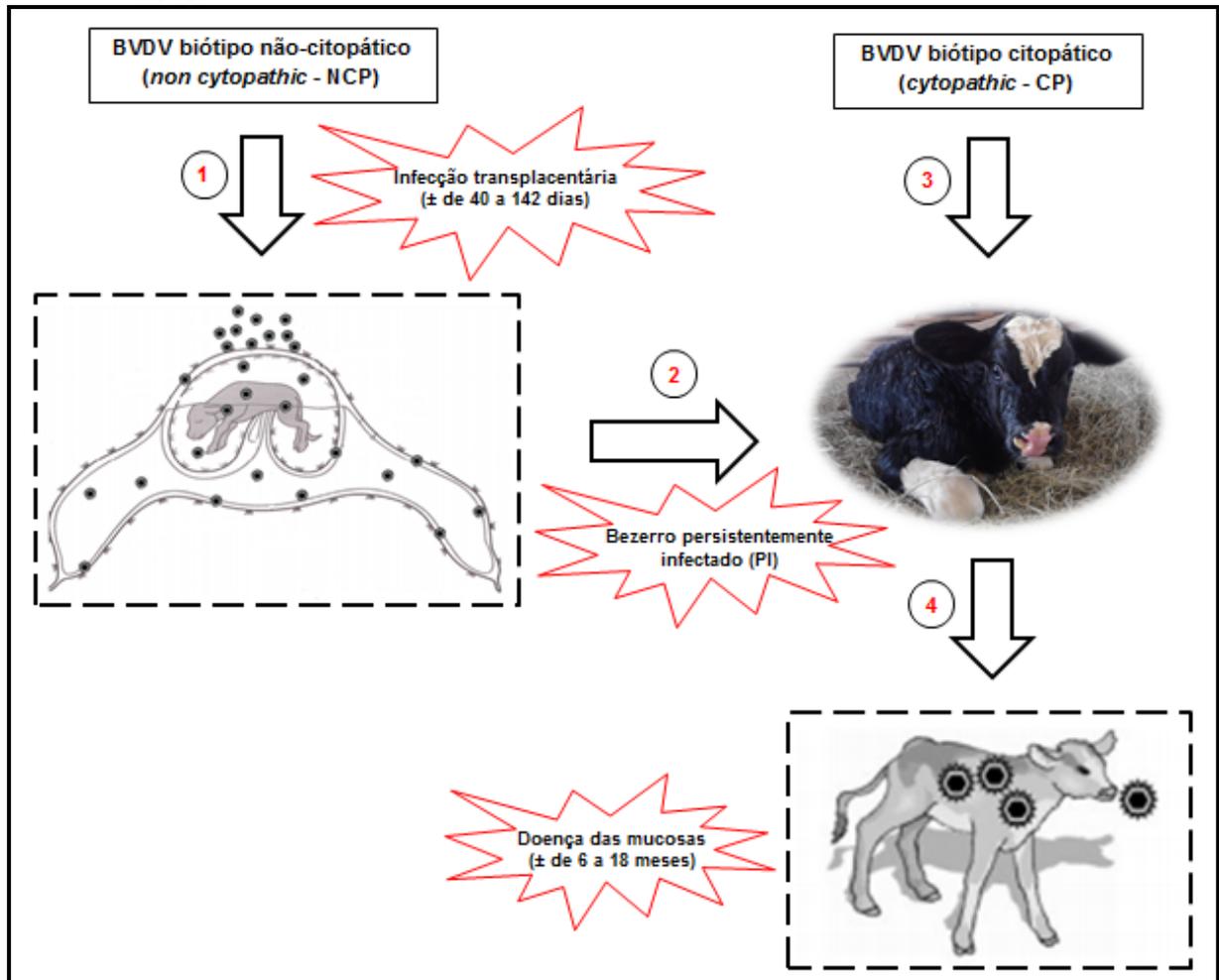
PI's eliminam o BVDV ao longo da vida. Arenhart et al. (2009) demonstraram que bezerros PI apresentaram viremia contínua em níveis médios a altos durante 150 dias de avaliação pós-desmame. Durante este período, o vírus foi continuamente excretado em secreções, observando-se maiores títulos nas secreções nasais e oculares. Nesta pesquisa também verificaram que a excreção viral por PI introduzido em grupo de 10 animais mantidos sob manejo intensivo proporcionou uma rápida

transmissão a todos os contactantes (30 dias). Sob condições extensivas, a transmissão foi mais lenta (100 dias), mas atingiu grande parcela dos animais (37/48).

As infecções pós-natais por BVDV em bovinos imunocompetentes são denominadas transitórias, e a gravidade das manifestações clínicas depende da estirpe viral infectante. A maioria das infecções transitórias em bovinos soronegativos ao BVDV parece cursar na forma inaparente à branda (AMES, 2005), devido à rápida produção de ACs neutralizantes. Doença branda é manifestada por hipertermia, leucopenia, e diminuição da produção de leite (MOERMAN, 1994).

Infecções sintomáticas são mais comumente observadas em bezerros que foram privados de colostro; bovinos com baixas concentrações de ACs maternos; ou em animais infectados por uma estirpe de BVDV heterólogo. As manifestações clínicas nestes animais incluem hipertermia, letargia, leucopenia, secreção ocular e nasal, úlceras e erosões orais, encurtamento das papilas bucais, diarreia e diminuição da produção de leite. Estirpes de BVDV mais virulentas podem também causar erosões epiteliais nos espaços interdigitais, bandas coronárias, tetos ou vulva (EVERMANN; BARRINGTON, 2005), além dos quadros severos da Síndrome Hemorrágica (RIDPATH et al., 2000; LIEBER-TENORIO; RIDPATH; NEILL, 2003).

Figura 1 – Esquema de infecção fetal pelo Vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) e formação de bezerros persistentemente infectados (PI) e com Doença das mucosas. – São Paulo – 2015.



Fonte: adaptado de: Prestes e Landim-Alvarenga (2006); Tizard (2008) e Chase et al. (2015), por Silva, B. T. (2015)

Animais transitoriamente ou PI pelo BVDV apresentam imunodepressão e susceptibilidade à DRB e outras doenças, pois suprime o número e a função de vários componentes do sistema imune inato e adaptativo (CHASE; ELMOWALID; YOUSIF, 2004).

Neutrófilos infectados por BVDV apresentaram comprometimento de suas atividades microbicida, quimiotática, e citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos (POTGIETER, 1995). Monócitos podem sofrer apoptose, que impacta na redução de 30-70% do número dessas células (LAMBOT et al., 1997; ARCHAMBAULT et al., 2003; GLEW et al., 2003). Macrófagos infectados apresentaram reduzida capacidade de fagocitar bactérias patogênicas e fungos;

contudo, a inibição funcional significativa foi induzida apenas pelas estirpes virulentas de BVDV (CHASE; ELMOWALID; YOUSIF, 2004).

A apresentação de antígenos pelas APCs infectadas encontra-se reduzida devido a diminuição na expressão dos receptores Fc e C3, e pela regulação negativa das principais moléculas do Complexo de Histocompatibilidade II e proteínas B7 (WELSH; ADAIR; FOSTER, 1995; ADBLER et al., 1997; ARCHAMBAULT et al., 2003; CHASE; ELMOWALID; YOUSIF, 2004). Estes eventos serão refletidos na resposta imune adaptativa.

O BVDV é linfotrópico e causa depleção linfocitária nos órgãos linfoides, assim animais infectados apresentam leucopenia por linfopenia (BRODERSEN; KELLING, 1999; ARCHAMBAULT et al., 2003). Das subpopulações de linfócitos T, a redução mais drástica é observada nas células T citotóxicas CD8<sup>+</sup>, seguidas pelas células T auxiliares CD4<sup>+</sup>, e uma pequena redução das células T  $\gamma/\delta$  circulantes (ELLIS et al., 1988). Isolados virulentos de BVDV podem causar reduções na expressão das moléculas de MHC I das células infectadas, afetando assim a função citotóxica das células CD8<sup>+</sup>, contudo, essa redução parece ser estirpe-dependente (CHASE; ELMOWALID; YOUSIF, 2004). Além de depleção linfocitária, alterações funcionais de células T CD4<sup>+</sup> são pronunciadas, e a infecção pelo biótipo NCP pode resultar em predomínio de resposta Th2. Assim, pode-se observar reduzida resposta mediada por células e níveis de imunidade humoral exacerbada (COLLEN; MORRISON, 2000; WALDVOGEL et al, 2000; COLLEN et al, 2002).

A resposta imune humoral à infecção por BVDV depende, em grande parte, na quantidade de anticorpos neutralizantes séricos e na relação antigênica da estirpe infectante com aquela que o hospedeiro foi exposto, embora a imunidade cruzada possa ser conferida por meio de vacinação com estirpes heterólogas (FULTON; BURGE, 2000; FULTON et al., 2003). Em animais imunocompetentes, há formação de anticorpos entre duas a três semanas após a infecção. Estes anticorpos circulantes são capazes de neutralizar o vírus e impedir que alcance os órgãos-alvo e ao feto (BROWNLIE, 2002). Em contrapartida, fetos PI incorporam erroneamente proteínas virais como sendo próprias do organismo, e então o sistema imune do hospedeiro não forma anticorpos contra BVDV (FLORES et al., 2005).

Além dos status imune do hospedeiro, o biótipo infectante e sua variação genotípica podem determinar a virulência e antigenicidade da estirpe, resultando em doença severa. Os vírus do genótipo BVDV-1 são responsáveis por infecções de

caráter brando a moderado, além disso abrangem a maioria das cepas vacinais e das estirpes de referência usadas nos testes de soroneutralização. Em contrapartida, BVDV-2 tem sido associado com surtos de BVD aguda e doença hemorrágica no Canadá, em 1993 e 1994, entretanto, é válido ressaltar que esse grupo antigênico também contempla isolados de baixa ou moderada virulência (PELLERIN et al., 1994; CARMAN et al., 1998; CORAPI et al., 1990; FLORES et al. 2005). O BVDV-3 ou *'Hobi'-like* está ainda sobre o âmbito da investigação epidemiológica e patológica, mas parece estar relacionado a doença reprodutiva branda (BAUERMANN et al., 2013).

### 2.3 HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 1 (BoHV-1)

O Herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) é pertencente à família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*, e gênero *Varicellovirus*. A partícula viral tem entre 70 a 110 nm de diâmetro e é constituída por um capsídeo icosaédrico, envelope glicoproteico e genoma DNA linear de fita dupla (FENNER, 1987).

O envelope viral é composto por dez glicoproteínas, denominadas gB, gC, gD, gE, gI, gH, gL, gG, gK e gM (SCHWYZER; ACKERMANN, 1996). As glicoproteínas gB, gC, e gD possuem grande potencial imunogênico, devido a sua localização e função biológica, e estão envolvidas na adsorção e fusão celular (gB, gC e gD) e penetração (gB e gD) do BoHV-1 em células hospedeiras (LI et al., 1995; METTENLEITER, 2002).

O BoHV-1 exibe capacidade de permanecer em latência nos gânglios nervosos do hospedeiro (ACKERMANN et al., 1982, STRAUB, 1991). Em situações de susceptibilidade, a proteína timidina kinase (constituente do BoHV-1) participa do processo de reativação do vírus em estado de latência (SCHWYZER; ACKERMANN, 1996).

No Brasil, o primeiro relato da infecção por BoHV-1 foi registrado por Galvão, Dolia e Alice (1962) na Bahia, sendo o vírus isolado pela primeira vez por Alice em 1977 nesse Estado (ALICE, 1978). Okuda et al. (2006), apresentou dados do Laboratório de Viroses de Bovídeos do Instituto Biológico obtidos no período de janeiro de 1999 a abril de 2005, em rebanhos leiteiros e de corte de diversos

Estados brasileiros, dos quais cerca de 51,1% (18.855/36.885) dos animais eram sororeagentes, por meio da soroneutralização. Desde então, vários estudos sorológicos revelaram uma prevalência variável de animais portadores de anticorpos entre 6,86% e 86,8% na pecuária de corte e leite, respectivamente (SANTOS SILVA et al., 2015).

A transmissão do BoHV-1 pode ocorrer por inalação de aerossóis contaminados ou por contato direto com secreções nasais de animais infectados. Ambas as formas de transmissão são consideradas importantes na disseminação do vírus em rebanhos criados em confinamento (VAN DONKERSGOED; BABIUK, 1991). A transmissão indireta ocorre principalmente pela ingestão de água e alimentos contaminados ou pelo uso de vaginas artificiais contaminadas durante a coleta de sêmen (ENGELS; ACKERMANN, 1996). Outra forma de transmissão é a venérea, pela monta natural e/ou inseminação artificial (IA) devido ao contato com o sêmen (PHILPOTT, 1993).

As manifestações clínicas apresentadas pelos animais infectados dependem dos genótipos do BoHV-1, classificados em subtipos 1 (BoHV-1.1), 2a (BoHV-1.2a) e 2b (BoHV-1.2b) (METZLER et al., 1985; METZLER; SCHUDEL; ENGELS, 1986; MUYLKENS et al., 2007; ROBINSON et al., 2008). Isolados de BoHV-1.1 estão relacionados com casos de abortamentos, conjuntivite, mas principalmente Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR) (EDWARDS et al., 1990, SOUZA et al., 2002). BoHV-1.2a e BoHV-1.2b estão associados a uma grande variedade de manifestações clínicas vinculadas ao sistema reprodutivo, mais comumente vulvovaginite/balanopostite pustular infecciosa (IPV/IPB); entretanto, somente o subtipo BoHV-1.2a causa abortamentos, principalmente em fêmeas com idade gestacional superior a seis meses (VAN OIRSCHOT, 1995).

As principais manifestações clínicas observadas em bezerros estão vinculadas ao trato respiratório devido à patogênese viral que inclui a mucosa respiratória como a principal via de propagação direta do BoHV-1 (WINKLER et al., 2000), além do nervo trigêmeo (HOMAN; EASTERDAY, 1980). Manifestações clínicas também foram observadas na cavidade oral, esofágica e ruminal, bem como em fígado, rins, e baço (OBI et al., 1981; ROSS et al., 1983; HIGGINS; HILL et al., 1984; EDWARDS, 1986; BRYAN et al., 1994; PENNY et al., 2002). Enterite e encefalite, também foram relatadas com este agente viral (HIGGINS; HILL et al., 1984; EDWARDS, 1986; BRYAN et al., 1994).

Moeller et al. (2013) demonstraram quadro sistêmico causado pelo BoHV-1 em bezerros recém-nascidos por meio de exames histopatológicos. Cerca de 2,08% (62/2980) dos bezerros avaliados entre 1-30 dias de idade apresentaram lesões compatíveis com infecção pelo Herpesvírus Bovino tipo 1 no exame histopatológico. A média e mediana da idade dos bezerros acometidos foi de 14 dias de idade. As lesões encontradas nos órgãos de acordo com o número de animais afetados foram glândula adrenal (54), fígado (18), pulmões (15), rim (8), intestino delgado (7), intestino grosso (7), rúmen/omaso (7), traquéia/laringe (3), abomaso (2), coração (1), esôfago (1), timo (1), e linfonodo (1). As lesões que se apresentaram sugestivas de infecção por BoHV-1, foram confirmadas pela imunohistoquímica com anticorpo policlonal específico.

A forma respiratória é caracterizada por aumento da temperatura corporal, hiperemia das mucosas, rinite, dispnéia, corrimento nasal seroso, lesões erosivas na mucosa nasal e, ocasionalmente, pneumonia. A taxa de mortalidade é baixa mas podem ocorrer complicações em decorrência de infecções bacterianas secundárias ou de outras infecções virais superpostas (KAHRS, 1977; WYLER et al., 1989).

Em fêmeas, a forma genital manifesta-se clinicamente pelo aparecimento de pequenas vesículas de 1 a 2 mm de diâmetro que evoluem para pústulas e erosões localizadas na vulva e vagina. O epitélio vulvar apresenta-se edemaciado, hiperêmico e com secreção que pode tornar-se mucopurulenta devido à contaminação bacteriana secundária. Em touros, lesões similares são encontradas no prepúcio e pênis (GIBBS; RWEYEMANN, 1977; WYLER et al., 1989).

IBR e IPV não são as únicas formas de manifestação clínica das infecções pelo BoHV-1. Tanto em rebanhos de corte quanto de leite também podem ocorrer quadros clínicos de conjuntivite, enterite, encefalite e distúrbios reprodutivos. Estes são caracterizados por mortalidade embrionária precoce e/ou tardia, com repetições deaios a intervalos regulares e/ou irregulares; mortalidade fetal com abortamento; natimortos; mortalidade neonatal e infertilidade (KARHS, 1977; STRAUB, 1991).

As respostas imunes primárias ao BoHV-1 ocorrem em resposta os principais epítomos presentes no capsídeo (gB, gC e gD), que estimulam os linfócitos T auxiliares CD4<sup>+</sup> (LEARY; SPLITTER, 1990B), enquanto gC e gD são potenciais alvos para atividade citotóxica de CD8<sup>+</sup> (DENIS et al.; 1993).

As respostas dos anticorpos neutralizantes para o BoHV-1 são considerados mais importante na prevenção de uma infecção do que na recuperação, visto que a

presença do anticorpo não evita a disseminação do vírus célula a célula, pois o mesmo se dissemina via pontes intracelulares. Além disso, as respostas de anticorpos se tornam detectáveis apenas quando a recuperação da infecção pelo vírus já está em curso. Por outro lado, em casos de reativação viral ou reinfeção, os anticorpos atuam neutralizando vírus extracelulares e impedindo sua disseminação (PASTORET et al., 1979), e podem interagir com outros mecanismos, como as PMN (BIELEFELDT-OHMANN, BABIUK; HARLAND 1991;. MCCUIRE; BABIUK,1984) e o complemento (ROUSE; BABIUK, 1977). Além disso, animais previamente infectados podem proteger seus conceptos via colostro (LEVINGS; ROTH, 2013).

O BoHV-1 pode ainda promover a imunodepressão no hospedeiro diminuindo a expressão do MHC e apresentação de antígenos, além de promover morte das células T citotóxicas. Estes mecanismos favorecem a proliferação viral e reativação do vírus em latência. Assim, os agentes bacterianos secundários contribuem para o estabelecimento da DRB (LEVINGS; ROTH, 2013).

## 2.4 VÍRUS RESPIRATÓRIO SINCICIAL BOVINO (BRSV)

O vírus Respiratório Sincicial Bovino (BRSV) tem sido reconhecido como um dos principais patógenos responsáveis por uma síndrome respiratória aguda em bezerros desde a década de 70 (PACCAUD; JACQUIER, 1970; WELLEMANS; LEUNEN; LUCHSINGER, 1970).

BRSV é um vírus envelopado de RNA, não segmentado, de cadeia negativa, que pertence a família *Paramyxoviridae*, subfamília *Pneumovirinae*, gênero *Pneumovirus*. O tamanho varia de 35 a 150 nm de diâmetro, mas pode alcançar uma forma filamentosa com um diâmetro entre 60 e 100 nm (VALARCHER; TAYLOR, 2007). A partícula viral do BRSV é um invólucro lipídico que contém três glicoproteínas de superfície (glicoproteína [G], proteína de fusão [F] e uma pequena proteína hidrofóbica [SH]). O envelope engloba um nucleocapsídeo helicoidal composto por nucleoproteína (N), fosfoproteína (P), proteína polimerase dependente de RNA viral (L). Além dessas proteínas, há uma matriz protéica composta por três formas (M, M2.1 e M2.2) e duas proteínas não estruturais NS1 e NS2. Estas

proteínas não estruturais são importantes na resistência aos interferons  $\alpha$  e  $\beta$  (VALARCHER; TAYLOR, 2007)

O vírus bovino possui similaridades com o vírus humano, Vírus Sincicial Respiratório (RSV). O vírus humano é a causa mais importante de doença pulmonar infecciosa em crianças com idade inferior a dois anos de idade, bem como em idosos e imunocomprometidos (FALSEY, 2007; VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK et al., 2007).

No Brasil, o BRSV foi detectado pela primeira vez a partir de tecidos de pulmão de bezerros abatidos no Rio Grande do Sul (GONÇALVES et al., 1993). Desde então, pesquisa de soroprevalência (CAMPALANS; ARNS, 1997) demonstraram 68% de reagentes em 864 amostras provenientes de 65 fazendas localizadas no sul do Brasil. Em pesquisa de Affonso (2013), foram encontradas 79,49% de animais reagentes em 26 rebanhos bovinos estudados no Estado de São Paulo. Neste estudo, as elevadas prevalências de BRSV foram associadas a presença do BoHV-1 e BVDV, o que dificultaram a determinação dos fatores de risco envolvidos na sua disseminação.

A maneira mais comum de transmissão do BRSV é direta, e ocorre pelo contato entre infectado e contactantes. A transmissão ocorre principalmente devido as partículas virais presentes nas descargas nasais. As manifestações clínicas geralmente são observadas em bezerros com idade inferior a seis meses. Em regiões não endêmicas, bovinos adultos podem ser infectados, mas geralmente a doença é menos grave do que nos animais mais jovens (TAYLOR et al., 2005; HÄGGLUND et al., 2006). A infecção é caracterizada por febre, anorexia, depressão, tosse, aumento da frequência respiratória, e na maioria dos casos graves, dispnéia e sibilos. Lesões macro e microscópicas revelam grandes áreas de consolidação pulmonar, enfisema, bronquiolite e pneumonia intersticial. Na infecção pelo BRSV, a extensão do dano pulmonar não está relativamente correlacionada com a duração relativamente curta da infecção viral, 3-4 dias, ou limitada distribuição do vírus no organismo (GERSHWIN et al., 2008).

A interação inicial do BRSV com as células do sistema imune inato desencadeiam o processo da doença e estimulam o início da resposta imune adaptativa. As células dendríticas representam o ponto crítico para a modulação da resposta imune ao BRSV predominantemente Th2, cuja capacidade para produção de IL-12 não é suficiente para iniciar a proliferação de células Th1 (GERSHWIN et al.,

2008). Estudos com RSV em humanos demonstraram que a interação entre o vírus e as células dendríticas pulmonares resultou na redução da capacidade em produzir citocinas anti-virais que estimulam uma resposta de células T (BUENO et al., 2008). Assim, a remoção de células hospedeiro infectadas por BRSV é fraca e transitória ao contrário da maioria das viroses (GADDUM et al., 1996; WOOLUMS et al., 2004). Alguns estudos com RSV humano demonstraram que a resposta de células T citotóxica pode ser bloqueada pela produção de citocinas Th2 (BUENO et al., 2008), e que este fato também se aplica ao BRSV (GERSHWIN et al., 2008).

## 2.5 VÍRUS DA PARAINFLUENZA BOVINA TIPO 3 (BPIV-3)

BPIV-3 foi isolado pela primeira vez, nos Estados Unidos, a partir de secreção nasal de bezerros com o quadro denominado “febre do transporte” (ANDREWES; BANG; BURNET, 1955). O vírus é membro da família *Paramyxoviridae*, subfamília *Paramyxovirinae*, gênero *Respirovirus* (FAUQUET et al., 2005).

Como outros Paramixovírus, BPIV-3 consiste em uma partícula viral filamentosa de 150-200 nm, com nucleocapsídeo do tipo “espinha de peixe”, rodeado por um envelope lipídico com fragmentos de glicoproteínas específicas do vírus. O nucleocapsídeo é composto pelo genoma, um RNA de cadeia simples, de polaridade negativa, e é firmemente revestido com a proteína da nucleocapsídeo (NP). O nucleocapsídeo também contém duas outras proteínas que se apresentam em aglomerados, a fosfoproteína (P) e a proteína “grande” (L) (HAMAGUCHI et al., 1983). A proteína NP, em conjunto com as proteínas P e L, são sempre encontradas em um complexo e compreendem a RNA-polimerase viral, que é essencial para a transcrição de RNA mensageiro (RNAm) viral e replicação do RNA genômico. A matriz não glicosilada, ou proteína M, é a mais abundante proteína viral presente nas células infectadas (TAKIMOTO; PORTNER, 2004).

No momento, três genótipos A, B e C foram descritos para o BPIV-3 de acordo com análises genéticas e filogenéticas (HORWOOD, GRAVEL, MAHONY, 2008; ZHU et al., 2011; MAIDANA et al., 2012; OEM et al., 2013). A pesquisa de Neill, Ridpath e Valayudhan (2015), sugere que existem diferenças significativas nas características antigênicas entre os genótipos do BPIV-3, e que, portanto, a

presença de somente o genótipo BPIV-3A em vacinas comerciais, deve ser reconsiderado, pois não se sabe se há proteção cruzada entre os genótipos.

O primeiro isolamento do BPIV-3 no Brasil ocorreu em São Paulo, em 25 amostras de pulmão de bovinos com lesões pneumônicas coletadas em abatedouros. Destas amostras foram isoladas quatro cepas do vírus, que eram antigenicamente semelhantes ao Vírus da Parainfluenza Humana (CANDEIAS; SUGAY; RIBEIRO, 1971). Sponchiado (2014) demonstrou uma prevalência para o BPIV-3 de cerca de 80,4% em rebanhos do Estado do Paraná. Esta prevalência foi próxima aos resultados de 84,1% obtidos no estado de São Paulo (CANDEIAS; RIBEIRO, 1970) e dos 82% obtidos na espécie ovina na microrregião de Botucatu-SP (GONÇALVES et al., 2011). Este estudo determinou ainda a partir das amostras estudadas, prevalência para associações virais de BPIV-3 e BRSV (37,1%) e entre BVDV, BPIV-3 e BRSV (19,5%).

A transmissão do BPIV-3 ocorre pelo contato direto dos animais não infectados com secreções nasais, oculares e aerossóis de bovinos infectados. A infecção pelo BPIV-3 se caracteriza por uma variedade de manifestações clínicas inerentes a DRB. Além disso, o comum envolvimento de múltiplos patógenos na DRB dificulta a apresentação de manifestações específicas à infecção somente por BPIV-3 (ELLIS, 2010).

Alguns dos animais infectados apresentam dispnéia, tosse, descarga nasal serosa ou mucopurulenta, lacrimejamento, conjuntivite, inapetência e temperatura elevada, sinais típicos da febre do transporte. Em desafios experimentais, bezerras manifestam a doença complica febris (4-5 e 7-10 dias pós-infecção), lacrimejamento, descarga nasal serosa abundante, depressão, dispnéia e tosse. Muitos animais exibem manifestações clínicas brandas, recuperando-se em poucos dias. Entretanto, a infecção pode resultar em pneumonia intersticial, afetando geralmente os lobos pulmonares anteriores (KAPIL; BARBARA, 1997).

Em estudo de Frank e Marshall (1971), os anticorpos neutralizantes contra BPIV-3 no soro de bovinos infectados perduraram por 3 a 5 meses, enquanto que os anticorpos em secreções nasais se apresentaram em baixas concentrações ou foram indetectáveis de 6 a 8 semanas pós infecção. Com a reexposição ao vírus, a resposta imune humoral permitiu detecção de títulos elevados de anticorpos em soro e mucosa nasal, sendo que os anticorpos da mucosa perduraram por um período de 5 meses, enquanto as concentrações no soro permaneceram elevadas por longo

período (FRANK; MARSHALL, 1971). Bezerros com altas concentrações de anticorpos em mucosas e baixas concentrações de anticorpos séricos foram protegidos da doença clínica após o desafio experimental, em contrapartida, elevadas concentrações de anticorpos no soro e baixas em mucosas não garante proteção (GATES et al., 1970). Dessa forma, concluiu-se que as concentrações de anticorpos nas mucosas estão mais associadas com a prevenção e redução da doença ou prevenção da infecção, enquanto os anticorpos séricos desempenham um papel na redução da gravidade da doença quando manifestada (GATES et al., 1970; FRANK; MARSHALL, 1971). Um estudo (TOTH; FRANK, 1988) relata ainda o reconhecimento de proteínas, com pesos moleculares consistente com HN, F, e NP, por anticorpos presentes no soro de bezerros após exposição experimental por aerossol de BPIV-3. A resposta imune celular ao BPIV-3 ainda é pouco conhecida nos bovinos (KAPIL; BARBARA, 1997).

Resposta linfoproliferativa vírus-específica e inibição da migração de leucócitos foram demonstrados em células de bovinos infectados com BPIV-3 (MORENO-LOPEZ, 1977; JOHNSON; MOREIN, 1977). Extrapolando-se resultados do vírus Sendai (mPI<sub>1</sub>V) como modelo de resposta imune celular para o BPIV-3, pode-se observar que a depleção de células T CD4<sup>+</sup> inibe a produção de anticorpos, mas apenas no “pool” marginal, novamente sugerindo um papel crítico das células T citotóxicas na recuperação da infecção (HOU et al., 1992). Em humanos, acredita-se que as células T citotóxicas CD8<sup>+</sup> possam ser específicas para proteínas internas do hPIV3, conferindo uma proteção mais fraca e menos duradoura que a resposta por anticorpos contra as glicoproteínas. Assim, os anticorpos presentes na secreção e células T citotóxicas, provavelmente conferem uma proteção incompleta e pouco duradoura contra reinfecção, enquanto anticorpos neutralizantes do soro promovem efeitos de proteção em longo prazo no trato respiratório inferior (TAO et al., 2000).

## 2.6 DESENVOLVIMENTO DA RESPOSTA IMUNE DO RECÉM-NASCIDO

O desenvolvimento do sistema imune do feto bovino ocorre durante o período gestacional e, portanto particularidades inerentes a esse período podem influenciar seu desenvolvimento imunológico (TIZARD, 2008).

O sistema imune materno ao interagir com o feto produz citocinas vinculadas à resposta imunológica do tipo Th1, responsáveis por inflamação e necrose das células do trofoblastos que originarão a placenta. Dessa forma, a intensificação da resposta Th2 ocorre para a supressão da Th1 (WEGMANN et al., 1993). Alguns autores acreditam que estas citocinas podem ser transferidas da mãe ao feto durante a gestação e suprimir a resposta Th1 dos recém-nascidos tornando-os susceptíveis aos agentes virais e demais patógenos intracelulares (CHASE; HURLEY; REBER, 2008).

As células participantes dos mecanismos de imunidade inata e específica são originadas de uma mesma célula tronco hematopoiética e pluripotente. A formação inicia-se com o desenvolvimento do timo aos 41 dias de gestação, seguido dos linfócitos sanguíneos (45 dias), medula óssea e baço (56 dias), IgM positivo (59 dias), linfonodos (60 dias), sistema complemento (90 dias), granulócitos (110 dias), IgG sérica (135 dias), tonsilas (155 dias) e placas de Peyer (175 dias) (TIZARD, 2008).

As células B surgem após a formação e desenvolvimento do baço e linfonodos, e a capacidade de produzir anticorpos aumenta com a maturação dos órgãos do sistema imune. Os linfócitos sanguíneos possuem capacidade em responder aos patógenos aos 75 a 80 dias da gestação (TIZARD, 2008).

As células fagocitárias, tais como neutrófilos e macrófagos, garantem mínima proteção no início da vida fetal, pois permanecem por muito tempo na medula óssea para proliferação e diferenciação, sendo liberadas para a circulação sanguínea após 130 dias de gestação (BARRINGTON; PARISH, 2001). Esse sistema é capaz de realizar a opsonização e fagocitose semelhante ao sistema imune do adulto, apesar de o nível sanguíneo das células estarem em baixa quantidade no feto (TIZARD, 2008).

O ambiente feto-placentário dos ruminante é estéril e impermeável aos microrganismos, sendo assim os recém-nascidos apresentam sistema imune virgem. Em contrapartida, a placenta do tipo sineptélicorial impede a passagem de anticorpos durante a gestação (BARRINGTON; PARISH, 2001, CORTESE, 2009). O amadurecimento do sistema imune inicia-se após nascimento com a sua exposição aos microrganismos ambientais, sendo inicialmente lenta e de baixa intensidade (CORTESE, 2009).

Os elevados níveis de cortisol da vaca e feto resultam em leucograma de estresse ao nascimento, caracterizado por leucocitose por neutrofilia e linfopenia nos primeiros quatro dias de vida (NOVO et al., 2015). O cortisol também possui efeitos na atividade dos fatores do sistema complemento, diminuição da atividade funcional das células NK, menor proporção de células dendríticas, e diminuição da atividade fagocítica dos macrófagos e neutrófilos (BARRINGTON; PARRISH, 2001).

O bezerro recém-nascido apresenta predomínio da subpopulação de linfócitos  $TCR\gamma\delta^+$  (25%), em relação ao  $CD8^+$  (10%) e  $CD4^+$  (20%). Linfócitos B representam apenas 4% dos linfócitos circulantes ao nascimento. Com o desenvolvimento do bezerro, observa-se diminuição da população de células  $TCR\gamma\delta^+$  e aumento dos linfócitos B. Proporções de células semelhantes ao bovino adulto são atingidas apenas na puberdade (KAMPEN et al., 2006).

Diante do cenário exposto, pode-se afirmar que a assistência imunológica é essencial para garantir a sobrevivência dos bezerros.

## 2.7 IMUNIZAÇÃO BEZERROS

A primeira e principal forma para prevenir as doenças em bezerros é o fornecimento do colostro rico em componentes biológicos ativos, tais como fatores imunológicos, nutricionais, hormonais e de crescimento (BARRINGTON; PARRISH, 2001; ELFSTRAND et al., 2002).

A imunoglobulina G1 (IgG1) representa aproximadamente 90% das IgGs do colostro (ELFSTRAND et al., 2002), e protegem o recém-nascido por mecanismo de citotoxicidade celular mediada por anticorpos (BIBURGER; LUX; NIMMERJAHN, 2014). A estimativa dos teores de Igs do colostro pode ser realizada por meio de colostrômetro (MECHOR; GRÖHN; VAN SAUN, 1991) e/ou refratrômetro Brix (QUIGLEY et al., 2013). É recomendado teores de Igs acima de 50 g/L (GODDEN, 2008) ou índice Brix superior a 21% (QUIGLEY et al., 2013). Gomes et al. (2010) verificou concentrações de Igs presentes no colostro de vacas da raça Holandesa de primeira ordenha eram de 10.078; 413,8 e 625 mg/dL, respectivamente para as classes G, A e M de Igs.

Concentrações séricas inferiores a 1000 mg/dL de IgG em recém-nascidos caracterizam a falha na transferência de imunidade passiva (FTIP). Nos Estados Unidos, a FTIP ocorre principalmente pela baixa qualidade do colostro, sendo que 60% apresentam valores de IgG inferior ao mínimo desejado (5.000 mg/dL) (MORRIL et al., 2012). No Brasil, sabe-se que 30% das bezerras Holandesas apresentam FTIP (FEITOSA, 2010).

A colostragem deve ser realizada imediatamente após o nascimento pelo fornecimento mínimo de três litros de colostro, completando-se o volume final (8-10% do peso vivo) até as primeiras 12 horas de vida (DAVIS; DRACKLEY, 1998). Vale lembrar que a permeabilidade do epitélio intestinal a macromoléculas em bovinos ocorre entre as primeiras 18-24 horas de vida (GODDEN, 2008).

A administração do colostro pode ser realizada por meio de amamentação natural, mamadeira ou sonda esofágica (BESSER; GAY; PRITCHETT, 1991; ELIZONDO-SALAZAR; JONES; HEINRICHS, 2011). Contudo, a amamentação natural apresenta desvantagem em relação ao controle do volume e qualidade do colostro ingerido e pode resultar em FTIP em até 61% dos bezerros. Esta taxa de FTIP pode ser reduzida utilizando-se mamadeira (19,3%) e sonda esofágica (10,8%) (BESSER et al., 1991; ELIONDO-SALAZAR et al., 2011).

Mundialmente estudos têm demonstrado a transferência de imunidade passiva para os agentes virais envolvidos na DRB, entretanto as concentrações de anticorpos maternos específicos para as viroses respiratórias diminuí ao longo do tempo tornando as bezerras susceptíveis à essa enfermidade (KIMMAN et al., 1987; RIDPATH, 2003; ENDSLEY et al., 2004; DONOVAN et al., 2007; KIRKPATRICK et al., 2008; GATTI et al., 2010; ELLIS et al., 2010, BACCILI, 2013; ELLIS, et al., 2014; GOMES et al., 2014). Assim, a vacinação precoce dos bezerros deveria ser considerada no sistema de criação.

A problemática se encontra no momento ideal para o fornecimento de imunidade ativa aos bezerros que ainda possuem títulos de anticorpos remanescentes, pois esses anticorpos podem reagir aos antígenos vacinais e serem bloqueados (MENANTEAU-HORTA et al., 1985; KAEBERLE; SEALOCK; HONEYMAN, 1998; WEST et al., 2000; ELLIS et al., 2001; ENDSLEY et al., 2003; FULTON et al., 2004; KERKHOLFS et al. 2004; MAWHINNEY; BURROW, 2005; PLATT et al., 2009; WOOLUMS et al., 2013; WINDEYER et al., 2015). Ainda assim, outras pesquisas demonstraram que a vacinação precoce promoveu um decréscimo

mais lento nos níveis de anticorpos maternos circulantes (MUÑOZ-ZANZI et al., 2002; FULTON et al., 2004).

Outro âmbito da pesquisa internacional aborda o estímulo dos linfócitos e conseqüentemente da resposta Th1, apesar do aparente déficit da imunidade humoral (LEMAIRE et al., 2000; ENDSLEY et al., 2003; SLUIJS; KUHN; MAKOSCHEY, 2010).

Em território brasileiro, as limitações apresentadas à respeito da vacinação precoce dos bezerros para a DRB é agravada visto que o uso de vacinas vivas para o BVDV não é permitido (FLORES et al., 2005). A comercialização das vacinas intranasais, compostas por cepas de BVDV vivas e atenuadas, poderiam estimular resposta imune de mucosas sem influência dos anticorpos maternos (ENDSLEY et al., 2003; RIDPATH et al., 2003). O cenário brasileiro impossibilita o uso das informações geradas em outros países devido às diferentes imunogenicidades induzidas pelas vacinas contendo o BVDV inativado ou vivo e atenuado.

Vale ressaltar que a literatura nacional utiliza em seus protocolos de vacinação as estirpes virais vivas, visto que antígenos vacinais inativados produzem uma resposta imune de baixa intensidade e curta duração (KELLING, 2004). Nesse cenário, o Brasil apresenta vacinas comerciais contendo somente antígenos vacinais inativados, devido a protocolos de biossegurança estabelecidos pelo Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Esse fato pode contribuir para respostas imunes diferenciadas quando comparadas aos estudos internacionais.

As lacunas apresentadas referentes à imaturidade imune, duração e efeito de bloqueio dos anticorpos maternos na resposta vacinal, associadas à escassez de pesquisas brasileiras motivou o desenvolvimento deste estudo.

**CAPÍTULO 1 - IMUNIDADE PASSIVA COLOSTRAL PARA AS VIROSES  
ENVOLVIDAS NA DOENÇA RESPIRATÓRIA BOVINA**

### 3 INTRODUÇÃO

Bezerros neonatos apresentam-se agamaglobulinêmicos, imaturos e imunossuprimidos ao nascimento. Em seguida, observa-se estimulação do sistema imune ocorre por microrganismos ambientais, resultando em resposta primária inicialmente lenta e de baixa intensidade (CORTESE, 2009), essa resposta aumenta gradualmente até alcançar status semelhante aos bovinos adulto na puberdade (KAMPEN et al., 2006). Durante este período de desenvolvimento, a administração de colostro pode ser fundamental para a transferência passiva de componentes imunes que possuem ação direta aos patógenos, e também participam da ativação dos linfócitos inicialmente virgem (NOVO, 2015).

O manejo do colostro contempla a avaliação da sua qualidade pela mensuração dos teores de IgG ( $\geq 5.000$  mg/dL), que deve ser fornecido nas primeiras horas de vida, período máximo 18-24 horas pós-nascimento, garantindo um volume mínimo equivalente a 8-10% peso vivo do bezerro (GODDEN, 2008). Com este protocolo, pretende-se que as concentrações séricas de proteína total e IgG, respectivamente, sejam superiores a 5,2g/dL (WEAVER et al., 2000) ou 1000 mg/dL (QUIGLEY, 2002). Os teores de IgG séricas e a sua duração estão diretamente proporcionais às concentrações de anticorpos específicos ingeridos e absorvidos a partir de colostro (MUNOZ-ZANZI et al., 2002; KIRKPATRICK et al., 2008).

A transferência de anticorpos específicos para as viroses respiratórias depende de contato prévio das vacas por exposição natural, vacinação ou ambos. Dentre estas opções, a exposição natural resulta em maiores concentrações de anticorpos específicos no colostro (GATTI et al., 2010). Os títulos de anticorpos maternos decrescem ao longo do tempo, sendo relatadas meia vida de 21, 23, 30 e 35 dias, respectivamente, para BoHV-1, BVDV, BPIV-3 e BRSV (FULTON et al., 2004). A susceptibilidade às viroses inicia-se quando concentrações de ACs são inferiores a  $\log_2 4$  para BVDV (RIDPATH; BOLIN, 1995),  $\log_2 5$  para BoHV-1 (POSPÍSIL et al., 1996),  $\log_2 5,5$  para BRSV e  $\log_2 5,5$  para BPIV-3 (WINDEYER et al., 2015). A partir destes momentos, os anticorpos maternos são insuficientes para proteger os recém-nascidos mas desempenham importante papel supressor na resposta imune ativa induzida pela vacinação ou exposição natural (ELLIS et al., 2001).

Kirkpatrick et al. (2001), demonstraram que o tempo para os animais se tornarem soronegativos foi de  $185,6 \pm 59,8$  dias para BVDV,  $122,9 \pm 46,6$  dias para BoHV-1,  $183,7 \pm 33$  dias para BRSV e acima de  $190,6 \pm 58,3$  dias para BPIV-3. Esses valores foram um pouco diferentes aos encontrados por Chamorro et al. (2014) ( $5,5 \pm 1,7$  meses para o BVDV1,  $6,1 \pm 1,6$  meses para o BVDV2,  $3,8 \pm 1,6$  meses para o BoHV-1,  $5,2 \pm 1,5$  meses para o BRSV e  $4,9 \pm 1,66$  meses para o BPIV-3).

A completa metabolização dos ACs maternos possibilita a indução da resposta imune pela vacinação (BACCILLI et al., 2015), entretanto a DRB costuma ser precoce e atingir 7,7% a 9,5% das bezerras de leite entre a segunda semana ao terceiro mês de vida, resultando no tratamento de 21,9% (630/2874) desses animais (WINDEYER et al., 2013).

Diante do cenário apresentado, a imunização de bezerros para a profilaxia da DRB têm sido um desafio em âmbito internacional. Em relação ao Brasil, existem apenas pesquisas abordando a transferência passiva de ACs para BoHV-1 em estudos transversais ou longitudinais limitados à um curto período de avaliação.

A hipótese desta pesquisa é que a interface entre a resposta imune passiva e ativa dos bezerros varia de acordo com o seu desenvolvimento. Assim, objetivou-se avaliar a dinâmica de anticorpos específicos para as viroses respiratórias e subpopulações de linfócitos em bezerros do nascimento aos oito meses de idade.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 OBTENÇÃO DOS BEZERROS**

Foram acompanhados os nascimentos de 25 bezerros recém-nascidos machos da raça Holandesa oriundos de fazenda comercial, localizada em Araras, São Paulo (Figura 2). Os partos foram acompanhados para assistência aos recém-nascidos e controle do manejo de colostro. Inicialmente os animais foram secos, em seguida, realizou-se a avaliação clínica e estabelecimento do escore APGAR (Quadro 1), como proposto por Rodrigues (2008).

A antissepsia do umbigo foi realizada logo após o nascimento, pela imersão completa do cordão umbilical em recipiente contendo tintura de iodo a 10% por pelo menos 1 minuto e meio, repetindo-se o processo após 12 horas. A partir do segundo dia, foi realizada antissepsia com tintura de iodo a 5% duas vezes ao dia até mumificação do cordão umbilical.

Quadro 1 - Escore para avaliação da viabilidade do bezerro recém-nascido pela escala de APGAR – São Paulo - 2015

Critérios de avaliação	Escore		
	0	1	2
Frequência cardíaca	Ausente	Bradycardia/Irregular	Normal/Regular
Esforço respiratório	Ausente	Irregular	Regular
Tônus muscular	Flacidez	Alguma flexão	Flexão
Irritabilidade reflexa	Ausente	Algum movimento	Hiperatividade
Coloração de mucosas	Cianóticas	Hipocoradas	Normocoradas

Fonte: (RODRIGUES, 2008).

Legenda: Satisfatório - Soma > 7

Figura 2– Assistência aos recém-nascidos e colostragem dos bezerros imediatamente após nascimento, São Paulo – São Paulo – 2015.



(a)

(b)

Fonte: (SILVA, B. T., 2015).

Legenda: (a) Assistência ao recém-nascido imediatamente após o parto; (b) Fornecimento de colostro ao recém-nascido com auxílio de mamadeira.

## 4.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Como critério de inclusão, os bezerros deveriam ser livres da infecção pelo BVDV, BoHV-1, BRSV e BPIV-3 ao nascimento. Assim, amostras de soro sanguíneo e sangue total foram obtidas antes da mamada do colostro para realização da soroneutralização (SN) para todas as viroses e reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) apenas para o BVDV. Estas amostras foram congeladas à temperatura de -80°C e encaminhadas para processamento no Laboratório de Viroses de Bovídeos do Instituto Biológico. Seguindo estes critérios 2/25 bezerros foram descartados porque apresentaram-se soropositivos antes de ingerir o colostro.

### 4.2.1 Soroneutralização

A técnica de soroneutralização (SN) foi realizada de acordo com a OIE (2013). Para tanto, foram utilizadas placas de poliestireno de 96 cavidades, utilizando uma diluição constante do soro, na base logarítmica 2, a partir das diluições 1:4 (BVDV-NADL), 1:2 (BoHV-1), 1:2 (BRSV) and 1:2 (BPIV-3), tendo como diluente o meio de cultivo celular MEM (*Minimum Essential Medium*) contendo 1 a 2% de antibióticos.

Feita a diluição das amostras, foi adicionado à placa 50 µL da solução contendo TCID<sub>50/100µL</sub> (50% *tissue culture infective doses*) de BVDV, BRSV e BPIV-3. Em seguida, as placas foram incubadas por uma hora em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Para o BoHV-1, foi adicionado à placa 100 µL da solução contendo TCID<sub>50/100µL</sub> e as placas foram incubadas por 18-24 horas em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Após este período, suspensão de células MDBK (*Madin-Darby Bovine Kidney*) foram adicionadas em cada cavidade das placas. Novamente a placa foi incubada em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> durante 4 a 5 dias.

A infectividade foi indicada pelo “Efeito Citopático” (ECP) visível na monocamada celular em placas, em microscópio invertido. O título de anticorpos foi expresso como a maior diluição do soro que inibiu completamente a infectividade e conseqüentemente o ECP em ambas as cavidades de cada diluição. A potência do

vírus foi observada na retrotitulação através do cálculo do título, de acordo com Reed e Muench (1938).

#### 4.2.2 Reação em cadeia da Polimerase em Tempo Real

Amostras de sangue total foram homogeneizadas por inversão 10 vezes, em seguida os tubos foram centrifugados a 1.200 rpm por 15 minutos a 22° C (temperatura ambiente). Após a centrifugação, o plasma foi descartado e a camada de leucócitos removida e reservada para a realização do RT-PCR.

A extração do ácido nucléico foi feita empregando-se solução comercial (Trizol LS<sup>®</sup> Reagent)<sup>1</sup>. A transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) convencional foi realizada de acordo com as instruções do manual do fabricante do kit comercial<sup>2</sup>.

Os primers utilizados na reação detectaram regiões comuns para BVDV 1 e 2, baseados em uma sequência de 290 nucleotídeos, localizados na região 5' não traduzida (5' TAG CCA TGC CCT TAG TAG 11 GAC 3' e 5' ACT CCA TGT GCC ATG TAC AGC 3'). O material genético amplificado foi introduzido em poços em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE 1X à voltagem de 100V por uma hora. Os amplicons foram evidenciados após coloração com gel red diluído (1:150) em nuclease free water<sup>3</sup>, e a visualização foi feita utilizando o transluminador sob luz ultravioleta (320nm). Os fragmentos de DNA foram comparados com o padrão de pares de base apresentando incrementos de 100 pb (DNA ladder de 100 pb )<sup>4</sup>. As amostras foram consideradas positivas quando a amostra testada apresentou uma banda no tamanho do controle positivo e negativo na ausência de banda.

---

<sup>1</sup> Invitrogen®, São Paulo-SP, Brasil.

<sup>2</sup> Access Quick<sup>™</sup> RT-PCR System, Promega, São Paulo-SP, Brasil.

<sup>3</sup>Promega®, São Paulo-SP, Brasil.

<sup>4</sup>Invitrogen®, São Paulo-SP, Brasil.

### 4.3 COLOSTRAGEM

O colostro utilizado nesta pesquisa foi obtido de vacas imunizadas com vacina comercial<sup>5</sup>, contendo estirpes de BVDV do tipo 1 (5960) e tipo 2 (53637) inativadas; BoHV-1 (Cooper) e BPIV-3 (RLB 103) vivos/termosensíveis; BRSV (375) vivo/atenuado, além de *Leptospira canicola*, *L. grippotyphosa*, *L. hardjo*, *L. icterohaemorrhagiae* e *L. pomona* inativadas, associadas a Quil A, colesterol, e Amphigen como adjuvantes. A triagem do colostro foi realizada após a primeira ordenha das doadoras com o auxílio de colostrômetro (IgG $\geq$ 5.000 mg/dL). O colostro foi identificado e congelado a -20°C em alíquotas de 2 litros.

Os bezerros receberam quatro litros de “pool” de colostro por meio de mamadeira e/ou sondagem esofágica, dividido em duas amamentações de dois litros cada, administrada nas primeiras doze horas pós-nascimento (p.n.).

### 4.4 ISOLAMENTO E MANUTENÇÃO

Os animais foram mantidos na fazenda de origem até os 15 dias de vida, e posteriormente foram transferidos para a Clínica de Bovinos e Pequenos Ruminantes (CBPR) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP).

Na fazenda de origem os animais permaneceram em instalação compartilhada (10x5m) e coberta, com no máximo seis animais. O local da instalação era previamente lavado com água e sabão neutro. Após seco, o local era desinfetado com o uso de cal virgem. A cama utilizada era composta por feno proveniente da fazenda. Havia boa ventilação no local e o uso era exclusivo para criação dos animais do experimento, sendo permitida a entrada somente de pessoas autorizadas.

Na CBPR, os bezerros foram criados dois a dois em baias compartilhadas de aproximadamente 5x5m. O regime de desinfecção foi modificado neste momento. As baias eram lavadas com água, sabão neutro e hipoclorito de sódio. Após enxague,

---

<sup>5</sup>Cattle Master Gold FP5 + L5®, Zoetis, São Paulo-SP, Brasil.

era realizada desinfecção por meio de vassoura de fogo em paredes, chão, comedouro e bebedouros. Somente após este processo os animais eram inseridos no local. A cama das baias era composta por maravalha, sendo repostas pelos funcionários da CBPR cerca de duas vezes ao dia para remoção dos dejetos. O processo de lavagem e desinfecção era repetido a cada 30 dias.

Mesmo diante de todo esse cuidado, o fluxo de pessoas e animais na área comum era muito maior. Além disso, os funcionários utilizavam a mesma vestimenta, sem prévia desinfecção, para a limpeza de todas as demais baias da CBPR.

Os bezerros foram alimentados com 6L de sucedâneo lácteo<sup>6</sup> por dia, ração peletizada<sup>7</sup>, sal mineral e água “*ad libitum*” até o desmame.

Aos dois meses de idade iniciou-se o desmame gradual dos bezerros, com duração de sete dias consecutivos. No momento do desmame, os bezerros estavam ingerindo 1.000 gramas de ração ao dia observando-se aumento gradual do consumo até o fornecimento máximo de três Kg ao dia. Após o desmame, os animais foram mochos, tão logo que passasse o estresse pós-desmame, mas que também não prejudicasse as avaliações subsequentes.

Durante a criação dos bezerros, quatro morreram devido a DRB (n=2) e clostridiose (n=2).

#### 4.5 COLHEITA DE AMOSTRAS

Alíquotas do “pool” de colostro fornecido aos bezerros foram colhidas em tubos de poliestireno (50mL) para a determinação do índice Brix (%) e proteína total (g/dL).

Amostras de soro foram obtidas de 19 bezerros antes e após a mamada do colostro (2º dia p.n.) para avaliação dos títulos de anticorpos após a colostragem. A partir deste momento, cinco animais foram selecionados aleatoriamente e acompanhados até oito meses de idade, sendo realizadas colheitas de sangue total e soro sanguíneo nos seguintes momentos após a avaliação da colostragem: 14, 44, 74, 90, 120, 150, 180, 210 e 240 dias de vida.

---

<sup>6</sup>Sprayfo Violeta®, Sloten do Brasil Ltd, Santos - SP, Brasil

<sup>7</sup>Agromix®, Jaboticabal-SP, Brasil

A partir dos 14 dias foram colhidas amostras de sangue dos bezerros por meio de punção da veia jugular, utilizando sistema a vácuo, em tubos siliconizados contendo EDTA (*Ethylene Diamine Tetraacetic Acid*) para realização do leucograma e avaliação das subpopulações de linfócitos sanguíneos; e em tubos sem anticoagulante para obtenção do soro sanguíneo para análises de soroneutralização.

## 4.6 PROVAS LABORATORIAIS

### 4.6.1 Colostro

Para determinação do índice Brix foi utilizado refratômetro óptico Brix com escala entre 0 a 32%<sup>8</sup>. A qualidade do colostro foi determinada utilizando-se o ponto de corte mínimo equivalente a 21% (QUIGLEY et al., 2013).

Para determinação da proteína total do colostro, foi empregada a técnica de obtenção do soro pela ultracentrifugação. Para tal, realizou-se a centrifugação das amostras a 48.000xg por vinte minutos em ultra-centrífuga<sup>9</sup>. Assim, a fração líquida do colostro foi extraída e acondicionada em microtubos (1mL) para análise bioquímica. Em seguida, a mensuração da proteína total (g/dL) foi realizada por um analisador bioquímico automático<sup>10</sup>, utilizando-se kit comercial<sup>11</sup>, segundo a metodologia descrita pelo fabricante.

Posteriormente, os dados de proteína total obtidos em g/dL foram transformados em porcentagem (%), levando em consideração que foram utilizados 500µL para dosagem da amostra.

---

<sup>8</sup> SperScientific®, Scottsdale, AZ - Modelo 300001

<sup>9</sup> Beckman® - Modelo J2-21

<sup>10</sup> Randox®, RX Daytona

<sup>11</sup> Randox®, número do catálogo TP 4001

#### 4.6.2 Bezerros

Os bezerros foram avaliados diariamente pelo exame do estado geral, funções vitais (frequência respiratória e cardíaca, temperatura corpórea), grau de hidratação, mucosas aparentes, características das fezes e acompanhamento de cicatrização umbilical, segundo os procedimentos descritos por Dirksen et al. (1993).

A titulação de anticorpos específicos para o BVDV, BoHV-1, BRSV e BPIV-3 foi realizada por meio da técnica de soroneutralização conforme procedimentos já descritos no tópico 4.2.

O número total de leucócitos foi mensurado através da contagem automática<sup>12</sup> e a contagem diferencial de linfócitos foi realizada pela avaliação dos esfregaços sanguíneos.

As subpopulações dos linfócitos sanguíneos foram determinadas por citometria de fluxo, segundo painel de anticorpos monoclonais específicos para receptores de superfície celular (Quadro 2).

Foram transferidos 100µL de sangue total com EDTA, para tubos específicos. A lise dos eritrócitos foi realizada pela adição de 900µL de solução comercial seguindo-se a metodologia descrita pelo fabricante (*Facslysing*<sup>13</sup>). Foram realizadas marcações simples e duplas adicionando-se 100 µL de anticorpos monoclonais diluídos, incubadas por 30 minutos a 4°C, em seguida, as células foram lavadas três vezes com *Phosphate Buffered Saline* (PBS<sup>14</sup>). Por fim, foram adicionados os anticorpos secundários fluorescentes, incubados por 30 minutos, em ambiente escuro, a 4°C.

As leituras das amostras foram realizadas em citômetro de fluxo<sup>15</sup> utilizando-se o *software* Cellquest, sendo adquiridos cinquenta mil eventos no *gate* de linfócitos por amostra. A análise dos eventos adquiridos foi realizada em software específico<sup>16</sup>, conforme metodologia detalhada nas figuras 3 a 5. Os resultados obtidos foram expressos como porcentagem (%) de células marcadas para cada receptores de

---

<sup>12</sup> ABC Vet® - ABXTM

<sup>13</sup> BD número catálogo349202

<sup>14</sup> PBS uso 1 PBS 10X: 9 de água destilada ; PBS 10X: 26, 79g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>7H<sub>2</sub>O, 4,14g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O, 83g de NaCl e 1000mL de Água destilada

<sup>15</sup>FACSCalibur™, BD Biosciences, San Jose, CA

<sup>16</sup>FlowJo®, versão 7.2.5, Becton Dickinson Immunocytometry System®, San Diego, CA

superfície celular. A população gamma-delta foi estimada subtraindo-se as subpopulações T CD8<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup> do total de células T CD3<sup>+</sup>.

O número absoluto de cada subpopulação de linfócito foi calculado multiplicando-se as porcentagens das subpopulações pelo número total de linfócitos/ $\mu$ L de sangue obtido a partir do leucograma.

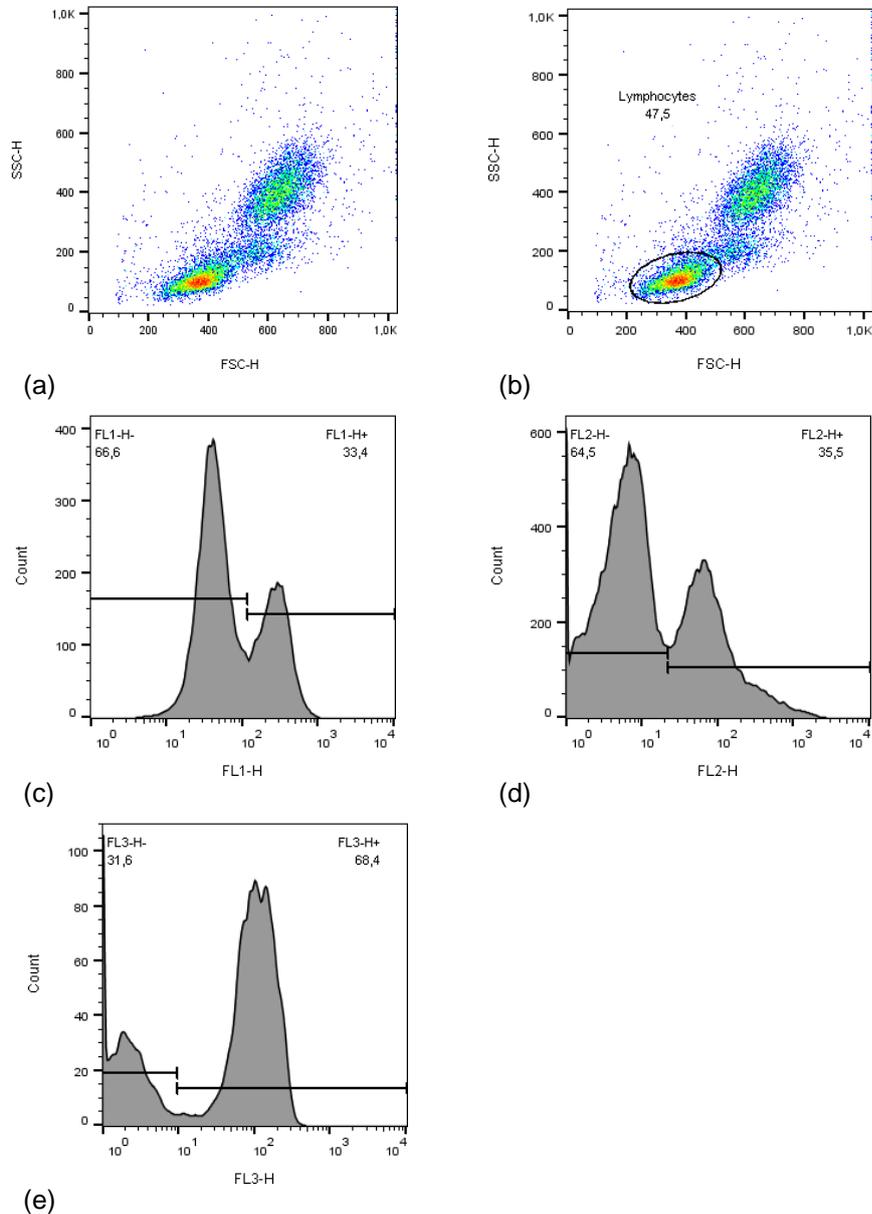
Quadro 2– Especificações e diluições de anticorpos monoclonais primários e secundários selecionados para a marcação das subpopulações de linfócitos - São Paulo – 2015 .

<b>Anticorpos Monoclonais Primários</b>	<b>Isotipo</b>	<b>Especificidade</b>	<b>Clone</b>	<b>Dil</b>	<b>Referência</b>	<b>Ac 2°</b>	<b>Dil</b>
Mouse anti-bovine CD3	IgG1	Linfócito T $\alpha\beta$ TCR.	MM1A	1:400	BOV2009	PERCP - 340272	1:10
Mouse anti-bovine CD4	IgG2a	Linfócito T $\alpha\beta$ TCR.	IL-A11	1:200	BOV2010	FITC - M31501	1:5
Mouse anti-bovine CD8	IgM	Linfócito T $\alpha\beta$ TCR.	BAQ111A	1:200	BOV2097	FITC - M31501	1:100
Mouse anti-bovine WC1-N1	IgM	Linfócito T $\gamma\delta$ TCR	B7A1	1:200	BOV2050	FITC - M31501	1:1000
Mouse anti-bovine B-lymphocytes CD21	IgG1	Linfócito B	GB25A	1:400	BOV2031	PERCP - 340272	1:100
Mouse anti-bovine CD25	IgG2a	Receptor alta afinidade Interleucina 2 (IL-2)	CACT108A	1:400	BOV2073	PE - M32204	1:200

Fonte: (SILVA, B. T., 2015).

Legenda: Dil - diluição

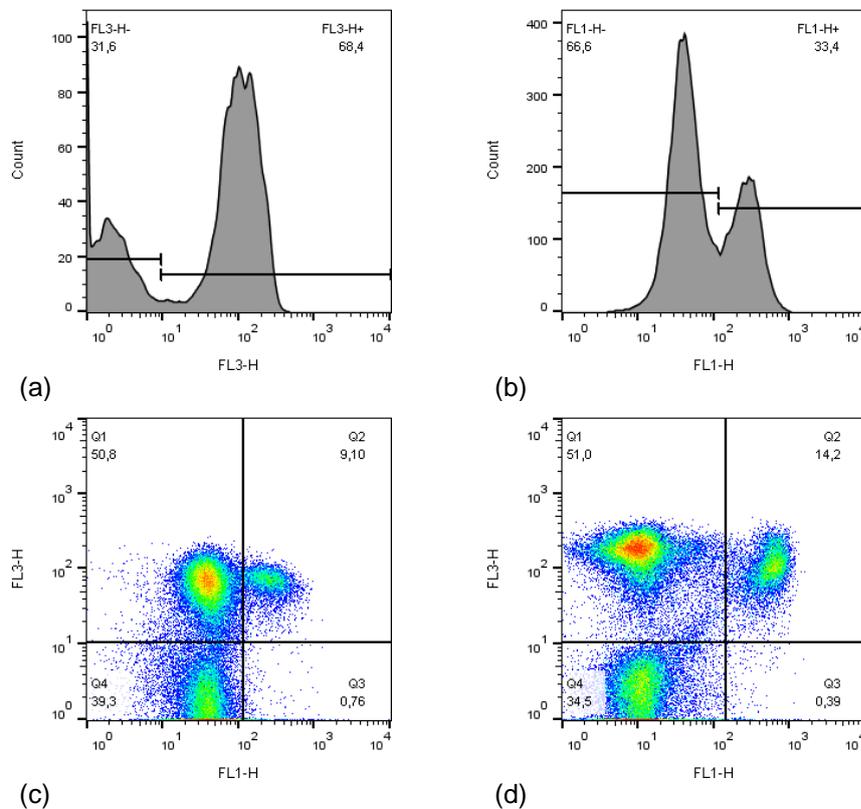
Figura 3- Etapas inicialmente executadas para análise dos eventos no software Flowjo, obtidos nos ensaios de citometria de fluxo. As fluorescências FL1 (c), FL2 (d) e FL3 (e), foram determinadas e calibradas a partir dos anticorpos WC1<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup> e CD3<sup>+</sup>, respectivamente. - São Paulo - 2015



Fonte: (SILVA, B. T., 2015).

Legenda: (a) tubo branco não marcado; (b) seleção da população de linfócitos; (c) histograma demonstrando a subpopulação WC1<sup>+</sup>(FL1), (d) expressão do marcador ativação de T (CD25<sup>+</sup>) (FL2) e (e) histograma demonstrando a população CD3<sup>+</sup>(FL3).

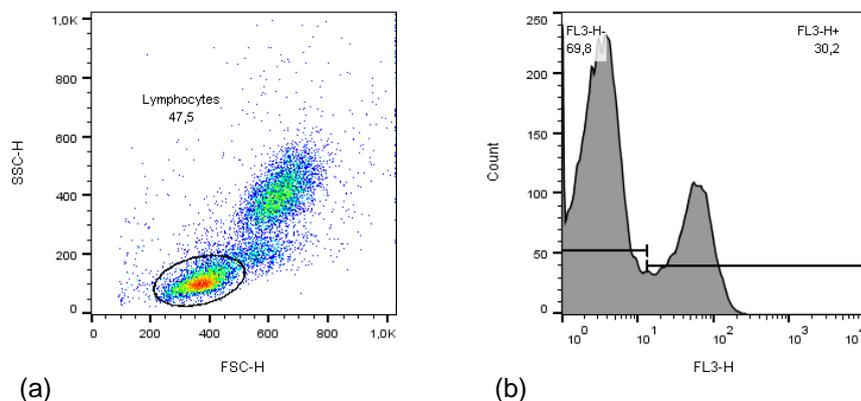
Figura 4 - Ensaio de avaliação linfócitos  $CD3^+CD4^+$  e  $CD3^+CD8^+$  (FL1), determinadas a partir da fluorescência de  $CD3^+$  (FL3) por  $WC1^+$  (FL1) - São Paulo - 2015



Fonte: (SILVA, B. T., 2015).

Legenda: (a) histograma demonstrando a população  $CD3^+(FL3)$ ; (b) a subpopulação  $T\ gamma\ delta^+(FL1)$ ; (c) plotagem das células expressando os marcadores  $CD3^+CD4^+$  e  $CD3^+CD8^+$  (d) no quadrante duplo positivo.

Figura 5 - Ensaio de avaliação da população B  $CD21^+$  (FL3) - São Paulo - 2015



Fonte: (SILVA, B. T., 2015).

Legenda: (a) seleção da população de linfócitos; (b) histograma demonstrando a população  $CD21^+(FL3)$

## 4.7 ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa estatístico SPSS 19.0 (IBM Corp. Released 2011. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 19.0. Armonk, NY: IBM Corp.). As análises foram consideradas significativas quando  $P \leq 0,05$ , com tendências  $P \leq 0,10$ .

Os dados obtidos no teste Brix e valores de proteína total foram submetidos ao teste de correlação de Pearson. Os resultados das análises estatísticas foram interpretados segundo a classificação proposta por Dancey e Reidy (2005), sendo que essa dependência estatística linear poderá ser considerada fraca quando  $r = 0,1$  até  $0,3$ ; moderada, sendo  $r = 0,4$  até  $0,6$  e forte quando  $r = 0,7$  até  $1$ .

A hipótese da normalidade foi testada para as demais variáveis pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. As subpopulações de linfócitos apresentaram distribuição não paramétrica, assim essas variáveis estão apresentadas em medianas, valores mínimos e máximos.

Os títulos de anticorpos foram convertidos para  $\log_2$  e mantiveram distribuição não-paramétrica, assim foram calculadas as medianas dos títulos em  $\log_2$ , sendo posteriormente transformadas em antilog (base 2) pela relação  $= 2^a$ , onde "a" é a mediana dos títulos de anticorpos em  $\log_2$ .

A análise dos dados no tempo foi realizada pelo teste de Friedman associado ao Wilcoxon com correção de Bonferroni ( $P \leq 0,005$ ).

A meia-vida dos anticorpos foi calculada por meio da regressão linear simples. A partir deste dado, estimou-se o tempo necessário para os bezerros tornarem-se soronegativos, considerando-se titulação de 1:4 para BVDV, BRSV e BPIV-3 e 1:10 para BoHV-1 como níveis indetectáveis na SN (FULTON et al., 2004).

## 5 RESULTADOS

O presente estudo avaliou a transferência passiva de imunidade humoral e celular, bem como a tempo de duração e meia vida de anticorpos para o BVDV, BoHV-1, BRSV e BPIV-3 em bezerros holandeses do nascimento aos 240 dias de

vida.

## 5.1 ANÁLISES DO COLOSTRO

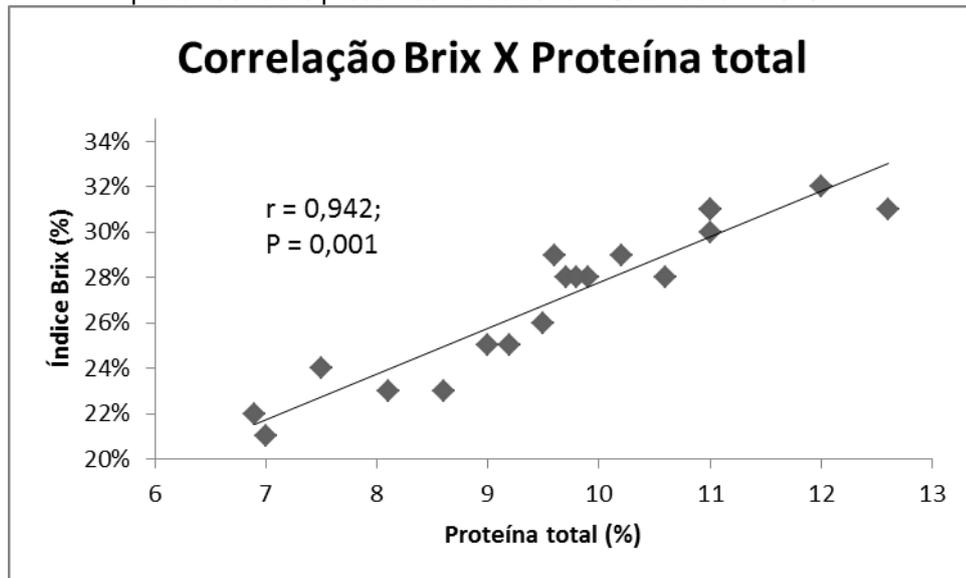
Os dados referentes às análises de índice Brix e proteínas total presentes no colostro podem ser observados no quadro 3. As porcentagens Brix encontradas nas amostras de colostro variaram de 21 a 32%, apresentando média de  $27\pm 3,4\%$ . Na mensuração de proteínas totais, pôde-se observar amplitude de variação de 6,9 a 12,6%, com média de  $9,6\pm 1,6\%$ . Com base nesses resultados, foi possível verificar forte correlação entre a avaliação do índice Brix e proteína total obtida no soro do colostro ( $r= 0,942$  e  $P= 0,001$ ), conforme ilustra a figura 6.

Quadro 3 – Porcentagens Brix e valores de proteína total mensurados em “pool” de colostro fornecido a 19 bezerros Holandeses – São Paulo -2015.

<b>Identificação bezerros</b>	<b>Brix (%)</b>	<b>Proteína Total (%)</b>
1	28,0	9,7
2	24,0	7,5
3	23,0	8,1
4	22,0	6,9
5	32,0	12,0
6	31,0	11,0
7	30,0	11,0
8	31,0	11,0
9	31,0	12,6
10	23,0	8,6
11	26,0	9,5
12	29,0	9,6
13	25,0	9,0
14	28,0	9,9
15	28,0	9,8
16	29,0	10,2
17	25,0	9,2
18	28,0	10,6
19	21,0	7,0
Média	$27\pm 3,4$	$9,6\pm 1,6$

Fonte: (SILVA, B. T., 2015).

Figura 6 –Correlação linear de Pearson entre porcentagens do índice Brix e proteínas totais presentes no colostro – São Paulo – 2015.



Fonte: (SILVA, B. T., 2015).

## 5.2 BEZERROS

### 5.2.1 Exame do estado geral

Ao longo do estudo, os cinco bezerros foram acompanhados e avaliados quanto ao estado físico geral. Pôde-se observar que 4/5 (80%) bezerros acompanhados após a colostragem apresentaram manifestações clínicas compatíveis broncopneumonia dos 80 aos 135 dias de vida. Foram identificadas as seguintes manifestações clínicas: secreções nasal e ocular, dispneia, crepitação fina à auscultação, tosse, e desidratação leve a moderada. Não houve casos recidivantes, porém, estas manifestações foram importantes no direcionamento da terapêutica, levando em consideração os agentes etiológicos mais frequentes.

### 5.2.2 Imunidade humoral

Após 48 horas da ingestão do colostro, pôde-se observar soroconversão dos 19 animais para os agentes virais envolvidos na DBR. Valores medianos dos títulos de anticorpos específicos para as viroses, e sua amplitude de variação, detectados com 48 horas de vida estão dispostos na Tabela 1.

Tabela 1 – Valores medianos e amplitude de variação para os títulos de anticorpos específicos para as viroses respiratórias em bezerros Holandeses às 48 horas de vida – São Paulo -2015.

<b>Viroses</b>	<b>Mediana (log<sub>2</sub>)</b>	<b>Antilog</b>	<b>Amplitude de variação (log<sub>2</sub>)</b>
BVDV	12,3	5042,8	6,3-12,8
BoHV-1	9,0	512	6,0-10,5
BRSV	5,0	32	3,0-8,0
BPIV-3	8,5	362	5,0-10,0

Fonte: (SILVA, B. T., 2015).

Valores medianos (log<sub>2</sub>) e antilog (base 2) de anticorpos detectados dos 14 aos 240 dias estão dispostos na Tabela 2 e figura 7.

Foi possível observar declínio gradual dos títulos de anticorpos para BVDV (12,8-3,3), BoHV-1 (10,0-3,3) e BPIV-3 (10,0-2,0) ao longo do tempo, embora o BVDV não tenha apresentado soronegatividade até os 240 dias de avaliação. Não foram detectadas diferenças estatísticas entre os momentos para as viroses apesar das variações detectadas ( $P > 0,05$ ).

Os títulos de anticorpos para o BRSV (11,3-2,0) apresentaram perfil diferenciado em relação às demais viroses considerando os valores medianos ( $\log_2$ ), obtendo-se aumento dos 14d aos 74d para os bezerros 4 e 5, e queda dos títulos para os demais dos 14 aos 44d.

A análise individual dos bezerros esclarece as variações obtidas para  $\log_2$ . Observou-se queda nos títulos de anticorpos aos 120 dias de vida, aumento no momento subsequente (150 dias) e novamente diminuição aos 180 dias pós-nascimento. Variações individuais semelhantes também foram observadas na maioria dos bezerros para o BoHV-1. Para BPIV-3 a queda dos títulos foi observada precocemente aos 74d e novamente aos 180d, sempre acompanhada de aumento no período subsequente (Figura 7).

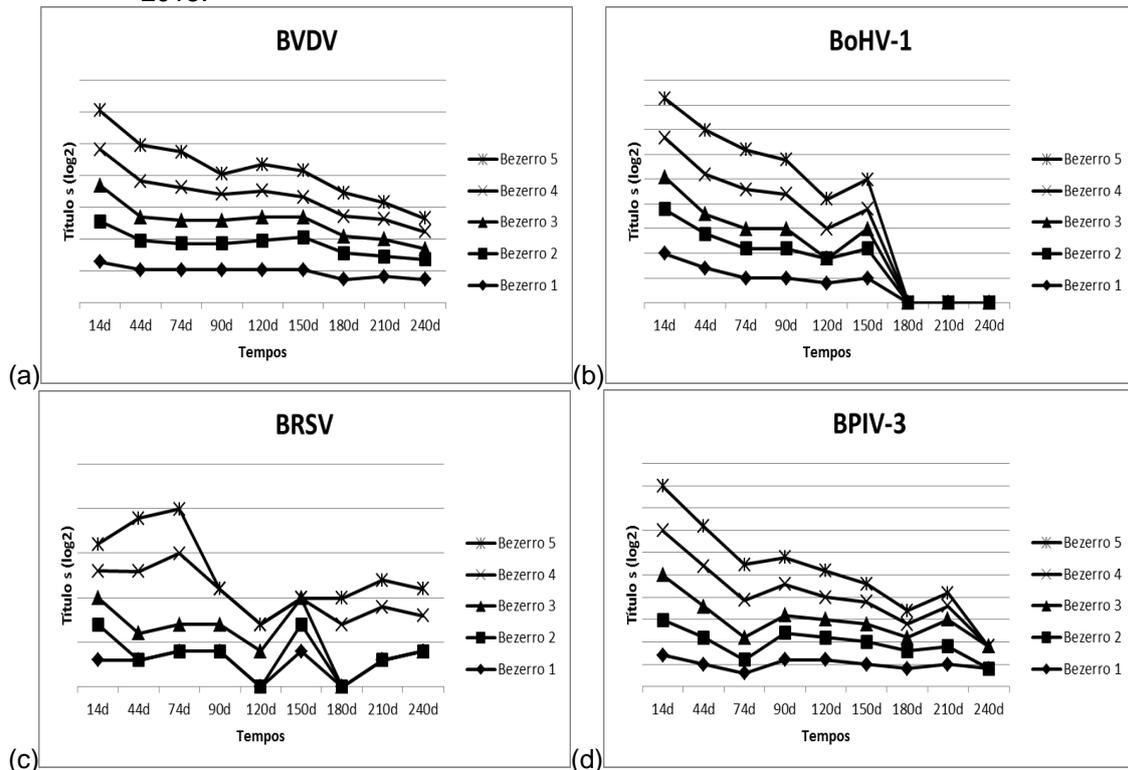
Tabela 2– Valores medianos ( $\log_2$ ) e antilog de anticorpos específicos para as viroses respiratórias dos 14 aos 240 dias de vida – São Paulo -2015.

T	BVDV		BoHV-1		BRSV		BPIV-3	
	Me ( $\log_2$ )	Antilog						
14 d	12,3	5042,8	8,0	256,0	3,0	8,0	10,0	1024,0
44 d	10,3	1260,7	7,0	128,0	3,0	8,0	7,0	128,0
74 d	10,3	1260,7	6,0	64,0	4,0	16,0	5,0	32,0
90 d	8,3	315,2	6,0	64,0	3,0	8,0	6,0	64,0
120 d	8,3	315,2	5,0	32,0	0,0	0,0	5,0	32,0
150 d	8,3	315,2	5,0	32,0	3,0	8,0	5,0	32,0
180 d	7,3	157,6	0,0	0,0	0,0	0,0	3,0	8,0
210 d	6,3	78,8	0,0	0,0	3,0	8,0	4,0	16,0
240 d	5,3	39,4	0,0	0,0	3,0	8,0	0,0	0,0

Fonte: (SILVA, B. T., 2015).

Legenda: Me - Mediana.

Figura 7 – Comportamento individual dos títulos de anticorpos específicos para as viroses respiratórias em bezerros Holandeses dos 14 aos 240d de vida – São Paulo - 2015.



Fonte: (SILVA, B. T., 2015).

Legenda: Títulos de anticorpos para BVDV (a); BoHV-1 (b); BRSV (c) e BPIV-3 (d). Os títulos de anticorpos são exibidos como dois pontos de dados separados, distribuídos uniformemente no eixo horizontal e, portanto, representam as oscilações dos títulos individuais ao longo do tempo.

A meia-vida dos anticorpos específicos para as viroses respiratórias e o tempo estimado para soronegatividade estão expressos na Tabela 3.

Tabela 3 – Valores de meia-vida de anticorpos neutralizantes e tempo estimado para soronegatividade para BVDV, BoHV-1, BRSV e BPIV-3 – São Paulo -2015.

<b>Viroses</b>	<b>Meia-vida (dias) ± Desvio-padrão</b>	<b>Tempo para soronegativo ± Desvio-padrão</b>
BVDV	36,2±6,1	367,01±68,7
BoHV-1	50,7±18,0	239,67±66,88
BRSV	ND	ND
BPIV-3	46,8±21,1	303,36±60,15

Fonte: (SILVA, B. T., 2015).

Legenda: ND - Dados não ajustados ao modelo exponencial simples, de acordo com análise de regressão a 5%

### 5.2.3 Subpopulações de linfócitos e ativação celular (CD25<sup>+</sup>)

Os valores relativos e absolutos de das populações B e T, assim como as subpopulações T, e expressão do marcador CD25<sup>+</sup> estão ilustrados na tabela 4 e figura 8.

Observou-se aumento da proporção (%) e valores absolutos de células CD21<sup>+</sup> ao longo do tempo. A observação dos valores individuais obtidos para os bezerros revelaram diminuição das proporções aos 150 dias de vida com retorno aos valores iniciais nos momentos subsequentes.

Células T CD3<sup>+</sup> apresentaram valores relativos (%) decrescentes ao longo do tempo, porém os absolutos mantiveram-se estáveis. Observando os valores individuais dos bezerros pôde-se detectar queda aos 44 dias e retorno aos valores anteriores no momento subsequente aos 74 dias de vida. As variações individuais para as células T CD3<sup>+</sup> foram semelhantes àquelas observadas para as células auxiliares CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> e citotóxicas CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> e CD3<sup>+</sup>WC1<sup>+</sup>.

A partir dos 74 dias de vida observou-se queda acentuada da população de auxiliares CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, obtendo-se valores mínimos entre 90 a 120 dias de vida e aumento gradual nos momentos subsequentes. Variações a partir deste período também foram detectadas para as células CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> e CD3<sup>+</sup>WC1<sup>+</sup>, entretanto, observou-se pico máximo para essas populações entre 74-90 dias, com queda aos 120 dias de vida e aumento gradual nos momentos subsequentes.

Os valores de CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> foram constantes, exceto pela queda dos valores aos 44d e leve pico aos 74d, e novamente pico aos 150 dias de vida para os bezerros 4 e 5.

A expressão do marcador CD25<sup>+</sup> demonstrou importante aumento até os 74d. Houve uma marcada queda de células ativadas na circulação até atingir valores mínimos aos 150d, observando-se aumento nos momentos subsequentes.

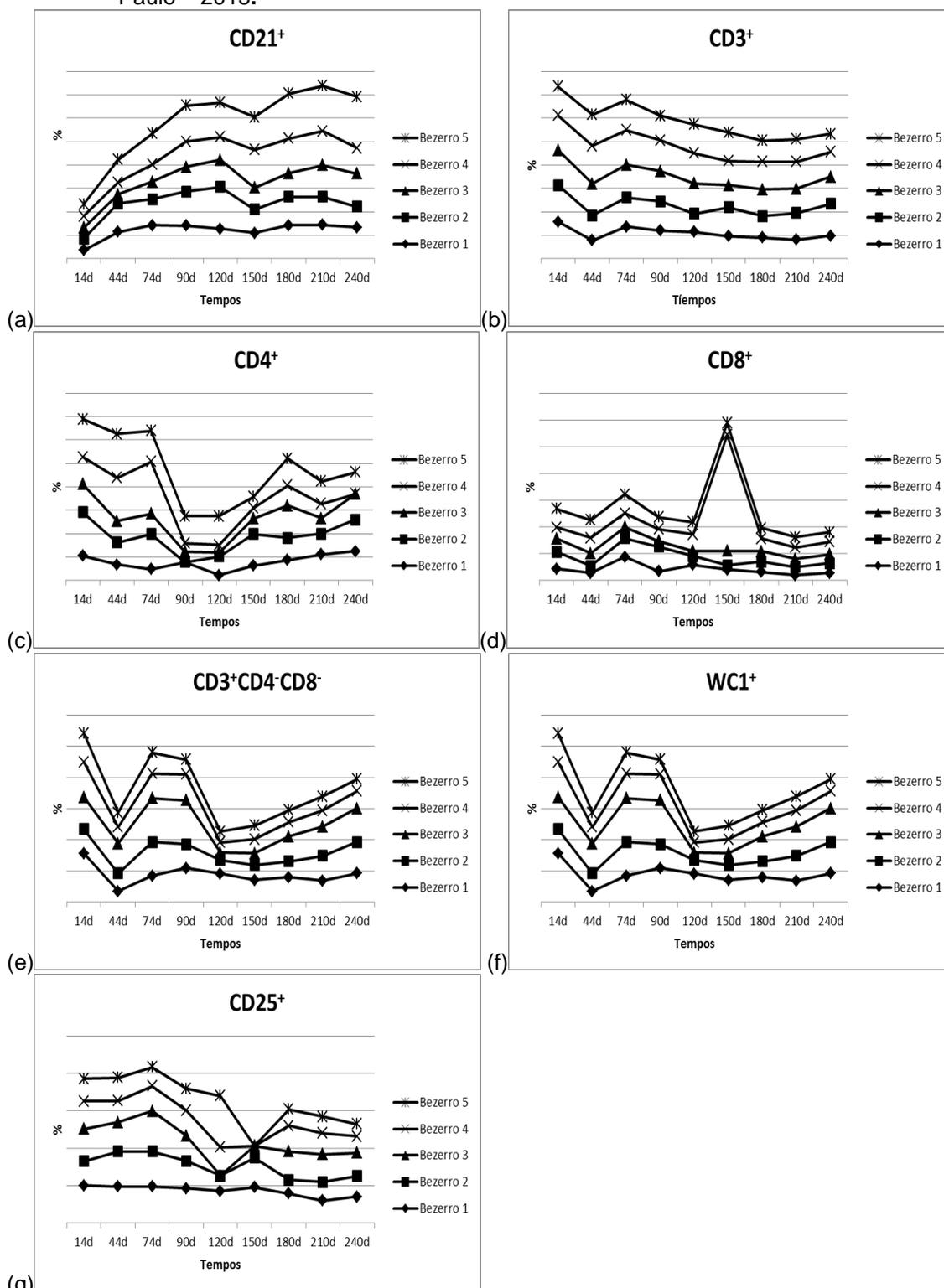
Apesar das variações apresentadas, não foram observadas diferenças estatísticas entre os momentos para os valores absolutos e relativos para nenhuma das populações avaliadas ( $P > 0,05$ ).

Tabela 4 - Medianas dos valores absolutos ( $10^3/\mu\text{L}$ ) e relativos (%) das populações e subpopulações de linfócitos e marcador de ativação ( $\text{CD}25^+$ ) em bezerros Holandeses dos 14 aos 240 dias de vida – São Paulo – 2015.

Populações e Subpopulações de Linfócitos	Tempos									
		14 d	44 d	74 d	90 d	120 d	150 d	180 d	210 d	240 d
B $\text{CD}21^+$	%	4,4	8,7	18,7	20,2	18,5	14,4	17,8	21	17,1
	$10^3/\mu\text{L}$	0,5	0,6	1	0,9	1,2	0,8	1	1	1
T $\text{CD}3^+$	%	46,6	47,7	52,9	46,5	38,7	31,5	33,5	29,9	31,4
	$10^3/\mu\text{L}$	4,4	2,4	3,3	2,4	2,1	1,8	2,2	2	2,4
T auxiliar $\text{CD}4^+$	%	14,8	13,4	21,7	7,1	3,6	6,6	13,1	9,3	14,5
	$10^3/\mu\text{L}$	1,9	0,8	1,1	0,3	0,4	0,5	1	0,8	0,8
T citotóxico $\text{CD}8^+$	%	5,4	6,8	11,6	6,3	5,8	4,7	4,9	3,6	4,3
	$10^3/\mu\text{L}$	0,7	0,3	0,7	0,4	0,4	0,3	0,3	0,2	0,3
T $\text{CD}3^+\text{CD}4^-\text{CD}8^-$	%	41,3	29,9	23,8	44,1	40,8	27,1	21	32,3	28,5
	$10^3/\mu\text{L}$	2	1,2	1,3	1,9	1,4	0,7	0,8	1,1	1
T Gama-delta $\text{WC}1^+$	%	13,3	6,6	11,7	11,6	4,4	4,7	6,1	7,8	10,5
	$10^3/\mu\text{L}$	1,2	0,5	0,8	0,8	0,3	0,5	0,6	0,5	0,6
Marcador $\text{CD}25^+$	%	23,8	24,7	31,8	26,7	20,9	7,1	20,6	21,1	14,5
	$10^3/\mu\text{L}$	2	1,3	1,8	1,4	1,5	0,5	1,4	1,1	1,1

Fonte: (SILVA, B. T., 2015).

Figura 8 – Valores relativos (%) deas populações e subpopulações de linfócitos e marcador de ativação (CD25<sup>+</sup>) em bezerros Holandeses dos 14 aos 240 dias de vida – São Paulo – 2015.



Fonte: (SILVA, B. T., 2015).

Legenda: (a) Linfócitos B expressando marcador CD21<sup>+</sup>; (b) linfócitos T (CD3<sup>+</sup>); Subpopulações CD4<sup>+</sup> (c), CD8<sup>+</sup> (d), CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> (e), WC1<sup>+</sup> (f); marcador de ativação de células T (CD25<sup>+</sup>) (g). Os valores de linfócitos são exibidos como dois pontos de dados separados, distribuídos uniformemente no eixo horizontal e, portanto, representam as oscilações dos valores individuais ao longo do tempo.

## 6 DISCUSSÃO

Esta pesquisa avaliou a dinâmica dos anticorpos específicos para as viroses respiratórias e as subpopulações de linfócitos no sangue de bezerros Holandeses do nascimento aos oito meses de idade. A avaliação permitiu identificar os momentos de maior susceptibilidade à DRB, precedida pela queda dos títulos de anticorpos maternos, que culminou no desenvolvimento da imunidade ativa pós-infecção natural.

### 6.1 ANÁLISES DO COLOSTRO

A análise do colostro, previamente selecionado pelo colostrômetro, foi realizada para comprovar a sua qualidade em relação a concentração de anticorpos, adotando-se como parâmetros o índice Brix (%) e concentração de proteína total (g/dL).

As amostras de colostro (100%) apresentaram índice Brix acima de 21%. Quigley e colaboradores indicaram o uso do refratômetro Brix para estimar a concentração de imunoglobulinas presentes no colostro devido a sua alta correlação com os teores de IgG determinados determinada pelo teste de imunodifusão radial ( $r=0,63$ ). Estes autores determinaram que a porcentagem Brix equivalente a 21% seria o ponto de corte ideal para distinguir colostro com baixa e boa qualidade ( $\geq 50$ -140 mg/mL de IgG).

A mensuração específica das imunoglobulinas presentes no colostro não foi realizada neste estudo devido a necessidade de importar reagentes e padronizar a reação. De acordo com Larsson (1992), as Igs presentes no colostro representam cerca de 70-80% dos teores de proteína total, assim foi determinada a concentração dessa substância no sobrenadante obtido após ultracentrifugação.

A separação do soro lácteo com a renina ou acidificação não foi adotada porque esses métodos eliminariam a caseína, substância que compõem a fração proteica do leite. A lacto-albumina não se coagula pela renina, ácidos ou calor.

Os teores de proteína total são apresentados em porcentagem (%), assim nossos dados foram convertidos de g/dL para % para facilitar a comparação com as concentrações registradas na literatura. A proporção média de proteína total obtida

nesta pesquisa foi de  $9,6 \pm 1,6\%$ , valores aproximados aos teores de 14,  $12,4 \pm 2,3$  e  $12,7 \pm 3,3\%$  relatados por Parrish et al., (1950), Elfstrand et al. (2002) e Morril et al. (2012), respectivamente. Contudo, os referidos estudos determinaram os valores de proteína total por diferentes métodos. O estudo de Parrish e colaboradores avaliaram a composição proteica do colostro subtraindo as percentagens de gordura e lactose dos valores de cinzas dos sólidos totais. Em contrapartida, Elfstrand et al. (2002) e Morril et al. (2012), utilizaram espectrofotômetro infravermelho após a retirada da fração de gordura do colostro. Em vista disso, acredita-se que as diferentes técnicas utilizadas podem ter influenciado de certa forma os valores de proteína total encontrados no colostro.

O refratômetro Brix apresentou forte correlação (94%) com os teores de proteína total (g/dL) do colostro. A correlação encontrada neste estudo foi maior que a observada por Quigley et al. (2013) entre o índice Brix e IgG ( $r=0,63$ ). Este achado pode ser justificado pelo princípio do Brix que é a mensuração de sólidos totais.

O teor de imunoglobulinas do colostro é refletida nas concentrações séricas dessas substâncias nos bezerros examinados entre 24 a 48 horas de vida. O limiar de IgG que corresponde a uma boa proteção imunológica é de 10 g/L (1000 mg/dL) (QUIGLEY, 2002). A presente pesquisa não avaliou os teores de proteína total no sangue dos bezerros, entretanto, os títulos de anticorpos específicos para as viroses foram determinados após a ingestão do colostro.

## 6.2 ANTICORPOS SÉRICOS

A transferência de anticorpos para BVDV, BoHV-1, BRSV e BPIV-3 após ingestão de colostro observada nesta pesquisa, conforme relatados internacionais (MENANTEAU-HORTA et al., 1985; MECHOR et al., 1987; KIMMAN et al., 1987; RIDPATH, 2003; KIRKPATRICK et al., 2008; ELLIS et al., 2010, 2014). Entretanto é válido ressaltar que estes dados não refletem o perfil encontrado no Brasil, no qual foram apresentados apenas alguns estudos para o BoHV-1 (HUBNER et al., 1996; GATTI et al., 2010) e outro realizado pela nossa equipe para BVDV e BoHV-1 (GOMES et al., 2014). A ausência de dados nacionais para as demais viroses, especialmente para BVDV, reflete-se na fraca resposta da maioria das vacinas

nacionais em gerar resposta imune humoral, e conseqüentemente a transferência de anticorpos das vacas aos recém-nascidos pode ser nula ou baixa (GOMES et al., 2013).

Os títulos de anticorpos obtidos após o manejo do colostro apresentaram grande variabilidade entre os estudos. Este fato pode estar relacionado com a variação antigênica das estirpes entre as propriedades examinadas (FULTON; BURGE, 2000), perfil imunológico das vacas ao final da gestação (MALLARD et al., 1997), e estados de hiperimunização, no qual o antígeno vacinal é capaz de reforçar a memória imunológica provocada pelo vírus de campo (LEMAIRE et al., 1994).

É válido lembrar que a vacina utilizada nas doadoras de colostro da presente pesquisa, era composta por antígenos vacinais inativados para o BVDV, vivos/termosensíveis para BoHV-1 e BPIV-3, e vivo/atenuado para BRSV. Assim, esperava-se que a transferência de anticorpos por imunidade passiva fosse menor para o BVDV devido à baixa imunogenicidade dos antígenos inativados que resultam em respostas de baixa intensidade e curta duração (KELLING, 2004).

Apesar dos fatores destacados à respeito da imunogenicidade das vacinas para o BVDV pode-se encontrar elevados títulos de anticorpos específicos após a colostragem dos bezerros. O título observado (12,3) foi superior aos valores de 9,4, 7,3 e 9,3, respectivamente, encontrados por Menanteau-Horta et al.(1985); Ridpath, (2003); Gomes et al., (2014). Os dados inesperados à respeito do BVDV pode se justificado pela hiperimunização dos animais devido à intensificação da vacinação e exposição natural ao BVDV detectada nesta pesquisa na triagem dos bezerros, pois dois animais eram soropositivos para o BVDV antes da ingestão do colostro.

Coria e McClurkin (1978) também encontraram bezerros soropositivos antes da ingestão de colostro em rebanho de vacas soropositivas e não vacinadas. Schefers et al. (2008) ressalta que o soro obtido antes da colostragem pode ser usado para a detecção precoce da BVDV em bezerras.

Os elevados títulos de anticorpos obtidos para o BoHV-1 (9) são levemente superiores aos valores de 8, 7, 6,7, respectivamente, relatados por Mechor et al. (1987), Gatti et al. (2010) e Gomes et al. (2014), mas bem superiores aos encontrados por Hubner et al. (1996) (5).

Os títulos de anticorpos encontrados para o BRSV (5) foram semelhantes inferiores aos valores de 6,1 e 5,7 relatados por Kirkpatrick et al. (2008) e Ellis et al. (2014). A variação dos títulos encontrados nos soro dos 19 bezerros após a

colostragem não está de acordo com os dados apresentados Kimman et al. (1987), que encontrou títulos de 1,8. A grande variabilidade dos títulos de anticorpos para BRSV pode ser decorrente da concentração de imunoglobulinas específicas no colostro, dependente do histórico e capacidade de resposta materna para essa virose em específico.

Observou-se títulos de anticorpos para o BPIV-3 (8,5) semelhantes aos resultados de 9,7 e 7,1 encontrados por Kirkpatrick et al. (2008) e Dawson (1996). Contudo, o último estudo avaliou esses valores em bezerros com uma semana de idade.

Esta pesquisa demonstrou o declínio gradual dos títulos de anticorpos para as viroses até os 240 dias de vida, exceto BRSV.

A meia-vida observada nesta pesquisa equivalentes a  $36,2 \pm 6,1$ ,  $50,7 \pm 18,0$ ,  $46,8 \pm 21,1$ , respectivamente, foram superiores aos períodos 23, 21 e 30 dias, respectivamente para BVDV, BoHV-1 e BPIV-3 relatados por Fulton et al. (2004). Os títulos de anticorpos para BRSV não obedeceram à linearidade do modelo de regressão, e, portanto, não foram avaliados.

O título mínimo protetor para BVDV proposto por Ridpath e Bolin (1995) é de  $\log_2 4$  (16). Nesta pesquisa, apenas o bezerro 3 exibiu título abaixo do citado aos 240 dias de vida, além disso, o perfil de anticorpos apresentados pelos bezerros desta pesquisa não são compatíveis de infecção natural para esta virose.

Pospisil et al. (1996) citou que a proteção para BoHV-1 estaria garantida com títulos acima de  $\log_2 5$  (32). Esta pesquisa discorda com o limiar referido, pois a maioria dos animais desta pesquisa, exceto bezerros 1 e 3, apresentavam títulos acima de  $\log_2 5$  aos 120 dias de vida (5 a 6) e desenvolveram perfil de anticorpos compatível com infecção natural aos 150 dias de vida.

Windeyer et al. (2015) verificou em seu estudo que bezerros apresentando títulos para BRSV e BPIV-3 inferiores a  $\log_2 5,5$  (45,25) haviam sido tratados para DRB. Nesta pesquisa pôde-se observar infecção natural ao vírus nos bezerros 1, 2 e 3 após a queda dos títulos de anticorpos maternos abaixo de  $\log_2 5,5$  (45,25) corroborando com os dados descritos pelos retro-referidos autores. Os bezerros 4 e 5 apresentaram pico precoce para títulos ACs para BRSV aos 74 dias de vida, fenômeno que pode ser associado com a infecção natural e doença branda devido as elevadas concentrações séricas de Igs específicas.

Para BPIV-3 observou-se queda gradual dos 14 aos 74 dias de vida, obtendo-se o primeiro pico de produção de ACs aos 90 dias, em seguida os valores foram constantes ou decrescentes, observando-se um segundo pico aos 210 dias para os bezerros 3 a 5. Apenas o bezerro 1 apresentou título inferior a  $\log_2 5,5$  (WINDEYER et al., 2015) a partir dos 74 dias de vida, entretanto os demais animais também apresentaram picos de produção ACs compatíveis com infecção natural. O segundo pico de produção de ACs aos 210 dias pode sinalizar para a fraca resposta com o contato primário com o vírus ao redor 74d de vida, provavelmente pela supressão da resposta imune ativa pelos anticorpos maternos.

O perfil de anticorpos e detecção de DRB nos bezerros 1, 2, 3 e 5 desta pesquisa entre 3-5 meses de idade, período que coincide com os picos de BRSV e BoHV-1, pode ser um indício que os títulos de anticorpos observados nesta pesquisa foram protetores até os três meses de idade.

O tempo para soronegatividade dos bezerros encontrados nesta pesquisa para o BVDV, BoHV-1 e BPIV-3 foram equivalentes a  $367,01 \pm 68,7$ ,  $239,67 \pm 66,88$  e  $303,36 \pm 60,15$ d, diferentes dos períodos de  $117,7 \pm 37,7$ ,  $65,1 \pm 37,8$  e  $183,8 \pm 100,0$ ;  $185,6 \pm 59,8$ ,  $122,9 \pm 46,6$  e  $190,6 \pm 58,3$ d; e  $5,5 \pm 1,7$ ,  $3,8 \pm 1,6$  e  $4,9 \pm 1,66$  meses apresentados por Kirkpatrick et al. (2001), Kirkpatrick et al. (2008) e Chamorro et al. (2014), respectivamente. Os bezerros deste estudo apresentaram maior persistência dos anticorpos maternos que os relatados na literatura internacional. Esses dados podem ser justificados pela elevada concentração de anticorpos observada nas primeiras 48 horas de vida, que já eram superiores aos encontrados nos retro-referidos trabalhos. Este fato comprova que a duração dos anticorpos maternos é diretamente proporcional ao nível sorológico de anticorpos específicos ingeridos e absorvidos a partir de colostro (MUNOZ-ZANZI et al., 2002; KIRKPATRICK et al., 2008), sendo que quanto maior o nível, maior a duração na circulação sanguínea (MUNOZ-ZANZI et al., 2002).

Diante do exposto, podemos sustentar a hipótese de que a proteção passiva adquirida após a mamada do colostro protegeu os bezerros da doença clínica até os 74-90d de vida, especialmente para BRSV e BPIV-3. A partir dos 4 meses de vida os bezerros começaram a desenvolver imunidade ativa por exposição natural para BoHV-1.

### 6.3 POPULAÇÕES E SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS

Os resultados apresentados pelas populações e subpopulações de linfócitos não revelaram diferenças entre os momentos avaliados. Apesar disso, foi observada um importante aumento nos valores relativos das subpopulações  $CD4^+$ ,  $CD8^+$  e  $CD3^+CD4^-CD8^-$  principalmente aos 74-90d, período que antecede o início da queda dos anticorpos maternos específicos. Esse resultado não é reforçado pelos demais estudos, que encontraram constante queda dos valores de população T e suas subpopulações (AYOUB; YANG, 1996; KULBERG et al., 2004). Wilson et al. (1996) demonstrou aumento aos 60 d somente para as populações gamma-delta e citotóxicos. Kampen et al. em estudo realizado 10 anos mais tarde (2006), detectou a mesma elevação das subpopulações T no período de 6-8 semanas de idade.

De acordo com Murphy, Travers e Walport (2010), as respostas imunes mediadas por células ocorrem principalmente pela liberação de citocinas, classificadas tradicionalmente em Th1, Th2 ou Th17, que irão direcionar as vias para proliferação de linfócitos e citotoxicidade direta. Na maioria dos casos, o pico de atividade destas respostas celulares ocorre em 7-10 dias pós-infecção, momento em que a detecção de anticorpos ainda não é significativa, mas há estimulação de linfócitos T auxiliares  $CD4^+$  e  $CD8^+$ , para atividade citotóxica (TIZARD, 2008).

A subpopulação  $CD4^+$  exibiu valores bem inferiores aos encontrados por Ayoub e Yang (1996), mas semelhante aos de Kampen et al. (2006). Essas células exibiram ainda uma importante queda de seus valores dos 90-120d. Após este período foi marcado pela elevação de anticorpos específicos ao BRSV e BoHV-1 em todos os bezerros.

O linfócito T  $CD8^+$ , por sua vez, exibiram ligeiro aumento aos 74d em todos os bezerros. Contudo aos, 150 d, houve pico de valores de  $CD8^+$  verificado nos bezerros 4 e 5. Vale lembrar que aos 74d foi verificado um aumento de títulos ACs para BRSV e BoHV-1 nos referidos bezerros, fenômeno que pode reforçar a hipótese de infecção natural por este agente. As células auxiliares são responsáveis pela modulação da resposta imune específica por meio da liberação de citocinas com padrões distintos de resposta celular (Th1) ou humoral (Th2). Já as células  $CD8^+$  se ligam às moléculas do MHC de classe I em células anormais ou infectadas por vírus (TIZARD, 2008). Nos estudos de Wilson et al. (1996) e Kampen et al. (2006),

subpopulações CD8<sup>+</sup> se mantiveram estáveis ao longo do período estudado. Em ambas as subpopulações CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, houve um ligeiro aumento aos 180d e novamente aos 240d, momento este que pode sugerir a transição da imunidade materna para um efetivo amadurecimento imunológico dos bezerros (CORTESE, 2009).

As células gamma-delta representam a maior população de linfócitos na circulação periférica de ruminantes, e possui características relacionadas ao reconhecimento do antígeno, além de possuir ações efectoras semelhantes aos linfócitos citotóxicos. Pollock e Welsh (2002) sugerem que a elevação das proporções de células T gamma-delta no sangue de bezerros pode estar envolvida na intensificação da resposta Th1, demonstrando a importância da ativação da RI específica dos bezerros na fase inicial de suas vidas. O marcador de células gamma-delta utilizado neste estudo foi o WC1<sup>+</sup>. Contudo, ao analisar os valores encontrados, observou-se que os valores estavam muito abaixo dos estabelecidos por Wilson et al. (1996) e Kampen et al. (2006). Dessa forma, optou-se por analisar a devida população subtraindo-se as subpopulações citotóxicas e auxiliares do valor da população T. O período de susceptibilidade que correspondeu aos aumentos de anticorpos específicos e células TCD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> (74-90), novamente foi demonstrado, agora pela subpopulação gamma-delta. Houve leve aumento nos valores (%) dessa subpopulação até os 240d, o que contraria os achados de Wilson et al (1996). Kampen et al. (2006) demonstrou uma constância na proporção de células gamma-delta até a 29ª semana de idade.

As proporções de CD25<sup>+</sup> se mantiveram elevadas até o período de 74d, momento em que começou a exibir queda na sua ativação. Houve ligeiro aumento dessa expressão aos 150d, período correspondente ao aumento dos anticorpos específicos aos vírus avaliados, o que pode sugerir o período inicial da resposta imune ativa dos bezerros. Reber et al. (2008) não encontrou porcentagens de linfócitos expressando CD25<sup>+</sup> acima de 14% em seus bezerros avaliados até os 30 dias de idade. Ayoub e Yang (1996) encontraram valores medianos de  $4-6 \times 10^6$  células/mL até os seis meses de idade. A partir desse momento, os valores passaram a variar de  $6-16 \times 10^6$  células/mL. Esses dados diferem dos nossos achados, visto que a proporção até os seis meses de idade variou de  $5-20 \times 10^6$  células/mL, mas a partir dos 180d variou de  $11-14 \times 10^6$  células/mL, semelhante ao estudo em questão. Talvez o estabelecimento das infecções respiratórias encontradas até os 120d tenha

exercido influência na ativação dos linfócitos dos bezerros no período inicial. Contudo, não foi possível avaliar a ativação específica dos linfócitos neste estudo, pois houve marcação apenas da população T total.

Embora não tenha sido avaliada neste estudo, é possível encontrar na literatura estudos que demonstraram a dinâmica da imunidade celular local. A pesquisa de Batista et al. (2012), avaliou períodos de maior susceptibilidade no sistema imune inato de bezerros por meio de lavados bronco-alveolares. Os macrófagos alveolares foram identificados pela expressão do marcador CD14 e foram submetidos à avaliação funcional por meio de fagocitose (*Staphylococcus aureus* coradas com iodeto de propídio e *Escherichia coli*). Os animais demonstraram uma marcada redução da capacidade de fagocitose entre a terceira e quinta semanas de vida. Este momento ainda é caracterizado pela imunidade colostrar, o que é extremamente importante para prevenção de doenças. Após a sexta semana de vida, com o declínio da imunidade colostrar, houve um aumento da fagocitose, porém não em sua capacidade máxima. Assim, o referido estudo demonstrou que este período pode corresponder a janela de susceptibilidade do animal as infecções, o que corrobora com nossos achados.

Embora sem diferenças estatísticas, houve um aumento na proporção de linfócitos B CD21<sup>+</sup> até ao longo do tempo, com maior predomínio até os 90d. O estudo de Kampen et al. (2006), encontrou um aumento constante para valores relativos de células B até os seis meses de idade. Os desafios antigênicos da presente pesquisa podem ter refletido nessa resposta imune encontrada. Aos 180d houve novamente um aumento marcado dessas proporções, o que reforça a hipótese da transição para a resposta imune ativa também observada nas outras populações linfocitárias. Um linfócito B apropriadamente estimulado irá dividir repetidas vezes e sua progênie irá se diferenciar ao longo de uma ou duas vias. Uma população aumenta sua taxa de síntese, secreta grande quantidade de imunoglobulinas e se diferencia em plasmócitos. Essas células são essenciais para a rápida produção de anticorpos e a proteção precoce (TIZARD, 2008).

## 7 CONCLUSÕES

Com base nos dados obtidos pode-se concluir:

- a) Com exceção do BVDV, a imunidade passiva colostrar demonstrou queda e soronegatividade antes dos oito meses de idade;
- b) Uma janela de susceptibilidade a partir dos 74d pôde ser determinada especialmente ao BRSV e BPIV-3, em vista do comportamento dos anticorpos específicos e subpopulações de linfócitos quando associados as manifestações clínicas encontradas;
- c) As oscilações observadas no perfil linfocitário dos bezerros acompanharam as respostas observadas nos anticorpos específicos;
- d) As populações de linfócitos B apresentaram acréscimo em suas proporções ao final dos oito meses de idade, período determinante para início da resposta imune ativa dos bezerros.

**CAPÍTULO 2 – INFLUÊNCIA DOS ANTICORPOS MATERNOS NA RESPOSTA  
IMUNE INDUZIDA PELA VACINAÇÃO EM BEZERROS HOLANDESES**

## 8 INTRODUÇÃO

A prática da vacinação de bezerras está vinculada à sua vulnerabilidade à Doença Respiratória Bovina (DRB), dependentes dos títulos de anticorpos maternos adquiridos por imunidade passiva (WINDEYER et al., 2015). Assim, a DRB pode ser precoce e atingir 7,7% a 9,5% das bezerras entre a segunda semana e o terceiro mês de vida, resultando no tratamento de 21,9% (630/2874) desses animais (WINDEYER et al., 2013).

A interface entre a imunidade passiva e ativa nos bezerros representa o principal fator de risco para as broncopneumonias, pois a queda dos títulos de anticorpos maternos tornam permissiva a infecção e proliferação das viroses respiratórias que comprometem o sistema imune do hospedeiro e culmina em infecções causadas por *Mycoplasma spp.*, *Histophilus somni*, *Pasteurella multocida* e *Mannheimia haemolytica* (ACKERMANN; DERSCHEID; ROTH, 2010).

Os anticorpos maternos remanescentes, apesar de não protegerem, exercem efeito supressor no desenvolvimento da imunidade humoral induzida pela vacinação. Os títulos de anticorpos para as viroses respiratórias não aumentam na presença de elevadas concentrações séricas de anticorpos advindos do colostro (MENANTEAU-HORTA et al., 1985; WEST et al., 1999; ELLIS et al., 2001; FULTON et al., 2004; PLATT et al., 2009; SLUIJS; KUHN; MAKOSCHEY, 2010). Modificações na composição das vacinas e vias de aplicação nasal e subcutânea (WOOLUMS et al., 2013) não apresentaram resultados satisfatórios, pois não estimularam imunidade humoral ativa em bezerros recém-nascidos.

Recentemente, pôde-se comprovar que os anticorpos maternos não exercem efeitos sobre a resposta imune celular. Exposições experimentais e vacinas contendo o vírus vivo para o BVDV e BRSV estimulam resposta imune mediada por células, observando-se respostas das células T citotóxicas CD8<sup>+</sup> e gamma-delta WC1<sup>+</sup> (RIDPATH et al., 2003; ENDSLEY et al., 2004; PLATT et al., 2009; SLUIJS; KUHN; MAKOSCHEY, 2010).

Pesquisas nacionais considerando as condições de criação brasileira à respeito do efeito dos anticorpos maternos na indução da resposta imune em bezerros ainda não foram conduzidos. Neste contexto, ressalta-se que as cepas de BVDV inativadas permitidas nas vacinas comercializadas no Brasil, e a ausência de reações cruzadas

entre cepas nacionais e estrangeiras, alerta para o uso cauteloso dos estudos internacionais para o estabelecimento de protocolos de vacinação em nosso país.

Diante do cenário apresentado, a hipótese deste estudo é que anticorpos maternos circulantes interferem na resposta imune pós-vacinal. Assim, o objetivo desta pesquisa foi avaliar a influência dos anticorpos maternos na resposta imune para as viroses respiratórias induzida pela vacinação.

## 9 MATERIAL E MÉTODOS

### 9.1 OBTENÇÃO DOS BEZERROS

Foram selecionados 30 recém-nascidos machos da raça Holandesa oriundos de duas fazendas: Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA) – unidade Gado de Leite (n=5) e Fazenda Colorado (n=25), localizadas respectivamente nas cidades de Nova Odessa e Araras, no interior do estado de São Paulo.

Em ambas as propriedades, os partos foram acompanhados para assistência aos recém-nascidos e controle do manejo de colostro. A vitalidade dos bezerros foi avaliada por meio do escore APGAR (Quadro 4), como proposto por Rodrigues (2008).

Quadro 4 - Escore para avaliação da viabilidade do bezerro recém-nascido pela escala de APGAR – São Paulo - 2015

Critérios de avaliação	Escore		
	0	1	2
Frequência cardíaca	Ausente	Bradycardia/Irregular	Normal/Regular
Esforço respiratório	Ausente	Irregular	Regular
Tônus muscular	Flacidez	Alguma flexão	Flexão
Irritabilidade reflexa	Ausente	Algum movimento	Hiperatividade
Coloração de mucosas	Cianóticas	Hipocoradas	Normocoradas

Fonte: (RODRIGUES, 2008).

Legenda: Satisfatório - Soma > 7

A antissepsia do umbigo foi realizada logo após o nascimento, pela imersão completa do cordão umbilical em recipiente contendo tintura de iodo a 10% por pelo menos 1 minuto e meio, repetindo-se o processo após 12 horas. A seguir, repetiu-se o processo com tintura de iodo a 5% duas vezes ao dia até mumificação do cordão umbilical.

## 9.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Este estudo adotou como critério de inclusão a soronegatividade dos bezerros para as viroses respiratórias e PCR negativo para BVDV ao nascimento. Assim, as amostras de soro sanguíneo e sangue total foram obtidos antes da mamada de colostro e encaminhadas para processamento no Laboratório de Viroses de Bovídeos do Instituto Biológico. Neste estudo foram excluídos dois bezerros devido à soropositividade na soroneutralização para BVDV em consequência de infecção fetal.

## 9.3 COLOSTRAGEM

Os recém-nascidos receberam colostro obtido de doadoras de colostro imunizadas com vacina comercial<sup>17</sup>, contendo estirpes de BVDV do tipo 1 (5960) e tipo 2 (53637) inativadas; BoHV-1 (Cooper) e BPIV-3 (RLB 103) vivos/termosensíveis; BRSV (375) vivo/atenuado, além de *Leptospira canicola*, *L. grippotyphosa*, *L. hardjo*, *L. icterohaemorrhagiae* e *L. pomona* inativadas, associadas a Quil A, colesterol, e Amphigen como adjuvantes. A triagem do colostro foi realizada após a primeira ordenha das doadoras com o auxílio de colostrômetro (IgG $\geq$ 5.000 mg/dL). O colostro foi identificado e congelado a -20°C em alíquotas de 2 litros.

Os bezerros receberam quatro litros de “pool” de colostro por meio de mamadeira e/ou sondagem esofágica, dividido em duas amamentações de dois litros cada, administrada nas primeiras doze horas pós-nascimento (p.n.).

---

<sup>17</sup>Cattle Master Gold FP5 + L5®, Zoetis , São Paulo-SP, Brasil.

## 9.4 ISOLAMENTO E MANUTENÇÃO

Os animais foram mantidos na fazenda de origem até os 15 dias de vida, e posteriormente foram transferidos para a Clínica de Bovinos e Pequenos Ruminantes (CBPR) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP).

Na fazenda de origem os animais permaneceram em instalação compartilhada (10x5m) e coberta, com no máximo seis animais. O local da instalação era previamente lavado com água e sabão neutro. Após seco, o local era desinfetado com o uso de cal virgem. A cama utilizada era composta por feno proveniente da fazenda. Havia boa ventilação no local e o uso era exclusivo para criação dos animais do experimento, sendo permitida a entrada somente de pessoas autorizadas.

Na CBPR, os bezerros foram criados dois a dois em baias compartilhadas de aproximadamente 5x5m. O regime de desinfecção foi modificado neste momento. As baias eram lavadas com água, sabão neutro e hipoclorito de sódio. Após enxague, era realizada desinfecção por meio de vassoura de fogo em paredes, chão, comedouro e bebedouros. Somente após este processo os animais eram inseridos no local. A cama das baias era composta por maravalha, sendo repostas pelos funcionários da CBPR cerca de duas vezes ao dia para remoção dos dejetos. O processo de lavagem e desinfecção era repetido a cada 30 dias.

Os bezerros foram alimentados com 6L de sucedâneo lácteo<sup>18</sup> por dia, ração peletizada<sup>19</sup>, sal mineral e água “*ad libitum*” até o desmame.

Aos dois meses de idade iniciou-se o desmame gradual dos bezerros, com duração de sete dias consecutivos. No momento do desmame, os bezerros estavam ingerindo 1.000 gramas de ração ao dia observando-se aumento gradual do consumo até o fornecimento máximo de três Kg ao dia. Após o desmame, os animais foram mochados, tão logo que passasse o estresse pós-desmame, mas que também não prejudicasse as avaliações subsequentes.

Durante a criação dos bezerros, quatro morreram devido a DRB (n=2) e clostridiose (n=2).

---

<sup>18</sup>Sprayfo Violeta®, Sloten do Brasil Ltd, Santos - SP, Brasil

<sup>19</sup>Agromix®, Jaboticabal-SP, Brasil

## 9.5 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os bezerros recém-nascidos selecionados foram distribuídos aleatoriamente entre quatro grupos experimentais: G1 – vacinado aos 14d e *booster* aos 44d; G2 – vacinado aos 90d e *booster* aos 120d; G3 – vacinado aos 180d e *booster* aos 210d e grupo controle não vacinado (Quadro 5). Os bezerros foram vacinados com a mesma vacina comercial empregada para imunização das doadoras de colostro, sendo administrada duas doses de 5mL por via subcutânea na região da tábua do pescoço (Figura 9). O grupo controle foi constituído por animais não vacinados, do nascimento até os oito meses de idade. Os animais selecionados, com suas respectivas identificações, datas de nascimento e grupos experimentais estão discriminados no Quadro 6.

Quadro 5- Protocolo de vacinação empregado para a imunização dos grupos experimentais – São Paulo - 2015

<b>Grupos Experimentais</b>	<b>Grupo 1 (G1)</b>	<b>Grupo 2 (G2)</b>	<b>Grupo 3 (G3)</b>
1ª Dose da vacina	14 dias pós-nascimento (p.n.)	90 dias p.n	180 dias p.n.
2ª Dose da vacina	44 dias p.n	120 dias p.n	210 dias p.n.

Fonte: (SILVA, B. T., 2015).

Quadro 6– Apresentação dos grupos experimentais segundo a sua identificação, data de nascimento e procedência – São Paulo - 2015

<b>Grupos experimentais</b>	<b>Identificação do experimento</b>	<b>Data de nascimento</b>	<b>Fazenda</b>
G1	1	21/11/2014	Colorado
	2	21/11/2014	
	3	02/12/2014	
	4	02/12/2014	
	5	02/12/2014	
	6	02/12/2014	
G2	7	29/07/2013	Colorado
	8	29/07/2013	
	9	29/07/2013	
	10	29/07/2013	
	11	21/11/2014	
G3	12	06/10/2014	Colorado
	13	06/10/2014	
	14	06/10/2014	
	15	16/06/2012	APTA
	16	18/06/2012	
	17	24/06/2012	
	18	26/06/2012	
	19	27/06/2012	
	Controle	20	14/03/2014
21		14/03/2014	
22		14/03/2014	
23		06/10/2014	
24		06/10/2014	

Fonte: (SILVA, B. T., 2015).

Legenda: G1 - bezerros primo-vacinados aos 14 dias de vida; G2 - bezerros primo-vacinados aos 90 dias de vida; G3 - bezerros primo-vacinados aos 180 dias de vida; controle - bezerros não-vacinados.

Figura 9 – Vacinação de bezerros com vacina comercial polivalente– São Paulo - 2015



Fonte: (SILVA, B. T., 2015).

## 9.6 COLHEITA DE AMOSTRAS

Amostras de sangue foram colhidas nos dias de primovacinação, antes do reforço, e 30 dias após reforço, conforme ilustrado no Quadro 7. Estas amostras foram obtidas em tubos contendo EDTA, com capacidade de 4mL, para realização do leucograma e avaliação das subpopulações de linfócitos sanguíneos; e em tubos sem anticoagulante para obtenção do soro sanguíneo para a soroneutralização. As avaliações sanguíneas do grupo controle foram pareadas com as colheitas dos bezerros pertencentes aos grupos G1 a G3.

Quadro 7 - Momentos padronizados para colheitas das amostras de sangue e soro de bezerros dos grupos vacinados e controles - São Paulo – 2015.

Gs	<b>Momentos das colheitas dos grupos experimentais e controles</b>		
	<b>T0</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>
G1 e CG1	14 dias p.n.	44 dias p.n.	74 dias p.n.
G2 e CG2	90 dias p.n.	120 dias p.n.	150 dias p.n.
G3 e CG3	180 dias p.n.	210 dias p.n.	240 dias p.n.

Fonte: (SILVA, B. T., 2015).

Legenda: G1 - bezerros primo-vacinados aos 14 dias de vida; G2 - bezerros primo-vacinados aos 90 dias de vida; G3 - bezerros primo-vacinados aos 180 dias de vida; controle - bezerros não-vacinados.

## 9.7 PROVAS LABORATORIAIS

### 9.7.1 Soroneutralização

A técnica de soroneutralização (SN) foi realizada de acordo com a OIE (2013). Para tanto, foram utilizadas placas de poliestireno de 96 cavidades, utilizando uma diluição constante do soro, na base logarítmica 2, a partir das diluições 1:4 (BVDV-NADL), 1:2 (BoHV-1), 1:2 (BRSV) and 1:2 (BPIV-3), tendo como diluente o meio de cultivo celular MEM (*Minimum Essential Medium*) contendo 1 a 2% de antibióticos.

Feita a diluição das amostras, foi adicionado à placa 50 µL da solução contendo TCID<sub>50/100µL</sub> (50% *tissue culture infective doses*) de BVDV, BRSV e BPIV-3. Em seguida, as placas foram incubadas por uma hora em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Para o BoHV-1, foi adicionado à placa 100 µL da solução contendo TCID<sub>50/100µL</sub> e as placas foram incubadas por 18-24 horas em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Após este período, suspensão de células MDBK (*Madin-Darby Bovine Kidney*) foram adicionadas em cada cavidade das placas. Novamente a placa foi incubada em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> durante 4 a 5 dias.

A infectividade foi indicada pelo “Efeito Citopático” (ECP) visível na monocamada celular em placas, em microscópio invertido. O título de anticorpos foi expresso como a maior diluição do soro que inibiu completamente a infectividade e conseqüentemente o ECP em ambas as cavidades de cada diluição. A potência do vírus foi observada na retrotitulação através do cálculo do título, de acordo com Reed e Muench (1938). Vale ressaltar que a soronegatividade dos bezerros foi considerada segundo estudo de Fulton et al (2004), adotando titulação de 1:4 para BVDV, BRSV e BPIV-3 e 1:10 para BoHV-1 como níveis indetectáveis na SN.

### 9.7.2 Subpopulações de Linfócitos

O número total de leucócitos foi mensurado através da contagem automática<sup>20</sup> e a contagem diferencial de linfócitos foi realizada pela avaliação dos esfregaços sanguíneos.

As subpopulações dos linfócitos sanguíneos foram determinadas por citometria de fluxo, segundo painel de anticorpos monoclonais específicos para receptores de superfície celular (Quadro 2 – Capítulo 1).

Foram transferidos 100µL de sangue total com EDTA, para tubos específicos. A lise dos eritrócitos foi realizada pela adição de 900µL de solução comercial seguindo-se a metodologia descrita pelo fabricante (*Facslysing*<sup>21</sup>). Foram realizadas marcações simples e duplas adicionando-se 100 µL de anticorpos monoclonais diluídos, incubadas por 30 minutos a 4°C, em seguida, as células foram lavadas três vezes com *Phosphate Buffered Saline* (PBS). Por fim, foram adicionados os anticorpos secundários fluorescentes, incubados por 30 minutos, em ambiente escuro, a 4°C.

As leituras das amostras foram realizadas em citômetro de fluxo<sup>22</sup> utilizando-se o *software* Cellquest, sendo adquiridos cinqüenta mil eventos no *gate* de linfócitos por amostra. A análise dos eventos adquiridos foi realizada em software específico<sup>23</sup>, e os resultados obtidos foram expressos como porcentagem (%) de células marcadas para cada receptores de superfície celular. A população gamma-delta foi estimada subtraindo-se as subpopulações T CD8<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup> do total de células T CD3<sup>+</sup>.

O número absoluto de cada subpopulação de linfócito foi calculado multiplicando-se as porcentagens das subpopulações pelo número total de linfócitos/µL de sangue obtido a partir do leucograma.

---

<sup>20</sup> ABC Vet® - ABXTM

<sup>21</sup> BD número catálogo349202

<sup>22</sup> FACSCalibur™, BD Biosciences, San Jose, CA

<sup>23</sup> FlowJo®, versão 7.2.5, Becton Dickinson Immunocytometry System®, San Diego, CA

## 9.8 ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa estatístico SPSS 19.0 (IBM Corp. Released 2011. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 19.0. Armonk, NY: IBM Corp.). As análises foram consideradas significativas quando  $P \leq 0,05$ , com tendências  $P \leq 0,10$ .

Primeiramente, todas as variáveis em todos os tempos foram testadas quanto a aderência a distribuição normal pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Com este teste, constatou-se que os títulos de anticorpos ( $\log_2$ ) para as viroses respiratórias e as subpopulações de linfócitos não apresentaram distribuição normal, em contrapartida, os dados relativos e absolutos para os linfócitos totais apresentaram distribuição paramétrica.

Os valores relativos e absolutos dos linfócitos totais estão apresentados em médias e desvios-padrão. Além disso, os dados relativos a este parâmetro foram submetidos à análise por ANOVA de medidas repetidas considerando os fatores grupo experimental e tempo.

Os valores relativos e absolutos para as subpopulações de linfócitos estão apresentados em medianas, valores mínimos e máximos. As diferenças entre cada grupo vacinado com o seu respectivo controle foram detectadas pelo Teste U de Mann-Whitney. As diferenças entre os momentos de avaliação foram obtidas pelo teste de Friedman. A este último teste, quando apresentou pelo menos um tempo significativamente diferente, realizou-se comparações múltiplas por meio do teste de Wilcoxon ( $P \leq 0,0167$ ).

Os resultados dos títulos de anticorpos foram transformados em variáveis qualitativas pela presença e ausência de títulos de Acs neutralizantes. Desta forma, os testes com títulos de anticorpos neutralizantes abaixo e acima de 1:4 para BVDV, BRSV e BPIV-3 e 1:10 para BoHV-1 foram considerados negativos e positivos, respectivamente (FULTON et al., 2004). A comparação entre as frequências dos resultados entre os grupos vacinados e controle foi realizada pelo teste do Qui-quadrado.

Para a análise quantitativa, os títulos de anticorpos foram transformados em  $\log_2$  para análise estatística e comparação das medianas entre os grupos vacinados e controles pelo teste U de Mann-Whitney. Posteriormente, foram calculado os valores

em  $\log_2$  foram transformados em antilog (base 2) pela relação:  $\text{GMT} = 2^a$ , onde "a" é a mediana do log do título de anticorpos. A avaliação dos títulos ao longo do tempo também foi realizada pelo teste de Friedman associado ao Wilcoxon com correção de Bonferroni ( $P \leq 0,0167$ ).

## 10 RESULTADOS

A pesquisa em questão avaliou a influência dos anticorpos advindos do colostro na resposta imune vacinal de bezerros Holandeses, por meio de avaliações da resposta imune humoral e celular.

### 10.1 RESPOSTA HUMORAL INDUZIDA PELA VACINAÇÃO

As frequências de animais soropositivos e soronegativos para as viroses de acordo com o protocolo de vacinação empregado estão dispostas na tabela 5.

De acordo com as frequências, pudemos observar para o BVDV que houve soropositividade de 100% dos animais dos grupos G1 e G2 no T0, fato esse que foi mantido após estímulo vacinal em T1 e T2. Assim, pode-se verificar que os resultados foram constantes (NA) e não apresentaram diferenças significativas pelo teste do Qui-quadrado. Os bezerros do CG3 (100%) mantiveram-se soropositivos do T0 ao T2, enquanto os bezerros do G3 apresentava baixa frequência de soropositivos no T0 (2/8 – 25%), T1 (4/8 – 50%) e T2 (5/8 - 75%), observando-se diferenças entre os grupos ( $P=0,01$ ) no T0, tendência em T1 ( $P=0,06$ ) e em T2 ( $P=0,12$ ).

Para o BoHV-1, observou-se 100% de bezerros soropositivos no G1 e CG1 do T0 ao T2, não sendo possível observar diferenças entre as frequências em relação aos grupos. O CG2 e G2 também apresentaram frequências de animais soropositivos semelhantes, observando-se pequenas variações ao longo do estudo no qual a maioria dos animais permaneceram soropositivos do T0 ao T2. Os bezerros pertencentes ao G3 eram em sua maioria soronegativos em T0 (6/8 - 75%) e T1 (7/8 - 87,5%), enquanto 100% (5/5) eram soronegativos em CG3. Não foi possível observar diferenças entre esses grupos para os tempos T0 ( $P=0,22$ ) e T1 ( $P=0,41$ ). Entretanto, diferenças foram obtidas após a segunda dose da vacina, observando-se que apenas 1/8 (12,5%) animal permaneceu soronegativo no G3 e todos mantiveram-se soronegativos em CG3, assim foi possível detectar diferenças estatísticas entre os grupos ( $P=0,01$ ).

O comportamento dos bezerros para o BRSV também foi semelhante entre

CG1 e G1 no T0 ( $P=0,62$ ), T1 (0,89) e T2 (0,62), sendo que a maioria dos animais eram soropositivos ao longo do estudo. Apesar deste fato, é válido ressaltar que 2/6 (33,33%) bezerros do G1 e 1/5 (20%) bezerro do CG1 já eram soronegativos no início do estudo aos 14 dias de vida. O grupo CG2 e G2 apresentaram 2/5 (40%) e 4/5 (80%) bezerro soronegativos no início do experimento (T0) ( $P=0,2$ ). Este perfil apresentou pequenas variações ao longo do estudo não sendo possível detectar diferenças entre os grupos em T1 ( $P=0,11$ ) e T2 ( $P=0,2$ ). Para o grupo G3 e CG3, foi possível verificar diferença significativa apenas em T2 ( $P=0,05$ ), visto que o grupo vacinado apresentou 100% (8/8) dos animais soropositivos e o grupo controle apenas 60% (3/5).

As frequências de animais soropositivos para o BPIV-3 foi de 100% em G1 e CG1 em T0, portanto, não exibiram diferenças entre si (NA). Diferenças para o CG2 e G2 foram detectadas no T0, no qual 3/5 (60%) dos bezerros eram soronegativos no T0, enquanto no controle CG2 todos os animais eram soropositivos ( $P=0,04$ ). Nos momentos subsequentes (T1= 0,29 e T2= 0,11), as taxas de animais soropositivos tornaram-se semelhantes, pois alguns bezerros do G2 responderam à vacinação. Ao início do experimento os bezerros do CG3 (100%) eram soropositivos para BPIV-3 e no G3 havia 5/8 (62,5%) soropositivos. Os bezerros do grupo vacinado G3 responderam ao protocolo vacinal observando-se diferenças entre as frequências de soropositivos em T1 ( $P=0,06$ ) e T2 ( $P=0,07$ ).

Os títulos de anticorpos ( $\log_2$ ) ou antilog (base 2) obtidos do T0 ao T2 para os grupos vacinados e não vacinados estão apresentados na tabela 6 e figura 10.

Os títulos foram decrescentes para todas as viroses do T0 ao T2 em G1 e CG1, sendo assim não foi possível detectar diferenças entre os bezerros vacinados e controle ( $P \geq 0,05$ ).

No CG2 e G2 foi possível observar títulos constantes para o BVDV em ambos os grupos no T0 ( $P=0,16$ ), T1 ( $P=0,17$ ) e T2 ( $P=0,21$ ). Os títulos para o BRSV também foram constantes ao longo do estudo em ambos os grupos experimentais ( $P \geq 0,05$ ). Apesar da ausência de diferenças estatísticas pôde-se verificar aumento dos títulos de anticorpos para o BoHV-1 e BPIV-3 no grupo de animais vacinados ao longo do estudo.

O grupo G3 foi o que mais apresentou variação ao longo do tempo, sendo possível verificar aumento dos títulos de anticorpos de anticorpos para todas as viroses após o protocolo de vacinação, sendo possível detectar diferenças entre os

grupos G3 e CG3 para BoHV-1 em T2 ( $P=0,01$ ), BRSV em T0 ( $P=0,04$ ) e T2 ( $P=0,01$ ) e BPIV-3 em T2 ( $P=0,05$ ).

Os títulos individuais obtidos para cada virose pode ser visualizado nas tabelas 7 a 10.

A comparação entre os tempos T0, T1 e T2, revelou algumas diferenças estatísticas, porém não foi possível encontrar diferenças na comparação múltiplas entre os momentos no teste de Wilcoxon com correção de Bonferroni ( $P>0,0167$ ). Para o BVDV, a diferença entre os tempos foi observada para o grupo G1 ( $P=0,01$ ), CG1 ( $P=0,01$ ) e CG3 ( $P=0,05$ ). Para BoHV-1, a diferença encontrada foi em G1 ( $P=0,01$ ), CG2 ( $P=0,05$ ) e G3 ( $P=0,01$ ). O BRSV não exibiu diferenças entre seus momentos avaliados ( $P>0,05$ ). Contudo, o BPIV-3 apresentou significâncias em G1 ( $P=0,01$ ), CG1 ( $P=0,01$ ), CG2 ( $P=0,05$ ) e CG3 ( $P=0,05$ ).

Tabela 5 – Frequência de bezerros Holandeses soropositivos para as viroses respiratórias em grupos vacinados e controle – São Paulo – 2015.

Vírus	T	R	Grupos experimentais														
			G1		CG1		P	G2		CG2		P	G3		CG3		P
			N	%	N	%		N	%	N	%		N	%	N	%	
BVDV	T0	+	6	100	5	100	NA	5	100	5	100	NA	2	25	5	100	0,01
		-	0	0	0	0		0	0	0	6		75	0	0		
	T1	+	6	100	5	100	NA	5	100	5	100	NA	4	50	5	100	0,06
		-	0	0	0	0		0	0	4	50		0	0			
	T2	+	6	100	5	100	NA	5	100	5	100	NA	5	62,5	5	100	0,12
		-	0	0	0	0		0	0	3	37,5		0	0			
BoHV-1	T0	+	6	100	5	100	NA	4	80	4	80	0,29	2	25	0	0	0,22
		-	0	0	0	0		1	20	1	20		6	75	5	100	
	T1	+	6	100	5	100	NA	3	60	5	100	0,49	1	12,5	0	0	0,41
		-	0	0	0	0		2	40	0	0		7	87,5	5	100	
	T2	+	6	100	5	100	NA	4	80	5	100	0,29	7	87,5	0	0	0,01
		-	0	0	0	0		1	20	0	0		1	12,5	5	100	
BRSV	T0	+	4	66,7	4	80	0,62	1	20	3	60	0,2	6	75	2	40	0,21
		-	2	33,3	1	20		4	80	2	40		2	25	3	60	
	T1	+	5	83,3	4	80	0,89	0	0	2	40	0,11	5	62,5	3	60	0,93
		-	1	16,7	1	20		5	100	3	60		3	37,5	2	40	
	T2	+	4	66,7	4	80	0,62	1	20	2	40	0,2	8	100	3	60	0,05
		-	2	33,3	1	20		4	80	3	60		0	0	2	40	
BPIV-3	T0	+	6	100	5	100	NA	2	40	5	100	0,04	5	62,5	5	100	0,12
		-	0	0	0	0		3	60	0	0		3	37,5	0	0	
	T1	+	6	100	5	100	NA	4	80	5	100	0,29	4	50	5	100	0,06
		-	0	0	0	0		1	20	0	0		4	50	0	0	
	T2	+	6	100	5	100	NA	3	60	5	100	0,11	7	87,5	2	40	0,07
		-	0	0	0	0		2	40	0	0		1	12,5	3	60	

Fonte: (SILVA, B. T., 2015).

Legenda: T - tempos; R - resultados; NA - Resultados constantes; CG - controle não vacinado; G1 - T0 – 14, T1 - 44, T2 – 74 dias de vida; G2 - T0 – 90, T1 - 120, T2 – 150 dias de vida; G3 - T0 – 180, T1 - 210, T2 – 240 dias de vida. Diferenças significativas ao longo do tempo quando  $P \leq 0,05$  no teste do Qui-quadrado.

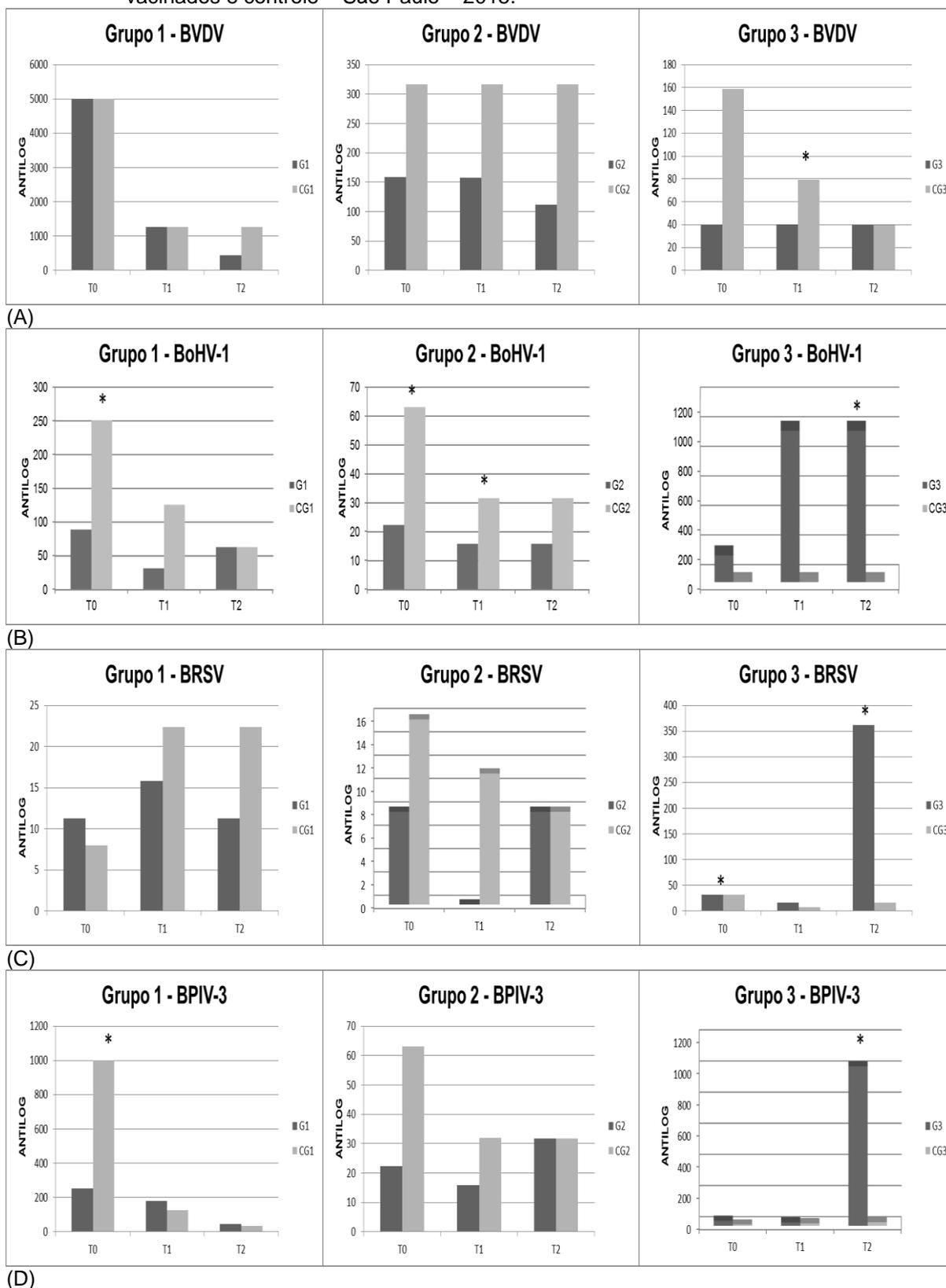
Tabela 6 – Títulos de anticorpos específicos para as viroses respiratórias em bezerros Holandeses vacinados e controle – São Paulo – 2015.

Gs	BVDV									
	Tempos									
	T0			T1			T2			
	Me (log <sub>2</sub> )	Antilog Me	P	Me (log <sub>2</sub> )	Antilog Me	P	Me (log <sub>2</sub> )	Antilog Me	P	
G1	12,3	5011,9	0,44	10,3	1258,9	0,71	8,8	446,7	0,46	
CG1	12,3	5011,9		10,3	1258,0		10,3	1258,0		
G2	7,3	158,5	0,16	7,3	158,0	0,17	6,8	112,0	0,21	
CG2	8,3	316,2		8,3	316,2		8,3	316,2		
G3	7,3	158,5	0,13	6,3	79,4	0,03	5,3	39,8	0,5	
CG3	5,3	39,8		5,3	40,0		5,3	39,8		
<b>BoHV-1</b>										
G1	6,5	89,1	0,08	5,0	31,6	0,12	6,0	63,1	0,92	
CG1	8,0	251,0		7,0	125,9		6,0	63,1		
G2	4,5	22,4	0,11	4,0	15,8	0,16	4,0	15,8	0,31	
CG2	6,0	63,1		5,0	31,6		5,0	31,6		
G3	7,5	181,0	0,24	10,0	1024,0	0,43	10,0	1024,0	0,01	
CG3	0,0	1,0		0,0	0,0		0,0	0,0		
<b>BRSV</b>										
G1	3,5	11,2	1	4,0	15,8	0,93	3,5	11,2	0,26	
CG1	3,0	8,0		4,5	22,4		4,5	22,4		
G2	5,0	31,8	0,26	4,0	15,8	0,14	8,5	362,0	0,19	
CG2	5,0	31,6		3,0	7,9		4,0	15,8		
G3	3,0	7,9	0,04	0,0	0,0	0,65	3,0	7,9	0,01	
CG3	4,0	15,8		3,5	11,2		3,0	7,9		
<b>BPIV-3</b>										
G1	8,0	251,2	0,55	7,5	177,8	0,64	5,5	44,7	0,71	
CG1	10,0	1000,0		7,0	126,0		5,0	32,0		
G2	4,5	22,4	0,02	4,0	15,8	0,06	5,0	31,6	0,31	
CG2	6,0	63,0		5,0	32,0		5,0	31,6		
G3	5,0	31,6	0,33	4,5	22,4	0,23	10,0	1024,0	0,05	
CG3	3,0	8,0		4,0	16,0		4,5	22,6		

Fonte: (SILVA, B. T., 2015).

Legenda: Gs - grupos experimentais; Me - mediana; CG - controle não vacinado; G1 - T0 – 14, T1 - 44, T2 – 74 dias de vida; G2: -T0 – 90, T1 - 120, T2 – 150 dias de vida; G3 - T0 – 180, T1 - 210, T2 – 240 dias de vida. Diferenças significativas ao longo do tempo quando  $P \leq 0,05$  no teste U de Mann-Whitney.

Figura 10 - Títulos de anticorpos específicos para as viroses respiratórias em bezerros Holandeses vacinados e controle – São Paulo – 2015.



(D)

Fonte: (SILVA, B. T., 2015).

Legenda: \*Diferenças estatísticas ( $P \leq 0,05$ ); † Tendências estatísticas ( $P \leq 0,10$ ); (A) BVDV; (B) BoHV-1; (C) BRSV e (D) BPIV-3.

Tabela 7 – Títulos de anticorpos neutralizantes individuais ( $\log_2$ ) para BVDV em bezerros Holandeses vacinados e controle– São Paulo – 2015.

Gs	Id.	T0	T1	T2	Gs	Id.	T0	T1	T2
<b>G1</b>	01	10,3	9,3	7,3	<b>CG1</b>	20	12,8	10,3	10,3
	02	12,3	10,3	9,3		21	12,8	9,3	8,3
	03	12,3	11,3	9,3		22	11,3	7,3	7,3
	04	12,3	10,3	8,3		23	11,3	11,3	10,3
	05	12,3	12,3	11,3		24	12,3	11,3	11,3
	06	11,3	9,3	7,3					
<b>G2</b>	07	5,3	6,3	5,3	<b>CG2</b>	20	10,3	10,3	10,3
	08	7,3	9,3	8,3		21	8,3	9,3	10,3
	09	4,3	3,3	3,3		22	7,3	7,3	6,3
	10	8,3	8,3	7,3		23	8,3	8,3	6,3
	11	7,3	7,3	6,8		24	6,3	8,3	8,3
<b>G3</b>	12	6,3	6,3	5,3	<b>CG3</b>	20	7,3	8,3	7,3
	13	4,3	6,3	0,0		21	8,3	6,3	6,3
	14	0,0	0,0	5,3		22	5,3	5,3	3,3
	15	0,0	4,3	8,3		23	6,3	6,3	5,3
	16	0,0	0,0	10,3		24	7,3	5,3	4,3
	17	0,0	5,3	0,0					
	18	0,0	0,0	0,0					
	19	0,0	0,0	3,3					

Fonte: (SILVA, B. T., 2015).

Legenda: Gs - Grupos experimentais; Id. - Identificação.

Tabela 8– Títulos de anticorpos neutralizantes individuais ( $\log_2$ ) para BoHV-1 em bezerros Holandeses vacinados e controle– São Paulo – 2015.

Gs	Id.	T0	T1	T2	Gs	Id.	T0	T1	T2	
<b>G1</b>	01	7,0	5,0	6,0	<b>CG1</b>	20	10,0	7,0	5,0	
	02	7,0	5,0	5,0		21	9,0	7,0	6,0	
	03	6,0	5,0	6,0		22	6,5	4,0	4,0	
	04	6,0	5,0	6,0		23	8,0	8,0	8,0	
	05	9,0	7,0	8,0		24	8,0	9,0	8,0	
	06	6,0	5,0	5,0						
<b>G2</b>	07	6,0	4,0	4,0	<b>CG2</b>	20	5,0	4,0	5,0	
	08	4,0	0,0	0,0		21	6,0	5,0	6,0	
	09	5,0	4,0	4,0		22	4,0	0,0	4,0	
	10	4,0	0,0	4,0		23	7,0	6,0	4,0	
	11	0,0	4,2	10,5		24	7,0	6,0	6,0	
<b>G3</b>	12	0,0	0,0	0,0	<b>CG3</b>	20	0,0	0,0	0,0	
	13	0,0	0,0	7,0		21	0,0	0,0	0,0	
	14	0,0	0,0	6,0		22	0,0	0,0	0,0	
	15	5,0	10,0	10,0		23	0,0	0,0	0,0	
	16	10,0	0,0	10,0		24	0,0	0,0	0,0	
	17	0,0	0,0	10,0						
	18	0,0	0,0	10,0						
	19	0,0	0,0	7,0						

Fonte: (SILVA, B. T., 2015).

Legenda: Gs - Grupos experimentais; Id. - Identificação.

Tabela 9– Títulos de anticorpos neutralizantes individuais ( $\log_2$ ) para BRSV em bezerros Holandeses vacinados e controle– São Paulo – 2015.

<b>Gs</b>	<b>Id.</b>	<b>T0</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>Gs</b>	<b>Id.</b>	<b>T0</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	
<b>G1</b>	01	4,0	4,0	3,0	<b>CG1</b>	20	3,0	3,0	4,0	
	02	0,0	0,0	0,0		21	4,0	0,0	0,0	
	03	0,0	4,0	4,0		22	0,0	3,0	3,0	
	04	3,0	3,0	0,0		23	3,0	7,0	8,0	
	05	3,0	5,0	4,0		24	3,0	6,0	5,0	
	06	4,0	4,0	3,0						
<b>G2</b>	07	0,0	0,0	0,0	<b>CG2</b>	20	4,0	0,0	4,0	
	08	0,0	0,0	0,0		21	0,0	0,0	3,0	
	09	0,0	0,0	0,0		22	3,0	4,0	3,0	
	10	0,0	0,0	0,0		23	4,0	3,0	0,0	
	11	3,0	0,0	3,0		24	0,0	0,0	0,0	
<b>G3</b>	12	7,0	5,0	4,0	<b>CG3</b>	20	0,0	3,0	4,0	
	13	5,0	4,0	4,0		21	0,0	0,0	0,0	
	14	3,0	4,0	4,0		22	0,0	0,0	0,0	
	15	5,0	10,0	10,0						
	16	10,0	3,0	10,0		23	7,0	6,0	4,0	
	17	3,0	0,0	10,0		24	3,0	3,0	3,0	
	18	0,0	0,0	10,0						
	19	0,0	0,0	7,0						

Fonte: (SILVA, B. T., 2015).

Legenda: Gs - Grupos experimentais; Id. - Identificação.

Tabela 10 – Títulos de anticorpos neutralizantes individuais ( $\log_2$ ) para BPIV-3 em bezerros Holandeses vacinados e controle– São Paulo – 2015.

Gs	Id.	T0	T1	T2	Gs	Id.	T0	T1	T2	
G1	01	8,0	6,0	3,0	CG1	20	7,0	5,0	3,0	
	02	10,0	7,0	6,0		21	8,0	6,0	3,0	
	03	8,0	8,0	5,0		22	10,0	7,0	5,0	
	04	7,0	8,0	6,0		23	10,0	9,0	8,3	
	05	10,0	10,0	9,0		24	10,0	9,0	8,0	
	06	8,0	7,0	5,0						
G2	07	0,0	5,0	4,0	CG2	20	6,0	6,0	5,0	
	08	0,0	3,0	0,0		21	6,0	5,0	5,0	
	09	5,0	5,0	5,0		22	4,0	4,0	4,0	
	10	0,0	0,0	0,0		23	7,0	5,0	5,0	
	11	4,0	3,0	5,0		24	6,0	6,0	4,0	
G3	12	5,0	5,0	3,0	CG3	20	4,0	5,0	4,0	
	13	4,0	4,0	4,0		21	4,0	4,0	0,0	
	14	0,0	0,0	0,0		22	3,0	6,0	5,0	
	15	5,0	10,0	10,0		23	3,0	3,0	0,0	
	16	10,0	3,0	10,0		24	3,0	3,0	0,0	
	17	3,0	0,0	10,0						
	18	0,0	0,0	10,0						
	19	0,0	0,0	7,0						

Fonte: (SILVA, B. T., 2015).

Legenda: Gs - Grupos experimentais; Id. - Identificação.

## 10.2 LINFÓCITOS E SUAS SUBPOPULAÇÕES

Os valores médios relativos e absolutos de linfócitos totais (Lf) e valores medianos subpopulações de linfócitos de acordo com o protocolo vacinal empregado estão apresentados na Tabela 11 e Figuras 11 e 12.

Linfócitos totais aumentaram de 14 para 74 dias de vida em CG1 e G1, porém não foram observadas diferenças entre os tempos e grupos experimentais. Linfócitos totais no grupo controle e vacinado aos 90 dias apresentaram perfil diferenciado, observando-se diminuição em CG2 e aumento no G2 de 90 a 150 dias de vida, sendo possível observar diferenças entre momentos para os valores absolutos ( $P=0,01$ ) e grupos ( $P=0,05$ ). Estas diferenças puderam ser confirmadas entre os tempos para valores relativos ( $P=0,03$ ), mas não entre grupos ( $P=0,04$ ). Para G3 e CG3, houve

diminuição da população de linfócitos totais do T0 ao T2, porém não foi possível detectar diferenças entre momentos e grupos experimentais.

Linfócitos B (CD21<sup>+</sup>) aumentaram do T0 ao T2 nos grupos CG1 e G1, sendo possível detectar diferenças em valores absolutos e relativos para os momentos no G1 (P=0,03; P=0,04). O CG2 e G2 apresentou leve diminuição do CD21<sup>+</sup> (%) porém sem a detecção de diferenças estatísticas. G3 exibiu aumento de células B (%), enquanto o grupo CG3 manteve valores estáveis. Diferenças estatísticas entre os tempos foram identificadas nos valores absolutos dos grupos G1 (P=0,03) e G3 (P=0,03), porém sem distinção entre quais momentos (P≤0,0167). Os valores relativos demonstraram uma tendência (P=0,09) a diferenças entre tempos para o G2.

Linfócitos T CD3<sup>+</sup> observou-se diminuição dos valores medianos relativos e absolutos ao longo do tempo nos grupos CG1 e G1, CG2 e G2 e G3, exceto CG3 que mantiveram valores constantes. Apesar destas variações, foram detectadas apenas tendências para diferenças no tempo para G2 (P=0,09) e G3 (P=0,09), porém não foi possível detectar entre quais tempos essa tendência ocorreu pelo teste de Wilcoxon com correção de Bonferroni (P≤0,0167). Houve diferenças entre os tempos dos valores relativos de G1 (P=0,04), e tendência entre os tempos de G3 (P=0,08). Em relação aos grupos experimentais observaram-se diferenças nos valores absolutos e tendência a diferença nos valores relativos de CD3<sup>+</sup> entre CG2 (2,4 x 10<sup>3</sup>/μL - 62,7%) e G2 (7,2 x 10<sup>3</sup>/μL - 70,2%) no T0 (P=0,05; P=0,09). Foram observados ainda diferenças nas porcentagens de CD3<sup>+</sup> para os grupos CG3 e G3 no T0 (P=0,01) e T1 (P=0,01), com maiores valores no grupo vacinado.

A subpopulação de células T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> apresentaram pequenas variações ao longo do tempo, exceto para CG1 (P=0,04) e G3 (P=0,03), que expressaram diminuição significativa das proporções durante o tempo. A mesma diferença em G3 (P=0,01) foi detectada para os valores relativos. Em relação aos grupos pôde-se detectar diferenças entre CG1 e G1 no T0 (P= 0,02) e tendências entre CG2 e G2 no T0 (0,07), T1 (0,07) e T2 (0,07), sendo observados maiores valores no grupo vacinado G2 em relação ao CG2. Os valores relativos expressaram apenas diferença entre CG3 (18,8%) e G3 (30%) no T0 (P=0,03).

A população citotóxica CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> também apresentou comportamento estável ao longo do estudo, exceto para a diferença entre os tempos identificada no grupo CG1 (P=0,04), observando-se aumento dos valores. Os valores relativos demonstraram apenas diferença entre os tempos no CG3 (P=0,04). Em relação aos

grupos foi detectada diferença entre CG1 e G1 no T0 ( $P=0,03$ ) e tendência (%) para CG3 e G3 no T0 ( $P=0,09$ ).

Linfócitos WC1<sup>+</sup> absolutos também foram constantes ao longo do estudo, exceto para o grupo CG1 ( $P=0,01$ ), no qual foi observada diminuição dos valores. Contudo, os valores relativos demonstraram diferenças no tempo em CG1 ( $P=0,02$ ), CG2 ( $P=0,01$ ) e CG3 ( $P=0,04$ ). Novamente o baixo valor de P estimado pela correção de Bonferroni não permitiu identificar entre quais tempos ocorreram às diferenças. Os linfócitos WC1<sup>+</sup> apresentaram ainda diferenças entre os grupos CG1 e G1 no T1 ( $P=0,02$ ), CG2 e G2 no T1 ( $P=0,02$ ), e os valores relativos entre CG3 e G3 no T0 ( $P=0,02$ ). Tendência ainda foi observada no T1 ( $P=0,09$ ) para os grupos CG3 e G3. O grupo vacinado sempre exibiu maiores valores relativos que seus respectivos controles.

O marcador de ativação CD25<sup>+</sup> apresentou maiores valores absolutos nos bezerros mais jovens do CG1 e G1, além disso, os valores desse marcador foram maiores nos grupos de bezerros vacinados G1, G2 e G3 em relação aos seus controles. Assim, foi possível verificar diferença estatística em G3 ( $P=0,03$ ) entre os tempos dos valores absolutos, e uma tendência (%) a diferença entre os tempos para o G2 ( $P=0,09$ ). Houve ainda diferença estatística nos valores absolutos entre os grupos CG1 e G1 no T1 ( $P=0,03$ ) e CG2 e G2 no T2 ( $P=0,02$ ), observando-se maior expressão de CD25<sup>+</sup> nos bezerros vacinados em relação aos controles. Houve apenas tendência a diferenças nos valores relativos de CD25<sup>+</sup> entre os grupos CG2 e G2 no T2 ( $P=0,06$ ).

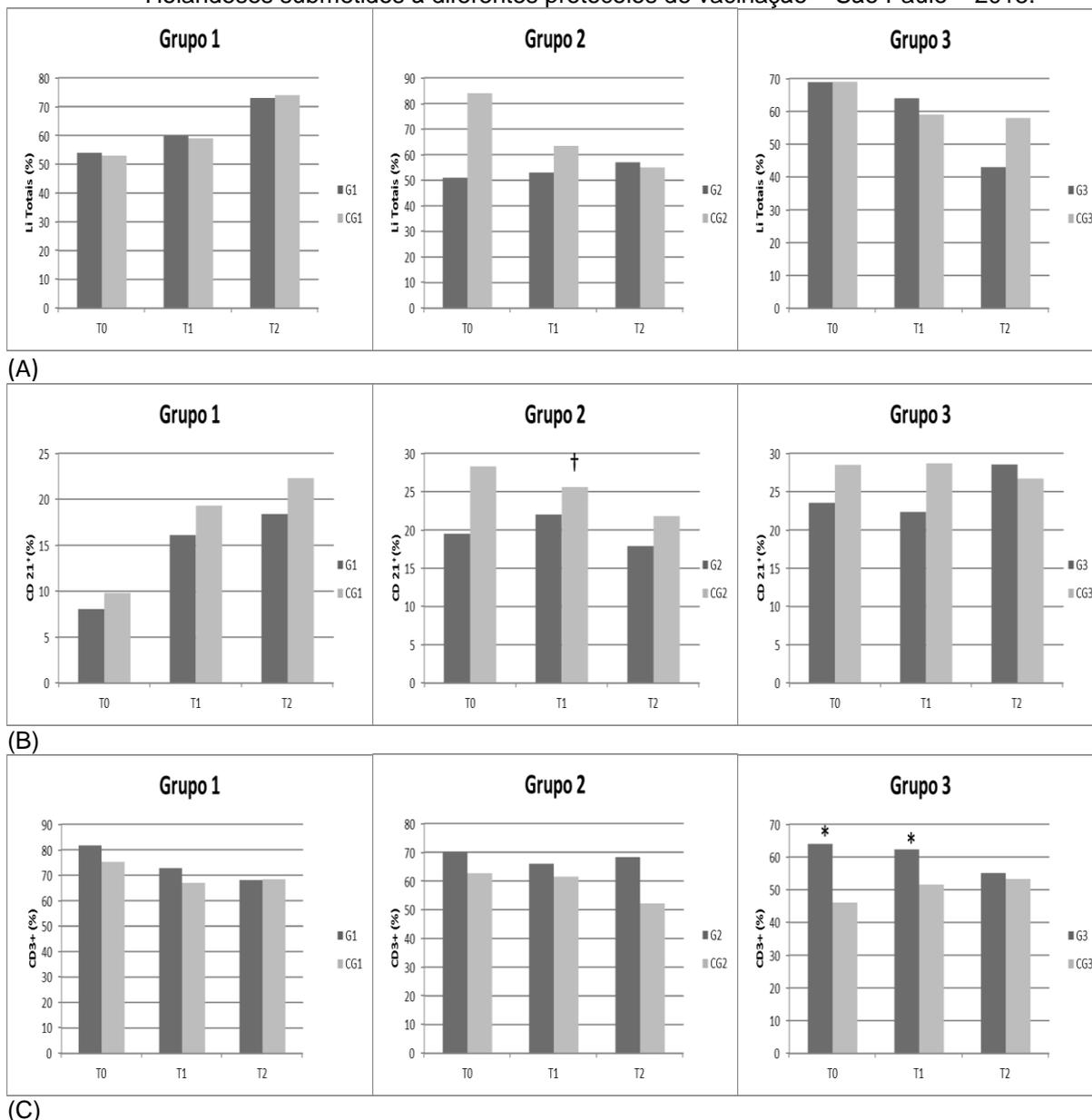
Tabela 11 - Valores absolutos (células x 10<sup>3</sup>/μL) e relativos dos linfócitos totais, linfócitos B (CD21<sup>+</sup>), linfócitos T (CD3<sup>+</sup>) e suas subpopulações e marcador de ativação CD25<sup>+</sup> em bezerros Holandeses submetidos à diferentes protocolos de vacinação – São Paulo – 2015.

Pop.	T	Grupos Experimentais											
		G1		CG1		G2		CG2		G3		CG3	
		%	10 <sup>3</sup> /μL	%	10 <sup>3</sup> /μL	%	10 <sup>3</sup> /μL	%	10 <sup>3</sup> /μL	%	10 <sup>3</sup> /μL	%	10 <sup>3</sup> /μL
Linf	T0	54	4	53	6,2	51 <sup>B</sup>	9,4 <sup>Aa</sup>	84 <sup>A</sup>	4,8 <sup>B</sup>	68,9	6,7	69	6,7
	T1	60	4,3	59	3,92	53 <sup>B</sup>	5 <sup>Aab</sup>	63,4 <sup>A</sup>	4,1 <sup>B</sup>	64	4,5	59	5,15
	T2	73	4,5	74	4,66	57	5,1 <sup>Ab</sup>	55	4,11 <sup>B</sup>	43	6,9	58	5,9
Anova (P) 10 <sup>3</sup> /μL		0,19				0,01				0,27			
Anova (P) (%)		0,45				0,03				0,82			
CD21 <sup>+</sup>	T0	8,1	0,3 <sup>B</sup>	9,8	0,5 <sup>A</sup>	19,5	2,1	28,3	0,9	23,6	1,3	28,5	1
	T1	16,0	0,8	19,3	0,6	22,0	1	25,6	1,2	22,4	1	28,7	1
	T2	18,4	0,9	22,3	1	17,9 <sup>B</sup>	0,9	21,8 <sup>A</sup>	0,8	28,6	1,2	26,7	1
Friedman (P) 10 <sup>3</sup> /μL		0,03		0,25		0,25		0,45		0,03		0,82	
Friedman (P) %		0,03		0,04		0,25		0,25		0,2		0,82	
CD3 <sup>+</sup>	T0	81,7	3,3	75,2	4,4	70,2	7,2 <sup>A</sup>	62,7	2,4 <sup>B</sup>	64 <sup>A</sup>	4,3	46,1 <sup>B</sup>	2,2
	T1	72,8	3,3	67	2,4	66	3	61,5	2,1	62,3 <sup>A</sup>	2,9	51,6 <sup>B</sup>	2
	T2	68,1	2,6	68,4	3,3	68,3	3,4	52,2	1,8	55,1	2,7	53,3	2,4
Friedman (P) 10 <sup>3</sup> /μL		0,60		0,16		0,09		0,16		0,09		0,82	
Friedman (P) %		0,04		0,55		0,25		0,2		0,08		0,82	
CD4 <sup>+</sup>	T0	19	0,7 <sup>B</sup>	23,9	1,9 <sup>A</sup>	16,5	1,3	9,0	0,3	30 <sup>A</sup>	1,9	18,8 <sup>B</sup>	1
	T1	21,7	0,9	18,8	0,8	22,8	1,2	6,4	0,4	25,9	1	17,7	0,8
	T2	11,9	0,6	26,5	1,1	21,7	1,1	12,6	0,5	22,6	1,2	22,1	0,8
Friedman (P) 10 <sup>3</sup> /μL		0,22		0,04		0,45		0,82		0,03		0,55	
Friedman (P) %		0,11		0,45		0,82		0,45		0,01		0,45	
CD8 <sup>+</sup>	T0	8,7	0,3 <sup>B</sup>	10	0,7 <sup>A</sup>	7,6	1	8,9	0,4	7	0,3	7,9	0,3
	T1	7,6	0,3	9,5	0,3	7	0,4	9,3	0,4	9,8	0,5	6,2	0,2
	T2	6,3	0,3	13,9	0,7	7,2	0,4	9	0,3	9	0,4	7,2	0,3
Friedman (P) 10 <sup>3</sup> /μL		0,85		0,04		0,25		0,82		0,5		0,88	
Friedman (P) %		0,85		0,44		0,82		0,55		0,3		0,04	
WC1 <sup>+</sup>	T0	23,5	1,2	20,5	1,2	19,6	1,3	16,5	0,8	28,4 <sup>A</sup>	2,1	10,3 <sup>B</sup>	0,6
	T1	24,9 <sup>A</sup>	1,1 <sup>A</sup>	10,6 <sup>B</sup>	0,5 <sup>A</sup>	23,1 <sup>A</sup>	1,2 <sup>A</sup>	7,1 <sup>B</sup>	0,3 <sup>B</sup>	21,7	0,7	13,8	0,5
	T2	25,4	0,9	16,8	0,8	20,9	1	9	0,5	17,4	0,8	18,4	0,6
Friedman (P) 10 <sup>3</sup> /μL		1		0,01		0,82		0,02		0,22		0,82	
Friedman (P) %		0,85		0,02		0,25		0,02		0,2		0,04	
CD25 <sup>+</sup>	T0	50,5	1,9	37,2	2	31,9	3,2	33,8	1,4	29,2	1,6	34,3	1,4
	T1	50,4	2,3 <sup>B</sup>	38,8	1,3 <sup>A</sup>	42,5	1,6	37,7	1,5	32,1	1,4	28,1	1,1
	T2	49,4	2,1	47,1	1,8	48,1	2,5 <sup>A</sup>	16,1	0,5 <sup>B</sup>	30,9	1,6	27,8	1,1
Friedman (P) 10 <sup>3</sup> /μL		0,85		0,25		0,25		0,45		0,03		0,82	
Friedman (P) %		0,61		0,8		0,09		0,82		0,88		0,45	

Fonte: (SILVA, B. T., 2015).

Legenda: letras minúsculas na mesma coluna demonstram diferenças entre os tempos T0, T1 e T2; letras maiúsculas na mesma linha demonstram diferença entre os grupos quando P≤0,05. CG - controle não vacinado; G1 - T0 – 14, T1 - 44, T2 – 74 dias de vida; G2 - T0 – 90, T1 - 120, T2 – 150 dias de vida; G3 - T0 – 180, T1 - 210, T2 – 240 dias de vida; T - tempos.

Figura 11 – Valores absolutos (células  $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) e relativos dos linfócitos totais, linfócitos B ( $\text{CD}21^+$ ), linfócitos T ( $\text{CD}3^+$ ) e suas subpopulações e marcador de ativação  $\text{CD}25^+$  em bezerros Holandeses submetidos à diferentes protocolos de vacinação – São Paulo – 2015.

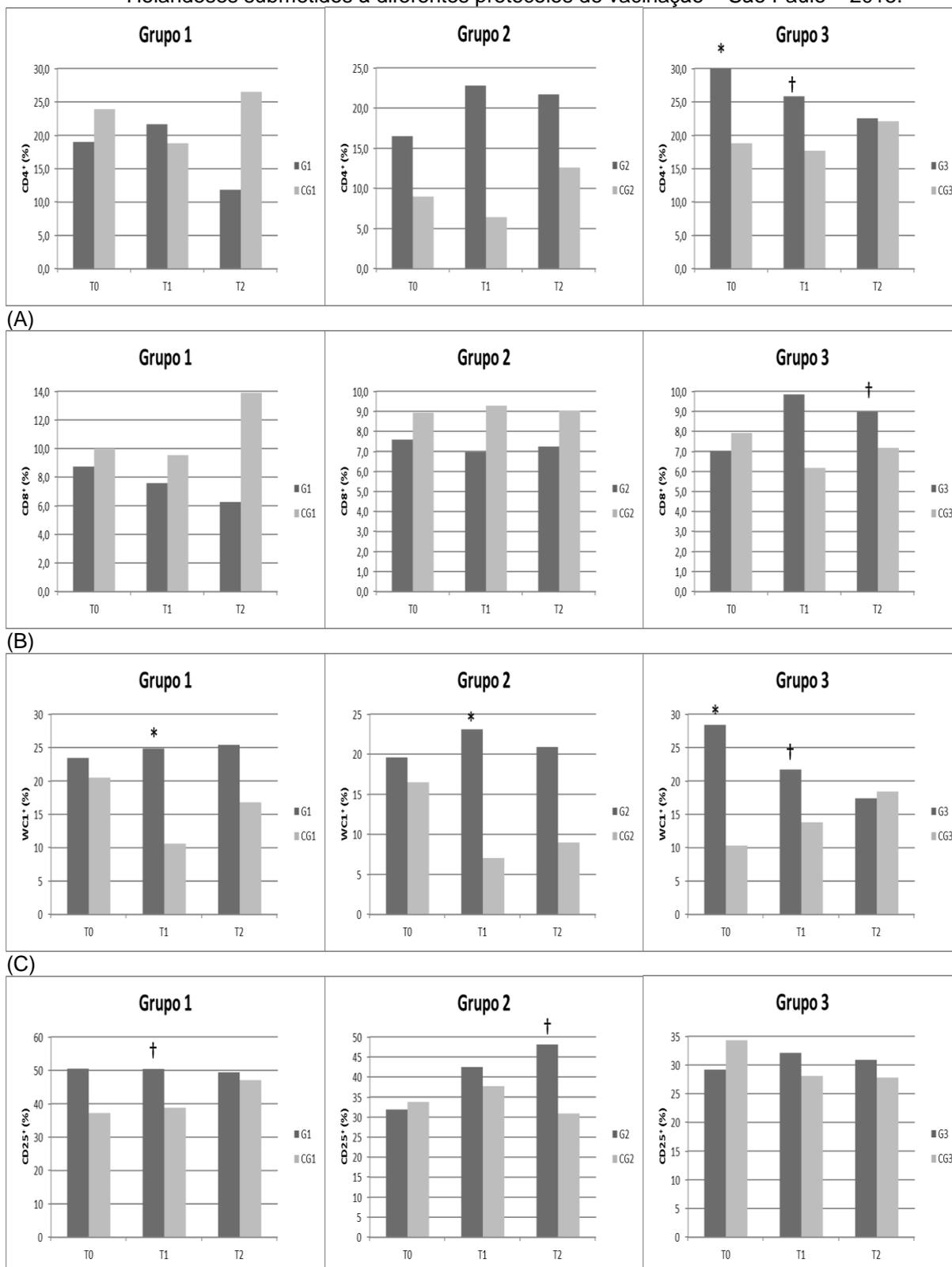


(C)

Fonte: (SILVA, B. T., 2015).

Legenda: CG: controle não vacinado; G1: T0 – 14, T1 - 44, T2 – 74 dias de vida; G2: T0 – 90, T1 - 120, T2 – 150 dias de vida; G3: T0 – 180, T1 - 210, T2 – 240 dias de vida.\*Diferenças estatísticas ( $P \leq 0,05$ ); † Tendências estatísticas ( $P \leq 0,10$ ).

Figura 12– Valores absolutos (células  $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) e relativos dos linfócitos totais, linfócitos B ( $\text{CD}21^+$ ), linfócitos T ( $\text{CD}3^+$ ) e suas subpopulações e marcador de ativação  $\text{CD}25^+$  em bezerros Holandeses submetidos à diferentes protocolos de vacinação – São Paulo – 2015.



(D)

Fonte: (SILVA, B. T., 2015).

Legenda: CG: controle não vacinado; G1: T0 – 14, T1 - 44, T2 – 74 dias de vida; G2: T0 – 90, T1 - 120, T2 – 150 dias de vida; G3: T0 – 180, T1 - 210, T2 – 240 dias de vida. \*Diferenças estatísticas ( $P \leq 0,05$ ); †Tendências estatísticas ( $P \leq 0,10$ ).

## 11 DISCUSSÃO

Esta pesquisa avaliou diferentes protocolos de vacinação para DRB em bezerros Holandeses com 14, 90 e 180 dias de vida.

### 11.1 RESPOSTA HUMORAL INDUZIDA PELA VACINAÇÃO

Esta pesquisa detectou a presença anticorpos maternos para BVDV, BoHV-1 e BPIV-3 nos bezerros vacinados aos 14 (G1) e 90 dias (G2) de vida. Em contrapartida, alguns bezerros não apresentaram ACs para BRSV nestas faixas etárias.

Aos 180 dias (G3) os títulos de anticorpos eram nulos ou baixos para as viroses respiratórias, sendo esses compatíveis com a duração dos anticorpos colostrais previamente relatados (KIRKPATRICK et al., 2001; FULTON et al., 2004; KIRKPATRICK et al., 2008; CHAMORRO et al., 2014).

A janela imunológica instaurada foi precoce para o BRSV, entretanto para as demais viroses este fenômeno ocorreu para a maioria dos bezerros entre 3 (G2) e 6 meses de idade (G3). O período de vulnerabilidade para a DRB depende da qualidade da imunidade passiva transferida, assim estudos tem demonstrado que a DRB pode ser precoce e atingir 7,7% a 9,5% das bezerras de leite entre a segunda semana ao terceiro mês de vida, resultando no tratamento de 21,9% (630/2874) desses animais (WINDEYER et al., 2013).

Devido à precocidade da DRB, a vacinação precoce poderia ser empregada como estratégia nos programas de profilaxia das viroses respiratórias. Entretanto, o bloqueio da resposta imune ativa pelos anticorpos maternos representa um desafio.

Os bezerros vacinados aos 14 dias de vida mantiveram o mesmo perfil do grupo controle não vacinado ao longo do estudo. Em geral, observou-se diminuição nos títulos de anticorpos de ambos os grupos para as viroses respiratórias, exceto para o BRSV. Estes achados nos permite afirmar que a vacinação precoce não induziu a produção de anticorpos por imunidade ativa, e que a diminuição dos títulos

é decorrente da meia vida das imunoglobulinas equivalente 23, 21 e 30 dias, respectivamente para BVDV, BoHV-1 e BPIV-3 (FULTON et al., 2004).

Resultados semelhantes aos encontrados nesta pesquisa para a vacinação de bezerros recém-nascidos foram relatados para o BVDV e BoHV-1 por Menanteau-Horta et al. (1985), mesmo que tenha usado vacina contendo o vírus vivo e modificado. Windeyer et al. (2015) em estudo retrospectivo em rebanho leiteiro também não observaram aumento nos títulos de anticorpos em bezerras vacinadas na segunda ou quinta semana de vida.

O efeito supressor dos anticorpos maternos sobre a imunidade humoral induzida pela vacinação encontrado nesta pesquisa também foi encontrado por Kaeberle, Sealock e Honeyman (1998). Estes autores testaram três vacinas comerciais inativadas e avaliaram os efeitos dos anticorpos maternos residuais na produção ativa de anticorpos. Assim, 30 bezerros entre 28 a 69 dias foram distribuídos em três grupos imunizados com diferentes as diferentes vacinas contendo BVDV, BoHV, BRSV e BPIV-3 inativados, e *booster* 30 dias após. Os autores detectaram ACs remanescentes do colostro ao início do experimento para todas as viroses, porém observaram variações individuais entre os títulos. O aumento dos títulos de anticorpos pós-vacinal foi observado apenas para uma das três vacinas testadas (*Vira Shield 5*), especialmente após a dose de reforço. As diferentes respostas para as vacinas testadas no referido trabalho e nesta pesquisa pode ser decorrente das diferentes cepas e adjuvantes empregados.

Ellis et al. (2001) verificaram se anticorpos maternos específicos para o BVDV-2 poderiam bloquear a resposta imune induzida por vacinas contendo cepas de BVDV-1. Bezerros leiteiros receberam colostro com altos títulos e foram vacinados entre 10 a 14 dias de vida com cepa NADL, em seguida, foram desafiados com o BVDV-2 (24515, isolada de bezerro com Doença das Mucosas) resultando em doença grave e eutanásia. Bezerros que não apresentavam ACs maternos e receberam apenas uma dose da vacina entre 10-14 dias de vida foram protegidos, assim como aqueles vacinados aos 4 meses de idade. O trabalho de Ellis et al. (2001) foi conduzido diferentemente do modelo experimental adotado nesta pesquisa, porém também enfatizou os efeitos negativos dos anticorpos maternos na resposta imune induzida pela vacinação.

A vacinação aos 90 dias apresentou resposta variável de acordo com a virose e indivíduo, sendo possível observar títulos estáveis para BVDV e BoHV-1 em

ambos os grupos CG2 e G2, sendo importante ressaltar que um bezerro era soronegativo para o Herpesvírus no T0 observando-se a produção de anticorpos pós-vacinal ( $\log_2 = 10$ ); para o BRSV a resposta vacinal aos 90 dias foi fraca, pois 4/5 (80%) dos animais vacinados mantiveram-se soronegativos antes e após o reforço; para o BPIV-3 observou-se manutenção ou ligeiro aumento dos títulos ACs pós-vacinal, em contrapartida os títulos do CG2 foram gradualmente decrescentes.

Os dados obtidos nesta pesquisa concordam parcialmente aqueles relatados por Menanteau-Horta et al. (1985), que encontraram aumento dos títulos de anticorpos para o BVDV pós-vacinação aos 84 e 196 dias de vida, em contrapartida os animais não responderam ao BoHV-1 aos 84 dias. As diferentes respostas para o BVDV provavelmente é decorrente da composição das vacinas, pois a vacinal comercial empregada nesta pesquisa apresentava cepas de BVDV-1 e BVDV-2 inativadas enquanto os referidos autores usaram vacina contendo cepas vivas de BVDV.

As variações observadas para o BRSV nesta pesquisa, especialmente no grupo de bezerros vacinados aos 90 dias também foi relatada por Fulton et al. (2004). Estes autores vacinaram bezerros de corte, aos 60 e 95 dias de vida, com vacina comercial (*Triangle 4*) contendo cepas inativadas do BVDV1a, BVDV1b, BVDV2, BoHV-1 (*Cooper*), BPIV-3 e BRSV. Os bezerros vacinados responderam para todas as viroses, exceto para o BRSV. Além disso, os referidos autores relataram o efeito supressor dos anticorpos maternos em alguns bezerros do estudo. A meia vida e duração destes anticorpos foram maiores no grupo de bezerros vacinados.

Windeyer et al. (2015) demonstrou associação entre DRB e títulos de anticorpos apenas para BRSV e BoHV-1, pois bezerras com maiores títulos tiveram menor probabilidade de apresentarem doença clínica mediante a exposição natural. Os autores não encontraram associação entre os títulos de ACs para BVDV e BPIV-3, o que pressupõe a menor importância dessas viroses nos rebanhos estudados. Esta susceptibilidade ao BRSV pode ter associação com a grande amplitude de variação detectada no soro dos bezerros após a colostragem demonstrada no capítulo 1 desta pesquisa, associada a baixa resposta vacinal.

A vacinação aos 180 dias induziu resposta em 5/8 bezerros para o BVDV (62,5%), entretanto os animais que ainda possuíam títulos de anticorpos maternos remanescentes não responderam ao protocolo instituído. O CG3 apresentou queda

dos títulos dos anticorpos maternos entre 180 a 240 dias de vida; para o BoHV-1 observou-se resposta vacinal em 7/8 bezerros, exceto o bezerro que manteve o mesmo comportamento que os bezerros do CG3 que apresentaram-se soronegativos do T0 ao T2; para o BRSV pôde-se observar que 8/8 bezerros responderam à vacinação (100%), observando-se manutenção ou queda dos títulos no CG3; para o BPIV-3 pôde-se obter respostas 7/8 (87,5%) animais vacinados (G3), observando-se manutenção ou queda dos títulos no CG3.

Resultados semelhantes para BVDV e BoHV-1 foram relatados em estudo recente de Baccili et al. (2015). O estudo avaliou a resposta vacinal em bezerros de seis meses de idade, utilizando a mesma vacina comercial empregada neste estudo. Os resultados demonstraram que após duas doses vacinais a resposta ao BVDV e BoHV-1 foram de 60 e 100%, respectivamente. Dados semelhantes aos obtidos nesta pesquisa para os bezerros com seis meses de idade. Em contrapartida, maior expressão do marcador de ativação celular foi verificada apenas para gamma-delta após a primovacinação. Os autores concluíram que as condições em que o estudo foi delineado não permitiu a avaliação da resposta imune mediada por células específicas aos antígenos vacinais.

Alguns autores (Lima et al., 2009) avaliaram a eficácia de quatro vacinas, sendo que três delas eram comerciais e continham vírus inativado, e a outra era de estudo clínico contendo cepas atenuadas. Os títulos médios geométricos de anticorpos neutralizantes para BVDV-1 foram mais elevados no soro de animais que receberam a vacina experimental (GMT = 1612,7) em comparação com os outros grupos que receberam vacinas comerciais com cepas inativadas (GMT = 14,3-40,0). Resultados semelhantes foram verificados para os anticorpos específicos ao BVDV-2. Assim, pode-se notar maior a intensidade da resposta imune humoral para a vacina que continha vírus atenuado. O estudo de Vogel et al. (2002) avaliou vacinas comerciais em bovinos de 10 a 24 meses de idade, contra os isolados de BVDV presentes no país, e verificaram baixa a moderada resposta de títulos de anticorpos e nenhuma proteção fetal.

Os bezerros vacinados aos seis meses de idade desenvolveram imunidade humoral para as viroses respiratórias. A exposição primária ao antígeno vacinal estimula a produção de células B de memória e IgM, que deverão ser ativadas após segundo contato com o antígeno para proliferação e produção de IgG. A IgM possui maior potencial neutralizante que a IgM (TIZARD, 2008).

Alguns bezerros mostraram capacidade de responder às vacinas desde os 90 dias de idade, desde que não apresentassem anticorpos maternos residuais, assim acredita-se na capacidade de resposta precoce dos bezerros estimulados por vacina ou exposição natural, fenômeno responsável por gerar maturidade imunológica e proteção aos microrganismos. O problema não está relacionado à imaturidade imune e sim o efeito de bloqueio dos anticorpos maternos.

A resposta vacinal para as viroses foi semelhante, assim o efeitos dos anticorpos maternos foi o mesmo para cepas inativadas do BVDV, vivos/termosensíveis para BoHV-1 e BPIV-3, e vivo/atenuado para BRSV. Entretanto, a resposta vacinal na ausência dos anticorpos maternos aos 180 dias foi mais limitada quando o BVDV inativado foi utilizado para a imunização dos bezerros. Importantes revisões de literatura (KELLING, 2004; CHASE; ELMOWALID; YOUSIF, 2004) ressaltam que antígenos vivos modificados induzem resposta de maior intensidade e duração.

O padrão de resposta imune induzida por antígeno inativado é limitado devido à sua incapacidade em replicar-se nas células hospedeiras e estimular resposta imune mediada por células T citotóxicas (CD8<sup>+</sup>). Todavia, os imunógenos inativados podem induzir resposta humoral devido ao recrutamento de linfócitos B, que se diferenciam em células plasmáticas capazes de secretar anticorpos neutralizantes. A esse ponto, pesquisas discutem a inclusão de componentes que potencializam a resposta imune e que são inclusos nos adjuvantes.

A vacina selecionada nesta pesquisa continha uma saponina conhecida como *Quillaja Saponaria Molina* (Quil A) associada com uma substância imunoestimulatória (Amphigen) e uma oleosa (Colesterol). Imunoestimulatórios são muito eficientes devido a capacidade de induzir os dois tipos de resposta imune, produzindo anticorpos específicos contra os antígenos (IgG1 e IgG2), bem como a resposta imune mediada por células T (Th1 e Th2). Além disso, o tipo de emulsão ajuda a estabilizar a concentração de componentes. Uma vez que não pode ser metabolizado, o antígeno mantém uma liberação lenta ao ser injetado e permanece no tecido por um longo período (DEUTSKENS et al., 2011).

No Brasil são permitidas apenas estirpes vacinais inativadas para o BVDV devido questões de biossegurança defendidas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil (FLORES et al., 2005). Esse fato limita a comparação das pesquisas nacionais com os internacionais que em sua maioria

utilizam vírus vivo. Nesse contexto, Pituco e Del Fava (2003) questionam não só a eficiência das vacinas inativadas disponíveis no mercado, mas a grande variabilidade antigênica das cepas brasileiras em relação a aqueles presentes nas vacinas comerciais, visto que Vogel et al. (2002) demonstrou baixa resposta cruzada entre as diferentes cepas de BVDV. Ainda é válido ressaltar que pouco se sabe sobre a importância clínica das cepas de BVDV isoladas no nosso país devido às deficiências de registros à campo.

Em geral, os anticorpos maternos bloquearam a resposta humoral induzida pela vacinação nos bezerros aos 14 dias de idade, em contrapartida respostas foram visualizadas para os animais vacinados aos 90 e 180 dias de vida.

## 11.2 SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS

Esta pesquisa avaliou as populações e subpopulações dos linfócitos sanguíneos pela técnica de citometria de fluxo conforme estudos previamente demonstrados na literatura.

A população de linfócitos T ( $CD3^+$ ) diminuiu com o avançar da idade, considerando-se as medianas obtidas nos grupos G1 (14-74d), G2 (90-150d) e G3 (180-240d). A diminuição das proporções dos linfócitos T  $CD2^+$  de acordo com a idade já havia sido relatada por Wilson et al. (1996), Ayoub; Yang (1996) e Kulberg et al. (2004).

Apesar de oscilações, os valores de linfócitos T auxiliares  $CD4^+$ , citotóxicos  $CD8^+$  e  $WC1^+$  se mantiveram praticamente constantes até 240d. Kampen et al. (2006) também observaram proporções semelhantes para  $CD4^+$  e  $CD8^+$  em bezerros do nascimento aos 180 dias de vida, porém detectaram diminuição do  $WC1^+$  com o avançar da idade. Wilson et al. (1996) observou essa diminuição na população gamma-delta somente aos 120 dias, mas ainda assim os animais adultos apresentavam 17%.

Os valores medianos relativos (%) de T ( $CD3^+$ ) nos grupos vacinados G1, G2 e G3 foram sempre superiores àqueles obtidos para os grupos controles, embora a única diferença encontrada tenha sido entre G1 e CG1 no T0 e entre CG3 e G3 no T0 e T1. Linfócitos T auxiliares e gamma-delta também apresentaram diferenças e

tendências para maiores valores nos grupos vacinados, enquanto o citotóxico apresentou valores superiores em grupo controle CG3 em relação ao vacinado G3.

O grupo controle do capítulo 2 desta dissertação é composto pelos mesmos bezerros apresentados no capítulo 1, assim sabe-se que a maioria destes animais 4/5 desenvolveram DRB ao longo do estudo, especialmente entre 3 a 4 meses de idade. Desta forma, as diferenças encontradas para as células entre os grupos experimentais são decorrentes da ocorrência das broncopneumonias por exposição natural às viroses respiratórias.

O aumento dos valores relativos e absolutos dos linfócitos B do T0 ao T2 foi decorrente do desenvolvimento etário dos bezerros (KAMPEN et al., 2006). Apesar disto, o G2 e CG2 ainda exibiram discreta queda no número de células B na faixa etária correspondente.

As proporções de linfócitos B aumentaram com o avançar da idade, considerando-se as medianas obtidas nos grupos G1 (14-74d), G2 (90-150d) e G3 (180-240d). Kampen et al. (2006) avaliaram valores relativos de CD21<sup>+</sup> em bezerros até os seis meses de idade, e nas idades correspondentes ao grupos vacinados com 14d, 90d, e 180d deste estudo, observaram valores ao redor de 22%, 28% e 30%, respectivamente. Em seu estudo, também identificou uma oscilação aos 74d, mas com aumento na porcentagem de células. Assim, podemos concluir que nossos resultados foram inferiores quando comparados ao referido trabalho. Este fato pode ser justificado pela demorada produção de anticorpos endógenos mesmo que o aumento gradual da população de células B tenha sido observado.

O estímulo vacinal não promoveu o aumento de linfócitos B nos grupos vacinados G1, G2 e G3 em relação ao controle.

A expressão do marcador CD25<sup>+</sup> foi mantida pelo grupo vacinado G1 até o T2, enquanto seu controle obteve aumento das células ativadas, fato este que justifica a diferença encontrada entre os grupos no T1. No entanto, o G2 e G3 promoveram aumento da expressão desse marcador após vacinações, e seus controles exibiram decréscimo. Embora o G1 tenha se mantido estável, todos os grupos vacinados exibiram maior expressão do marcador CD25<sup>+</sup> que seus respectivos controles. A expressão desse marcador ocorre exclusivamente em linfócitos após reconhecimento antígeno-específico, pois possui alta afinidade com a cadeia alfa do receptor de IL-2 e indução da mitose de clones no processo de reconhecimento desses antígenos por linfócitos (QUADE; ROTH, 1999; ENDSLEY et

al., 2003). A maior expressão do CD25<sup>+</sup> nos grupos vacinados pode sinalizar para resposta celular e proteção dos bezerros para as infecções naturais.

Desafios de células mononucleares bovina com as viroses respiratórias *in vitro* tem demonstrado o aumento da expressão do marcador CD25<sup>+</sup> pelas células T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e WC1<sup>+</sup> após exposição natural ou vacinação (RIDPATH et al., 2003; ENDSLEY et al., 2004; PLATT et al., 2008; PLATT et al., 2009; SLUIJS; KUHN; MAKOSCHEY). Apesar das maiores proporções de CD25<sup>+</sup> obtidas para os grupos vacinados, o modelo adotado por este estudo não permite afirmar que a resposta foi exclusiva às cepas vacinais, assim pode ter sofrido influências da exposição natural aos patógenos.

## 12 CONCLUSÕES

Com base nos resultados supracitados, conclui-se que:

- a) A intensidade da imunidade humoral dos bezerros induzida pela vacinação aumentou de acordo com o desenvolvimento etário;
- b) A vacinação dos bezerros aos três e seis meses de idade manteve ou estimulou a produção de anticorpos para o BoHV-1, BRSV e BPIV-3;
- c) A vacina inativada com BVDV não exerceu resposta imune humoral completamente efetiva após vacinação;
- d) A resposta imune mediada por células foi maior no grupo de animais vacinados pela maior proporção de linfócitos T auxiliares (CD4<sup>+</sup>) e gamma-delta (WC1<sup>+</sup>);
- e) A vacinação promoveu a ativação de células T expressas pelo marcador CD25<sup>+</sup>, o que pode ter sido responsável pela proteção dos bezerros vacinados frente à DRB;
- f) A relação entre a imunidade colostrar e vacinal apresentou perfil inversamente proporcional.

## REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 564p.

ACKERMANN, M.; PETERHANS, E.; WYLER, R. DNA of Bovine Herpesvirus type 1 in the trigeminal ganglia of latently infected calves. **American Journal of Veterinary Research**, v.43, n.1, p.36-40,1982.

ACKERMANN, M. R.; DERSCHEID, R.; ROTH, J. A. Innate immunology of bovine respiratory disease. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 26, n. 2, p. 215–28, 2010.

ADLER, B.; ADLER, H.; PFISTER, H.; JUNGI, T. W.; PETERHANS, E. Macrophages infected with cytopathic bovine viral diarrhoea virus release a factor ( s ) capable of priming uninfected macrophages for activation-induced apoptosis. **Journal of Virology**, v. 71, n.4, p. 3255–3258, 1997.

AFFONSO, I. B. **Caracterização epidemiológica da infecção pelo vírus respiratório sincicial bovino (BRSV) em rebanhos bovinos leiteiros do estado de São Paulo**. Jaboticabal, 2013. 72f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária Preventiva) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2013.

ALEXANDRINO, B.; DIAS, F. C.; OLIVEIRA, M. C.; AFFONSO, G. T.; PEREIRA, G. T.; SAMARA, S. I. Herpesvirus bovino associado à diarréia viral bovina e à leucose bovina. **Ars Veterinária**, v. 27, n. 3, p. 168-174, 2011.

ALICE, F.J. Isolation of infectious bovine rhinotracheitis vírus (IBR) in Brazil (preliminary note). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 38, n. 4, p. 919-920, 1978.

AMES, T. R. Hosts. In: GOYAL, S. M.; RIDPATH, J. F. **Bovine viral diarrhoea virus: diagnosis, management, and control**. Ames: Blackwell Publishing, 2005. 171 p.

ANDREWES, C. H.; BANG, F. B.; BURNET, F. M. A short description of the Myxovirus group (influenza and related viruses). **Virology**, v. 1, n. 2, p. 176-184, 1955.

ARCHAMBAULT, D.; BÉLIVEAU, C.; COUTURE, Y.; CARMAN, S. Clinical response and immunomodulation following experimental challenge of calves with type 2 noncytopathogenic bovine viral diarrhea virus. **Veterinary Research**, v. 31, n. 2, p. 215-227, 2000.

ARENHART, S.; BAUERMANN, F. V.; OLIVEIRA, S. A. M.; WEIBLEN, R.; FLORES, E. F. Excreção e transmissão do vírus da diarreia viral bovina por bezerros persistentemente infectados. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.29, n.29, p.736-742, 2009.

AYOUB, I. A.; YANG, T. J. Age-dependent changes in peripheral blood lymphocyte subpopulations in cattle: a longitudinal study. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 20, n. 5, p. 353-363, 1996.

BABIUK, L. A.; VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S.; TIKOO, S. A. Immunology of bovine herpesvirus 1 infection. **Veterinary Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 31-42, 1996.

BACCILI, C. C. **Imunização passiva e ativa de bezerros para o Vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) e Herpesvírus Bovino tipo 1 (BoHV-1)**. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2013. 124f. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

BAMFORD, A. I.; ADAIR, B. M.; FOSTER, J. C. Primary cytotoxic response of bovine peripheral blood leukocytes to Parainfluenza Type 3 virus infection. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 45, n. 1, p. 85-95, 1995.

BARRINGTON, G. M.; PARISH, S. M. Bovine neonatal immunology. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 17, n. 3, p. 463-476, 2001.

BATISTA, C. F.; BLAGITZ, M. G.; SANTOS, B. P.; BERTAGNON, H. G.; PARRA, A. C.; VIANNA, R. S., DE LUCCA, G. G.; LIMA, M. G.; SANTOS, D. S.; DELLA LIBERA, A. M. M. P. Maturation of mononuclear phagocytes in the lungs of young calves - In vitro study. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 10, p. 5909-5915, 2012.

BATISTA, F. D.; HARWOOD, N. E. The who, how and where of antigen presentation to B cells. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, n. 1, p. 15-27, 2009.

BAUERMANN, F. V.; RIDPATH, J. F.; WEIBLEN, R.; FLORES, E. F. HOBI-like viruses an emerging group of pestiviruses. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 25, n. 1, p. 6-15, 2013.

BESSER, T. E.; GAY, C. C.; PRITCHETT, L. Comparison of three methods of feeding colostrum to dairy calves. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 198, n. 3, p. 419-422, 1991.

BIANCHI, E.; MARTINS, M.; WEIBLEN, R.; FLORES, E. F. Perfil genotípico e antigênico de amostras do vírus da diarreia viral bovina isoladas no Rio Grande do Sul (2000-2010). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 8, p. 649–655, 2011.

BIELEFELDT OHMANN, H.; BABIUK, L.A.; HARLAND, R. Cytokine synergy with viral cytopathic effects and bacterial products during the pathogenesis of respiratory tract infection. **Clinical Immunology and Immunopathology**, n. 60, p. 153, 1991.

BIBURGER, M.; LUX, A.; NIMMERJAHN, F. How immunoglobulin g antibodies kill target cells: revisiting an old paradigm. **Advances in Immunology**, v. 124, p. 67-94, 2014.

RIDPATH, J. F.; BOLIN, S. R. The genomic sequence of a virulent bovine viral diarrhea virus (BVDV) from the type 2 genotype: detection of a large genomic insertion in a noncytopathic BVDV. **Virology**, v. 212, n. 1, p. 39-46, 1995.

BRODERSEN, BRUCE W.; KELLING, CLAYTON L. Alteration of leukocyte populations in calves concurrently infected with bovine respiratory syncytial virus and bovine viral diarrhea virus. **Viral immunology**, v. 12, n. 4, p. 323-334, 1999.

BROWNLIE, J. Bovine virus diarrhea virus: pathogenesis and control. In: WORLD BUIATRICS CONGRESS, 22.; Hannover, 2002. **Anais...** Hannover, [s.n.], 2002.

BRYAN, L. A.; FENTON, R. A.; MISRA, V.; HAINES, D. M. Fatal, generalized bovine herpesvirus type-1 infection associated with a modified-live infectious bovine rhinotracheitis parainfluenza-3 vaccine administered to neonatal calves. **Canadian Veterinary Journal**, v. 35, n. 4, p. 223, 1994.

BUENO, S. M.; GONZÁLEZ, P. A.; PACHECO, R.; LEIVA, E. D.; CAUTIVO, K. M.; TOBAR, H. E.; JORGE E. MORA, J.E.; PRADO, C.E.; ZÚÑIGA, J.P.; JIMÉNEZ, J.; RIEDEL, C.A.; KALERGIS, A.M. Host immunity during RSV pathogenesis. **International Immunopharmacology**, v. 8, n.10, p. 1320-1329, 2008.

CAMPALANS, J; ARNS, C. W. Serological evidence of bovine respiratory syncytial virus in Brazil. **Virus Reviews and Research**, v. 2, n. 1-2, p. 50-56,1997.

CAMPOS, M.; ROSSI, C. R.; LAWMAN, M. J. Natural cell-mediated cytotoxicity of bovine mononuclear cells against virus-infected cells. **Infection and immunity**, v. 36, n. 3, p. 1054-1059, 1982.

CANDEIAS, J. A. N.; RIBEIRO, L. C. Anticorpos inibidores da hemaglutinação para as cepas SF-4 e HA-1 de Myxovirus parainfluenza 3, em gado bovino do estado de São Paulo. **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 37, p. 129-35, 1970.

CANDEIAS, J. A. N.; SUGAY, W.; RIBEIRO, L. C. Isolamento do Myxovirus parainfluenza 3 em gado bovino do estado de São Paulo. **Revista de Saúde Pública**, v. 5, p. 207-212, 1971.

CARMAN, S.; VAN DREUMEL, T.; RIDPATH, J.; HAZLETT, M.; ALVES, D.; DUBOVI, E.; ANDERSON, N. Severe acute bovine viral diarrhea in Ontario, 1993–1995. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 10, n. 1, p. 27-35, 1998.

CHAMORRO, M. F.; WALZ, P. H.; HAINES, D. M.; PASSLER, T.; EARLEYWINE, T.; PALOMARES, R. A.; RIDDELL, K. P.; GALIK, P.; ZHANG, Y.; GIVENS, M. D. Comparison of levels and duration of detection of antibodies to bovine viral diarrhea virus 1, bovine viral diarrhea virus 2, bovine respiratory syncytial virus, bovine herpesvirus 1, and bovine parainfluenza virus 3 in calves fed maternal colostrum or a colostrum-replacement product. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 78, n. 2, p. 81, 2014.

CHASE, C. C. L.; ELMOWALID, G.; YOUSIF, A. A. A. The immune response to bovine viral diarrhea virus: a constantly changing picture. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 20, n. 1, p. 95–114, 2004.

CHASE, C. C. L.; HURLEY, D. J.; REBER, A. J. Neonatal immune development in the calf and its impact on vaccine response. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 24, n. 1, p. 87–104, 2008.

CHASE, C. C. L.; THAKUR, N.; DARWEESH, M. F.; MORARIE-KANE, S. E.; RAJPUT, M. K. Immune response to bovine viral diarrhea virus—looking at newly defined targets. **Animal Health Research Reviews**, v. 16, n. 1, p. 4-14, 2015.

CHILDS, T. X disease of cattle—Saskatchewan. **Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science**, v. 10, n. 11, p. 316, 1946.

COLLEN, T.; CARR, V.; PARSONS, K.; CHARLESTON, B.; MORRISON, W. I. Analysis of the repertoire of cattle CD4 T cells reactive with bovine viral diarrhoea virus. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 87, p. 2–5, 2002.

COLLEN, T.; MORRISON, W. I. CD4<sup>+</sup> T-cell responses to bovine viral diarrhoea virus in cattle. **Virus Research**, v. 67, p. 67–80, 2000.

CORAPI, W. V.; DONIS, R. O.; DUBOVI, E. J. Characterization of a panel of monoclonal antibodies and their use in the study of the antigenic diversity of bovine viral diarrhoea virus. **American Journal of Veterinary Research**, v. 51, n. 9, p. 1388-1394, 1990.

CORREA, W. M.; NETTO, Z. C.; BARROS, H. M. Nota clínico-patológica de uma enfermidade das mucosas em São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo**, v. 35, p. 141-151, 1968.

CORIA, M. F.; MCCLURKIN, A. W. Duration of active and colostrum-derived passive antibodies to bovine viral diarrhoea virus in calves. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 42, n. 2, p. 239–243, 1978.

CORTESE, V. S. Neonatal immunology. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 25, n. 1, p. 221–227, 2009.

DAVIS, C. L.; DRACKLEY, J. K. **The development, nutrition, and management of the young calf**. Ames: Iowa State University Press, 1998.

DAWSON, P. S. Persistence of maternal antibodies to parainfluenza 3 virus. **Journal of Comparative Pathology**, v. 76, n. 4, p. 373-378, 1966.

DECARO, N.; LUCENTE, M. S.; MARI, V.; CIRONE, F.; CORDIOLI, P.; CAMERO, BUONAVOGLIA, C.; SCIARRETTA, R.; LOSURDO, M.; LORUSSO, E. Atypical pestivirus and severe respiratory disease in calves, Europe. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 8, p. 1549–52, 2011.

DENIS, M.; SLAOUI, M.; KEIL, G.; BABIUK, L. A.; ERNST, E.; PASTORET, P. P.; THIRY, E. Identification of different target glycoproteins for bovine herpes virus type 1-specific cytotoxic T lymphocytes depending on the method of in vitro stimulation. **Immunology**, v.78, n. 1, p. 1-7, 1993.

DENISE, S. K.; ROBISON, J. D.; STOTT, G. H.; ARMSTRONG, D. V. Effects of passive immunity on subsequent production in dairy heifers. **Journal of Dairy Science**, v. 72, n. 2, p. 552–4, 1989.

DEUTSKENS, F.; LAMP, B.; RIEDEL, C.M.; WENTZ, E.; LOCHNIT, G.; DOLL, K.; RÜMENAPF, T. Vaccine-induced antibodies linked to bovine neonatal pancytopenia (BNP) recognize cattle major histocompatibility complex class I (MHC I). **Veterinary Research**, v. 42, n. 1, p. 97, 2011.

DONIS, R. O. Molecular biology of bovine viral diarrhea virus and its interactions with the host. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 11, n. 3, p. 393-423, 1995.

EDWARDS, S.; WHITE, H.; NIXON, P. A study of the predominant genotypes of bovid herpesvirus 1 found in the UK. **Veterinary microbiology**, v. 22, n. 2, p. 213-223, 1990.

ELFSTRAND, L.; MANSSON, H. L.; PAULSSON, M.; NYBERG, L.; AKESSON, B. Immunoglobulins, growth factors and growth hormone in bovine colostrums and the effects of processing. **International Dairy Journal**, n. 12, p. 879-887, 2002.

ELIZONDO-SALAZAR, J. A.; JONES, C. M.; HEINRICH, A. J. Technical Note: Feeding colostrum with an esophageal feeder does not reduce immunoglobulin G absorption in neonatal dairy heifer calves. **Professional Animal Scientist**, v. 27, n. 6, p. 561-564, 2011.

ELLIS, J. A. Bovine parainfluenza-3 virus. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 26, n. 3, p. 575–93, 2010.

ELLIS, J. A.; DAVIS, W. C.; BELDEN, E. L.; PRATT, D. L. Flow cytometric analysis of lymphocyte subset alterations in cattle infected with bovine viral diarrhea virus. **Veterinary Pathology**, v. 25, n. 3, p. 231-236, 1988.

ELLIS, J.; GOW, S.; BOLTON, M.; BURDETT, W.; NORDSTROM, S. Inhibition of priming for bovine respiratory syncytial virus-specific protective immune responses following parenteral vaccination of passively immune calves. **Canadian veterinary journal**, v. 55, n. 12, p. 1180-1185, 2014.

ELLIS, J.; WEST, K.; CORTESE, V.; KONOBY, C.; WEIGEL, D. Effect of maternal antibodies on induction and persistence of vaccine-induced immune responses

against bovine viral diarrhea virus type II in young calves. **Journal American Veterinary Medical Association**, v. 219, n. 3, p. 351-356, 2001.

ENDSLEY, J. J.; RIDPATH, J. F.; NEILL, J. D.; SANDBULTE, M. R.; ROTH, J. A. Induction of T lymphocytes specific for bovine viral diarrhea virus in calves with maternal antibody. **Viral Immunology**, v. 17, n. 1, p. 13-23, 2004.

ENDSLEY, J. J.; ROTH, J. A.; RIDPATH, J.; NEILL, J. Maternal antibody blocks humoral but not T cell responses to BVDV. **Biologicals**, v. 31, n. 2, p. 123–125, 2003.

EVERMANN, J.F.; BARRINGTON, G.M. Clinical features. In: GOYAL, S. M.; RIDPATH, J. F. **Bovine viral diarrhea virus: diagnosis, management, and control**. 1ª ed. Ames: Blackwell Publishing, 2005. 105 p.

FABER, S. N.; FABER, N. E.; MCCAULEY, T. C.; AX, R. L. Case study: effects of colostrum ingestion on lactational performance. **Professional Animal Scientist**, v. 21, n. 5, p. 420–425, 2005.

FAUQUET, C. M.; FARGETTE, D. International Committee on Taxonomy of Viruses and the 3,142 unassigned species. **Virology Journal**, v. 2, p. 64, 2005.

FEITOSA, F. L.; CAMARGO, D. G.; YANAKA, R.; MENDES, L. C.; PEIRÓ, J. R.; BOVINO, F.; LISBOA, J. A. N.; PERRI, S. H. V.; GASPARELLI, E. R. F. Índices de falha de transferência de imunidade passiva (FTIP) em bezerros holandeses e nelores, às 24 e 48 horas de vida: valores de proteína total, de gamaglobulina, de imunoglobulina G e da atividade sérica de gamaglutamiltransferase, para o diagnóstico de FTIP. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, n.1, p. 696-704, 2010.

FENNER, F. **Veterinary virology**. Londres: Academic Press, 1987. 445 p.

FLORES E.F. 2012. **Virologia veterinária: virologia geral e doenças víricas**. 2.ed. Santa Maria: Editora UFSM, 888p.

FLORES E.F.; WEIBLEN R.; VOGEL F.S.; ROEHE P.M.; ALFIERI A.A.; PITUCO E.M. A infecção pelo vírus da diarreia viral bovina no Brasil - histórico situação atual e perspectivas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, n.3, p. 125-134, 2005.

FRANK, G. H.; MARSHALL, R. G. Relationship of serum and nasal secretion-neutralizing antibodies in protection of calves against parainfluenza-3 virus. **American Journal of Veterinary Research**, v. 32, n. 11, p. 1707, 1971.

FULTON, R. W.; BRIGGS, R. E.; PAYTON, M. E.; CONFER, A. W.; SALIKI, J. T.; RIDPATH, J. F.; BURGE, L. J.; DUFF, G. C. Maternally derived humoral immunity to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) 1a, BVDV1b, BVDV2, bovine herpesvirus-1, parainfluenza-3 virus bovine respiratory syncytial virus, *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* in beef calves, antibody decline by half-life studies and effect on response to vaccination, **Vaccine**, v. 22, n. 5-6, p. 643-649, 2004.

FULTON, R. W.; BURGE, L. J. Bovine viral diarrhoea virus types 1 and 2 antibody response in calves receiving modified live virus or inactivated vaccines. **Vaccine**, v. 19, n. 2, p. 264-274, 2000.

FULTON, R. W.; RIDPATH, J. F.; CONFER, A. W.; SALIKI, J. T.; BURGE, L. J.; PAYTON, M. E. Bovine viral diarrhoea virus antigenic diversity: impact on disease and vaccination programmes. **Biologicals**, v. 31, n.2, p. 89-95, 2003.

GADDUM, R. M.; COOK, R. S.; THOMAS, L. H. Primary cytotoxic T-cell responses to bovine respiratory syncytial virus in calves. **Immunology**, v. 12, p. 421-427, 1996.

GALVÃO, C.; DOLIA, J.; ALICE, F. Anticorpos neutralizantes para o vírus da Rinotraqueíte Infecciosa dos bovinos no Brasil. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 6, n. 1, p. 15-25, 1963.

GATES, G. A.; CESARIO, T. C.; EBERT, J. W.; KRIEL, R. L.; WULFF, H. T.; POLAND, J. D.; GUTEKUNST, D. E.; CHIN, T. D. Y. Neutralizing antibody in experimentally induced respiratory infection in calves. **American Journal of Veterinary Research**, v.31, p. 217-224, 1970.

GATTI, S.P.; AFFONSO, I.B.; DIAS, F.C.; MEDEIROS, A.S.R.; FERREIRA, F.; SAMARA, S.I. Títulos de anticorpos antiherpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) de bezerras em três rebanhos leiteiros do estado de São Paulo, Brasil. **Ars Veterinaria**, v. 26, n. 3, p. 147-152, 2010.

GERSHWIN, L. J.; GUNTHER, R. A.; HORNOF, W. J.; RICHARD, F. Effect of infection with bovine respiratory syncytial virus on pulmonary clearance of an inhaled antigen in calves. **American Journal of Veterinary Research**, v. 69, n. 3, p. 416-422, 2008.

GILLESPIE, J.H.; BAKER, J.A.; MCENTEE, K.A. A cytopathogenic strain of bovine viral diarrhoea virus. **Cornell Veterinarian**, v. 50, p. 73-79, 1960.

GLEW, E. J.; CARR, B. V.; BRACKENBURY, L. S.; HOPE, J. C.; CHARLESTON, B.; HOWARD, C. J. Differential effects of bovine viral diarrhoea virus on monocytes and dendritic cells. **Journal of General Virology**, v. 84, n. 7, p. 1771-1780, 2003.

GODDEN, S. Colostrum management for dairy calves. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 24, n. 1, p. 19-39, 2008.

GOENS, S. Denise. The evolution of bovine viral diarrhoea: a review. **Canadian Veterinary Journal**, v. 43, n. 12, p. 946, 2002.

GOMES, V.; MADUREIRA, K. M.; DELLA LIBERA, A.M.M.P.; BLAGITZ, M. G.; ALVES, M.; BAPTISTELA, F.; BENESI, F. J. Dinâmica da celularidade do colostro de vacas da raça Holandesa no pós-parto imediato. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, p. 1047-1053, 2011.

GOMES, V.; BACCILI, C. C.; BALDACIM, V. A. P.; SILVA, B. T.; NOVO, S. M. F.; SILVA, C. P. C. E.; BRAGA, F.; PINTO, V. S. C.; PITUCO, E. M.; POZZI, C. R. Imunização ativa de vacas no período pré-parto e transferência de imunidade passiva aos bezerros recém-nascidos para o vírus da diarréia viral bovina e herpesvirus bovino. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 27.; Salvador. **Anais...Salvador**, [S.B.T.E.], 2013.

GOMES, V.; BACCILI, C. C.; SILVA, C. P. C.; PINTO, V. S. C.; SILVA, B. T.; POZZI, C. R.; RIBEIRO, C. P.; PITUCO, E. M. Humoral immunity assessment in calves born to cows immunized with inactivated vaccine for bovine herpesvirus 1 and bovine viral diarrhoea virus. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.42, n. 1239, 2014.

GONÇALVES, I. P. D.; SIMANKE, A. T.; JOST, H. C.; HÖTZEL, I.; DAL SOGLIO, A.; MOOJEN, V. Detection of bovine respiratory syncytial virus in calves of Rio Grande do Sul, Brazil. **Ciência Rural**, v. 23, n. 3, p. 389-390, 1993.

GONÇALVES, R. C.; SILVA, A. A.; FERREIRA, D. O. L.; MARCONDES, J. S.; PITUCO, E. M.; DIAS, A. Detection of serum antibodies to parainfluenza type 3 virus, respiratory syncytial virus, bovine viral diarrhoea virus, and herpes virus type 1 in sheep in the Region of Botucatu, São Paulo – Brazil. **Journal of Veterinary Medicine and Animal Health**, v. 3, n. 4, p. 1-5, 2011.

GRIEBEL, P. J.; QUALTIERE, L.; DAVIS, W. C.; LAWMAN, M. J. P.; BABIUK-, L. A. Bovine peripheral blood leukocyte subpopulation dynamics following a primary bovine herpesvirus-1 infection. **Viral Immunology**, v. 1, n. 4, p. 267-286, 1987.

GUZMAN, E.; PRICE, S.; POULSOM, H.; HOPE, J. Bovine  $\gamma\delta$  T cells: cells with multiple functions and important roles in immunity. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 148, n. 1-2, p. 161-7, 2012.

HAERYFAR, S. M. The importance of being a pDC in antiviral immunity: the IFN mission versus Ag presentation? **Trends in Immunology**, v. 26, p. 311-317, 2005.

HÄGGLUND, S.; HJORT, M.; GRAHAM, D. A.; ÖHAGEN, P.; TÖRNQUIST, M.; & ALENIUS, S. A six-year study on respiratory viral infections in a bull testing facility. **Veterinary Journal**, v. 173, n. 3, p. 585-593, 2007.

HÄGGLUND, S.; SVENSSON, C.; EMANUELSON, U.; VALARCHER, J. F.; ALENIUS, S. Dynamics of virus infections involved in the bovine respiratory disease complex in Swedish dairy herds. **Veterinary Journal**, v. 172, n. 2, p. 320-328, 2006.

HAMAGUCHI, M.; YOSHIDA, T.; NISHIKAWA, K.; NARUSE, H.; NAGAI, Y. Transcriptive complex of Newcastle disease virus: I. Both L and P proteins are required to constitute an active complex. **Virology**, v.128, n.1, p. 105-117, 1983.

HORWOOD, P. F.; GRAVEL, J. L.; MAHONY, T. J. Identification of two distinct bovine parainfluenza virus type 3 genotypes. **Journal of General Virology**, v. 89, n. 7, p. 1643-1648, 2008

HOU, S.; DOHERTY, P. C.; ZIJLSTRA, M.; JAENISCH, R.; KATZ, J. M. Delayed clearance of Sendai virus in mice lacking class I MHC-restricted CD8+ T cells. **Journal of Immunology**, v. 149, n. 4, p. 1319-1325, 1992.

HÜBNER, S.D.O.; WEIBLEN, R.; SILVA, A.M.D.; MORAES, M.P. Evolução da imunidade passiva contra o herpesvírus bovino tipo 1. **Ciência Rural**, v. 26, n. 3, p. 435-439, 1996.

JOHNSON, K.; MOREIN, B. In vitro stimulation of bovine circulating lymphocytes by parainfluenza type 3 virus. **Research in Veterinary Science**, v. 22, n. 1, p. 83-85, 1977.

KAEBERLE, M. L.; SEALOCK, R.; HONEYMAN, M. Antibody responses of young calves to inactivated viral vaccines. **Bovine Practitioner**, v. 31, p. 229–232, 1998.

KAMPEN, A. H.; OLSEN, I.; TOLLERSRUD, T.; STORSET, A. K.; LUND, A. Lymphocyte subpopulations and neutrophil function in calves during the first 6 months of life. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 113, n. 1-2, p. 53–63, 2006.

KAPIL, S.; BASARABA, R. J. Infectious bovine rhinotracheitis, parainfluenza-3, and respiratory coronavirus. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 13, n. 3, p. 455-469, 1997.

KELLING, C. L. Evolution of bovine viral diarrhea virus vaccines. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 20, n. 1, p. 115–29, 2004.

KELLY, Gregory S. Bovine colostrums: a review of clinical uses. **Alternative Medicine Review**, v. 8, n. 4, p. 378-394, 2003.

KERKHOF, P.; TIGNON, M.; PETRY, H.; MAWHINNEY, I.; SUSTRONCK, B. Immune responses to bovine respiratory syncytial virus (BRSV) following use of an inactivated BRSV-PI3-*Mannheimia haemolytica* vaccine and a modified live BRSV-BVDV vaccine. **Veterinary Journal**, v. 167, n. 2, p. 208–10, 2004.

KIMMAN, T. G.; WESTENBRINK, F.; SCHREUDER, B. E. C.; STRAVER, P. J. Local and systemic antibody response to bovine respiratory syncytial virus infection and reinfection in calves with and without maternal antibodies. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, n. 6, p. 1097-1106, 1987.

KIRKPATRICK, J. G.; STEP, D. L.; PAYTON, M. E.; RICHARDS, J. B.; LAWRENCE, F. Effect of age at the time of vaccination on antibody titers and feedlot performance in beef calves. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 233, n. 1, p. 136-142, 2008.

KIRKPATRICK, J.; FULTON, R. W.; BURGE, L. J.; DUBOIS, W. R.; PAYTON, M. Passively transferred immunity in newborn calves, rate of antibody decay, and effect on subsequent vaccination with modified live virus vaccine. **Bovine Practitioner**, v. 35, n. 1, p. 47-55, 2001.

KRUSE, P. E. The importance of colostral immunoglobulins and their absorption from the intestine of the newborn animals. **Annales de Recherches Vétérinaires**, v. 14, n. 4, p.349-353, 1983.

LAMBOT, M.; DOUART, A.; JORIS, E.; LETESSON, J.; PASTORET, P. Characterization of the immune response of cattle against non-cytopathic and cytopathic biotypes of bovine viral diarrhoea virus. **Journal of General Virology**, v. 78, n. 5, p. 1041-1047, 1997.

LANGONI, H.; PAES, A.C.; TONIN, F.B.; SILVA, A.V.; DENARDI, M.B. Prevalence of BVD, IBR and PI 3 in bovine by ELISA test. In: *Viroológica*, 5.; Ribeirão Preto. **Anais...Ribeirão Preto**, [S. B. V.], 1995.

LA MOTTE, G. B.; EBERHART, R. J. Blood leukocytes, neutrophil phagocytosis, and plasma corticosteroids in colostrum-fed and colostrum-deprived calves. **American Journal of Veterinary Research**, v. 37, p. 1189-1193, 1976.

LEARY, T. P.; SPLITTER, G. A. A method for the rapid identification of T lymphocyte epitopes. **Peptide Research**, v. 3, n. 6, p. 259-261, 1989.

LEMAIRE, N. E.; MEYER, G.; BARANOWSKI, E. Production of bovine herpesvirus type 1-seronegative latent carriers by administration of a live-attenuated vaccine in passively immunized calves. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 11, p. 4233-4238, 2000.

LEVINGS, R. L.; ROTH, J. A. Immunity to bovine herpesvirus 1: I. viral lifecycle and innate immunity. **Animal Health Research Reviews**, v. 14, n. 01, p. 88-102, 2013a.

LI, Y.; BABIUK, L. A.; LIANG, X. Characterization of cell-binding properties of bovine herpesvirus 1 glycoproteins B, C, and D: identification of a dual cell-binding function of gB. **Journal of Virology**, v. 69, n. 8, p. 4758-4768, 1995.

LIEBLER-TENORIO, E. M.; RIDPATH, J. F.; NEILL, J. D. Lesions and tissue distribution of viral antigen in severe acute versus subclinical acute infection with BVDV2. **Biologicals**, v. 31, n. 2, p. 119-122, 2003.

LIMA, M.D.; VOGEL, F.S.F.; FLORES, E.F. WEIBLEN, R. Anticorpos neutralizantes contra o vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV): comparação entre um imunógeno experimental atenuado e três vacinas comerciais inativadas. **Ciência Rural**, v. 35, n. 1, p. 230-234, 2005.

LINDBERG, A. L. E. Bovine viral diarrhoea virus infections and its control. A review. **Veterinary Quarterly**, v. 25, n. 1, p. 1-16, 2003.

LINDENBACH, B. D.; PRÁGAI, B. M.; MONTSERRET, R.; et al. The C terminus of hepatitis C virus NS4A encodes an electrostatic switch that regulates NS5A hyperphosphorylation and viral replication. **Journal of Virology**, v. 81, n. 17, p. 8905–18, 2007.

LITTEL-VAN DEN HURK, S.; MAPLETOFT, J. W.; ARSIC, N.; KOVACS-NOLAN, J. Immunopathology of RSV infection: prospects for developing vaccines without this complication. **Reviews in Medical Virology**, v. 17, n. 1, p. 5-34, 2007.

LIU, L.; XIA, H.; WAHLBERG, N.; BELÁK, S.; BAULE, C. Phylogeny, classification and evolutionary insights into pestiviruses. **Virology**, v. 385, n. 2, p. 351–7, 2009.

LONERAGAN, G. H.; GOULD, D. H.; MASON, G. L.; et al. Involvement of microbial respiratory pathogens in acute interstitial pneumonia in feedlot cattle. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 10, p. 1519-1524, 2001

MAIDANA, S. S.; LOMONACO, P. M.; COMBESSIES, G.; CRAIG, M. I.; DIODATI, J.; RODRIGUEZ, D.; PARREÑO, V.; ZABAL, O.; KONRAD, J. L.; CRUDELLI, G. MAUROY, A.; THIRY, E.; ROMERA. Isolation and characterization of bovine parainfluenza virus type 3 from water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Argentina. **BMC Veterinary Research**, v. 8, n. 1, p. 83, 2012.

MAWHINNEY, I. C.; BURROWS, M. R. Protection against bovine respiratory syncytial virus challenge following a single dose of vaccine in young calves with maternal antibody. **Veterinary Record**, v. 156, n. 5, p. 139-143, 2005.

MCCLAIN, D. S.; FULLER, A. O. Cell-specific kinetics and efficiency of herpes simplex virus type 1 entry are determined by two distinct phases of attachment. **Virology**, v. 198, n. 2, p. 690-702, 1994.

MCGUIRE, R. L.; BABIUK, L. A. Evidence for defective neutrophil function in lungs of calves exposed to infectious bovine rhinotracheitis virus. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 5, n. 3, p. 259-271, 1984.

MECHOR, G. D.; GRÖHN, Y. T.; VAN SAUN, R. J. Effect of temperature on colostrometer readings for estimation of immunoglobulin concentration in bovine colostrum. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 11, p. 3940-3943, 1991.

MECHOR, G. D.; ROUSSEAU, C. G.; RADOSTITS, O. M.; BABIUK, L. A.; PETRIE, L. Protection of newborn calves against fatal multisystemic infectious bovine rhinotracheitis by feeding colostrum from vaccinated cows. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 51, p. 452-459, 1987.

MENANTEAU-HORTA, A. M.; AMES, T. R.; JOHNSON, D. W.; Effect of maternal antibody upon vaccination with infectious bovine rhinotracheitis and bovine virus diarrhea vaccines. **Canadian Journal Compendium Medical**, v. 49, p. 10-14, 1985.

METTENLEITER, T. C. Herpesvirus assembly and egress. **Journal of Virology**, v. 76, n. 4, p. 1537-1547, 2002.

METZLER, A. E.; MATILE, H.; GASSMANN, U.; ENGELS, M.; WYLER, R. European isolates of bovine herpesvirus 1: a comparison of restriction endonuclease sites, polypeptides, and reactivity with monoclonal antibodies. **Archives of Virology**, v. 85, n. 1-2, p. 57-69, 1985.

METZLER, A. E.; SCHUDEL, ALEJANDRO A.; ENGELS, M. Bovine herpesvirus 1: molecular and antigenic characteristics of variant viruses isolated from calves with neurological disease. **Archives of Virology**, v. 87, n. 3-4, p. 205-217, 1986.

MOELLER JR, R. B.; ADASKA, J.; REYNOLDS, J.; & BLANCHARD, P. C. Systemic Bovine herpesvirus 1 infections in neonatal dairy calves. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 25, n. 1, p-136-141, 2013.

MOERMAN, A.; STRAVER, P. J.; JONG, M. C. M.; QUAK, J.; BAANVINGER, T.; VAN OIRSCHOT, J. T. Clinical consequences of a bovine virus diarrhoea virus infection in a dairy herd: a longitudinal study. **Veterinary Quarterly**, v. 16, n. 2, p. 115-119, 1994

MORENO-LÓPEZ, J. Cell-mediated immunity to Parainfluenza-3 (PIV-3) in cattle evaluation of in vivo and in vitro tests. **Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B**, v. 24, n. 3, p. 231-240, 1977.

MORRILL, K. M.; CONRAD, E.; LAGO, A.; CAMPBELL, J.; QUIGLEY, J.; TYLER, H. Nationwide evaluation of quality and composition of colostrum on dairy farms in the United States. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 7, p. 3997-4005, 2012.

MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. **Imunobiologia de Janeway**. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 908 p.

MUYLKENS, B.; THIRY, J.; KIRTEN, P.; SCHYNTS, F.; THIRY, E. Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. **Veterinary Research**, v. 38, p. 181–209, 2007.

NEILL, J. D.; RIDPATH, J. F.; VALAYUDHAN, B. T. Identification and genome characterization of genotype B and genotype C bovine parainfluenza type 3 viruses isolated in the United States. **BMC Veterinary Research**, v. 11, n. 1, p. 112, 2015.

NOVO, S. M. F.; FREITAS, R. L.; SILVA, C. C. P.; BALDACIM, V. A. P.; BACCILI, C. C.; DOS REIS, J. F.; HAGIWARA, M. K.; GOMES, V. Adaptação hematológica de bezerras Holandesas durante o período neonatal. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 52, n. 3, p. 212-216, 2015.

OEM, J. K.; LEE, E. Y.; LEE, K. K.; KIM, S. H.; LEE, M. H.; HYUN, B. H. Molecular characterization of a Korean bovine parainfluenza virus type 3 isolate. **Veterinary Microbiology**, v. 162, n. 1, p. 224–227, 2012.

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES – World Organization for Animal Health. **Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals**, 2013. Disponível em <<http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>>. Acesso em: 05 jul. 2013.

OKUDA, L. H.; AGUIAR, D. M.; CAVALCANTE, G. T.; STEFANO, E.; DEL FAVA, C.; PITUCO, E. M.; LABRUNA, M. B.; CAMARGO, L. M. A.; GENNARI, S. M. Inquérito soro-epidemiológico do Herpesvírus Bovino tipo 1 (BoHV-1) no município de Monte Negro, Estado de Rondônia, Brasil. **Biológico**, v.68, p.157-159, 2006.

OLAFSON, P.; MACCALLUM, A. D.; FOX, A. An apparently new transmissible disease of cattle. **Cornell Veterinary**, n. 36, p. 205-213, 1946.

OLIVEIRA, E. A. S. **Caracterização antigênica de amostras de vírus da diarreia vírica bovina com anticorpos monoclonais**. Porto Alegre, 1996. 65f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1996.

PAAPE, M.J.; GUIDRY, A.J.; JAIN, N.C.; MILLER, R.H. Leukocytic defense mechanisms in the udder. **Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift**, v. 62, p. 95-109, 1991.

PAAPE, M.; MEHRZAD, J.; ZHAO, X.; DETILLEUX, J.; BURVENICH, C. Defense of the bovine mammary gland by polymorphonuclear neutrophil leukocytes. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v.7, n.2, p. 109-121, 2002.

PACCAUD, M. F.; JACQUIER, C. L. A respiratory syncytial virus of bovine origin. **Archiv Für Die Gesamte Virusforschung**, v. 30, n. 4, p. 327-342, 1970.

PAKKANEN, R.; AALTO, J. Growth factors and antimicrobial factors of bovine colostrum. **International Dairy Journal**, v. 7, n. 5, p. 285-297, 1997.

PARRISH, D. B.; WISE, G. H.; HUGHES, J. S.; ATKESON, F. W. Properties of the colostrum of the dairy cow. V. Yield, specific gravity and concentrations of total solids and its various components of colostrum and early milk. **Journal of Dairy Science**, v. 33, n. 6, p. 457-465, 1950.

PASTORET, P. P.; AGUILAR-SETIEN, A.; BURTONBOY, G.; MAGER, J.; JETTEUR, P.; SCHOENAERS, F. The effect of repeated treatment with dexamethasone on the re-excretion pattern of infectious bovine rhinotracheitis virus and humoral immune response. **Veterinary Microbiology**, v. 4, n. 2, 149-155, 1979.

PELLERIN, C.; VAN DEN HURK, J.; LECOMTE, J.; TIJSSSEN, P. Identification of a new group of bovine viral diarrhea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. **Virology**, v. 203, n. 2, p. 260-268, 1994.

PENNY, C. D.; HOWIE, F.; NETTLETON, P. F.; SCHOCK, A. Upper respiratory disease and encephalitis in neonatal beef calves caused by bovine herpesvirus type 1. **Veterinary Record**, v. 151, n. 3, p. 89-91, 2002.

PLATT R.; COUTU C.; MEINERT T.; ROTH J.A. Humoral and T cell-mediated immune responses to bivalent killed bovine viral diarrhea virus vaccine in beef cattle. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 122, n. 1, p 8-15, 2008.

PLATT, R.; WIDEL, P. W.; KESL, L. D.; ROTH, J. A. Comparison of humoral and cellular immune responses to a pentavalent modified live virus vaccine in three age groups of calves with maternal antibodies, before and after BVDV type 2 challenge. **Vaccine**, v. 27, n. 33, p. 4508–19, 2009.

POLLOCK, J. M.; WELSH, M. D. The WC1  $\beta$  gd T-cell population in cattle : a possible role in resistance to intracellular infection. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 89, p. 105–114, 2002.

POSPÍSIL, Z.; KREJČÍ, J.; JÍNEK, P.; LÁNY, P.; ZENDULKOVÁ, D.; CÍHAL, P. Development of a disease control programme based on the use of an inactivated vaccine against infectious bovine rhinotracheitis. **Veterinary Microbiology**, v. 53, n.12, p. 199-206, 1996.

POTGIETER, L. N. D. Immunology of bovine viral diarrhoea virus. **Veterinary Clinics North America: Food Animal Practice**, v. 11, n. 3, p. 501-520, 1995.

PRESTES, N. C.; LANDIM-ALVARENGA, F.C. **Obstetrícia veterinária**. São Paulo: Guanabara, 2006. 226 p.

QUIGLEY, J. D.; LAGO, A.; CHAPMAN, C.; ERICKSON, P.; POLO, J. Evaluation of the Brix refractometer to estimate immunoglobulin G concentration in bovine colostrum. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 2, p. 1148–55, 2013.

QUIGLEY, J. Passive immunity in newborn calves absorption of immunoglobulins. **Advances in Dairy Technology**, v.14, p. 273–292, 2002.

RAINARD, P.; RIOLLET, C. Innate immunity of the bovine mammary gland. **Veterinary Research**, v. 37, n. 3, p. 369-400, 2006.

REBER, A J.; DONOVAN, D. C.; GABBARD, J.; GALLAND, K.; ACEVES-AVILA, M.; HOLBERT, K. A.; MARSHALL, L.; HURLEY, D. J. Transfer of maternal colostrum leukocytes promotes development of the neonatal immune system I. Effects on monocyte lineage cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 123, n. 3-4, p. 186–96, 2008.

RIDPATH, J. F.; NEILL, J. D.; FREY, M.; LANDGRAF, J. G. Phylogenetic, antigenic and clinical characterization of type 2 BVDV from North America. **Veterinary Microbiology**, v. 77, n. 1, p. 145-155, 2000.

RIDPATH, J. F.; NEIL, J. D.; ENDSLEY, J.; ROTH, J. A. Effect of passive immunity on the development of a protective immune response against bovine viral diarrhoea virus in calves. **American Journal Veterinary Research**, v. 64, n. 1, p. 65-69, 2003.

RIDPATH, J. F. Bovine viral diarrhoea virus: global status. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 26, p. 105-121, 2010.

ROBINSON, K. E.; MEERS, J.; GRAVEL, J. L.; MCCARTHY, F. M.; MAHONY, T. J. The essential and non-essential genes of Bovine herpesvirus 1. **Journal of General Virology**, v. 89, n. 11, p. 2851-2863, 2008.

ROBISON, J. D.; STOTT, G. H.; DENISE, S. K. Effects of passive immunity on growth and survival in the dairy heifer. **Journal of Dairy Science**, v. 71, n. 5, p. 1283–7, 1988.

RODRIGUES, J. A. **Assistência clínica materna e neonatal às diferentes condições obstétricas em bovinos da raça Holandesa**. São Paulo, 2008. 94f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

ROUSE, B. T.; BABIUK, L.A. The direct antiviral cytotoxicity by bovine lymphocytes is not restricted by genetic incompatibility of lymphocytes and target cells. **Journal of Immunology**, v. 118, p. 618, 1977.

SANTOS SILVA, F.; DE OLIVEIRA, J. M. B.; FILHO, A. F. B. B.; RIBEIRO, C. P.; PITUCO, E. M.; JUNIOR, J. W. P. Análise soropidemiológica da infecção pelo herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) em bovinos no Estado de Pernambuco. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 43, n. 1324, p. 1-11, 2015.

SCHEFERS, J.; MUNOZ-ZANZI, C.; COLLINS, J. E.; GOYAL, S. M.; AMES, T. R. Serological evaluation of precolostral serum samples to detect bovine viral diarrhoea virus infections in large commercial dairy herds. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 20, p. 625-628, 2008.

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

SOUZA, V.F.; MELO, S.V.; ESTEVES, P.A.; SCHMIDT, C.S.R.; GONÇALVES, D.A.; SCHAEFER, R.; SILVA, T.C.; ALMEIDA, R.S.; VICENTINI, F.; FRANCO, A.C.; OLIVEIRA, E.A.; SPILKI, F.R.; WEIBLEN, R.; FLORES, E.F.; LEMOS, R.A.; ALFIERI, A.A.; PITUCO, E.M.; ROEHE, P.M. Caracterização de herpesvírus bovinos tipos 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5) com anticorpos monoclonais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 22, n. 1, p. 13-18, 2002.

SPILKI, F. R.; ESTEVES, P. A.; LIMA, M. D.; FRANCO, A. C.; CHIMINAZZO, C.; FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; DRIEMEIER, D.; ROEHE, P. M. Comparative pathogenicity of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) subtypes 1 (BHV-1.1) and 2a (BHV-1.2 a). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 24, n. 1, p. 43-49, 2004.

SPONCHIADO, D. **Prevalência dos principais vírus respiratórios em bovinos da raça Holandesa, no Estado do Paraná**. Botucatu, 2014. 151f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, 2014.

STELWAGEN, K.; CARPENTER, E.; HAIGH, B.; HODGKINSON, A; WHEELER, T. T. Immune components of bovine colostrum and milk. **Journal of Animal Science**, v. 87, n. 13, p. 3–9, 2009.

STOKKA, G. L. Prevention of respiratory disease in cow/calf operations. **Veterinary clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 26, n. 2, p. 229–41, 2010.

STRAUB, O. C. BHV1 infections: relevance and spread in Europe. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 14, n. 2, p. 175-186, 1991.

TAKIMOTO, T.; PORTNER, A. Molecular mechanism of paramyxovirus budding. **Virus Research**, v. 106, n. 2, p. 133-145, 2004.

TAO, T.; DAVOODI, F.; CHO, C. J.; SKIADOPOULOS, M. H.; DURBIN, A. P.; COLLINS, P. L.; MURPHY, B. R. A live attenuated recombinant chimeric parainfluenza virus (PIV) candidate vaccine containing the hemagglutinin-neuraminidase and fusion glycoproteins of PIV1 and the remaining proteins from PIV3 induces resistance to PIV1 even in animals immune to PIV3. **Vaccine**, v. 18, n.14, p. 1359-1366, 2000.

TAYLOR, G.; BRUCE, C.; BARBET, A. F.; WYLD, S. G.; THOMAS, L. H. DNA vaccination against respiratory syncytial virus in young calves. **Vaccine**, v. 23, n. 10, p. 1242-1250, 2005.

TIZARD, I. R. **Imunologia veterinária: uma introdução**. 8. ed. São Paulo: Roca, 2008.

TOTH, T. E.; FRANK, G. H. Bovine parainfluenza-3 virus proteins recognized by antibodies of aerosol-exposed calves. **American Journal of Veterinary Research**, v. 49, n. 11, p. 1945-1949, 1988.

VALARCHER, J. F; TAYLOR, G. Bovine respiratory syncytial virus infection. **Veterinary Research**, v. 38, n. 2, p. 153-180, 2007.

VAN DER SLUIJS, M. T. W.; KUHN, E. M.; MAKOSCHEY, B. A single vaccination with an inactivated bovine respiratory syncytial virus vaccine primes the cellular immune response in calves with maternal antibody. **BMC Veterinary Research**, v. 6, n. 1, p. 2, 2010.

VAN OIRSCHOT, J. T. Bovine herpesvirus 1 in semen of bulls and the risk of transmission: a brief review. **Veterinary Quarterly**, v. 17, n. 1, p. 29-33, 1995.

VIRTALA, A. M.; MECHOR, G. D.; GRÖHN, Y. T.; ERB, H. N.; DUBOVI, E. J. Epidemiologic and pathologic characteristics of respiratory tract disease in dairy heifers during the first three months of life. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 208, n.12, p. 2035-2042, 1996.

VOGEL, F. S. F.; FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; MAYER, S. V.; QUADROS, V. L. D.; OLDONI, I. Magnitude duration and specificity of the serological response in cattle vaccinated against bovine viral diarrhea virus (BVDV). **Ciência Rural**, v.32, n.1, p. 83-89, 2002.

WALDVOGEL, A. S.; HEDIGER-WEITHALER, B. M.; EICHER, R.; ZAKHER, A. Interferon- $\gamma$  and interleukin-4 mRNA expression by peripheral blood mononuclear cells from pregnant and non-pregnant cattle seropositive for bovine viral diarrhea virus. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 77, n. 3, p. 201-212, 2000.

WEAVER, D. M.; TYLER, J. W.; VANMETRE, D. C.; HOSTETLER, D. E.; BARRINGTON, G. M. Passive transfer of colostral immunoglobulins in calves. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 14, n. 6, p. 569-577, 2000.

WEBER, M. N.; SILVEIRA, S.; STRECK, A. F.; CORBELLINI, L. G.; CANAL, C. W. Bovine viral diarrhea in Brazil: current status and future perspectives. **British Journal of Virology**, v. 1, n. 3, p. 92-97, 2014c.

WEBER, M. N.; MÓSENA, A. C. S.; SIMÕES, S. V. D.; ALMEIDA, L. L.; PESSOA, C. R. M.; BUDASZEWSKI, R. F.; SILVA, T.R.; RIDPATH, J.; RIET-CORREA, F. DRIEMEIER, D.; CANAL, C. W. Clinical presentation resembling mucosal disease associated with 'Hobi'-like pestivirus in a field outbreak. **Transboundary and Emerging Diseases**, p. 1–9, 2014a.

WEBER, M. N.; SILVEIRA, S.; MACHADO, G.; GROFF, F.H.S.; MÓSENA, A.C.S.; BUDASZEWSKI, R. F.; DUPONT, P.M.; CORBELLINI, L.G.; CANAL, C. W. High frequency of bovine viral diarrhea virus type 2 in Southern Brazil. **Virus Research**, v. 191, p. 117-124, 2014b.

WEGMANN, T. G.; LIN, H.; MOSMANN, T. R.; A-STIMULATED, C. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a T H 2 phenomenon?. **Immunology today**, v. 14, n. 7, p. 353-356, 1993.

WELLEMANS, G.; LEUNEN, J.; LUCHSINGER, E. Respiratory ailments of cattle: isolation of a virus (220/69) with serologic resemblance to the human respiratory syncytial virus. **Annales de Médecine Vétérinaire**, v.114, p. 89–93, 1970.

WELSH, M. D.; ADAIR, B. M.; FOSTER, J. C. Effect of BVD virus infection on alveolar macrophage functions. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 46, n. 3, p. 195-210, 1995.

WEST, K.; PETRIE, L.; KONOBY, C.; HAINES, D. M.; CORTESE, V.; ELLIS, J. A. The efficacy of modified-live bovine respiratory syncytial virus vaccines in experimentally infected calves. **Vaccine**, v. 18, n. 9, p. 907-919, 1999.

WILSON, R. A.; ZOLNAI, A.; RUDAS, P.; FRENYO, L. V. T-cell subsets in blood and lymphoid tissues obtained from fetal calves, maturing calves, and adult bovine. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 53, n. 1-2, p. 49-60, 1996.

WINDEYER, M. C.; LESLIE, K. E.; GODDEN, S. M.; HODGINS, D. C.; LISSEMORE, K. D.; LEBLANC, S. J. Association of bovine respiratory disease or vaccination with serologic response in dairy heifer calves up to three months of age. **American Journal of Veterinary Research**, v. 76, n. 3, p. 239-245, 2015.

WINKLER, M. T. C.; DOSTER, A.; JONES, C. Persistence and reactivation of bovine herpesvirus 1 in the tonsils of latently infected calves. **Journal of Virology**, v. 74, n. 11, p. 5337-5346, 2000.

WOOLUMS, A. R.; BERGHAUS, R. D.; BERGHAUS, L. J.; ELLIS, R. W.; PENCE, M. E.; SALIKI, J. T.; KATHERINE, A.E.; GALLAND, K.L.; BURDETT, W. W.; NORDSTROM, S.T.; HURLEY, D. J. Effect of calf age and administration route of initial multivalent modified-live virus vaccine on humoral and cell-mediated immune responses following subsequent administration of a booster vaccination at weaning in beef calves. **American Journal of Veterinary Research**, v. 74, n. 2, p. 343-354, 2013.

WOOLUMS, A. R.; BROWN, C. C.; BROWN JR, J. C.; COLE, D. J.; SCOTT, M. A.; WILLIAMS, S. M.; MIAO, C. Effects of a single intranasal dose of modified-live bovine respiratory syncytial virus vaccine on resistance to subsequent viral challenge in calves. **American Journal of Veterinary Research**, v. 65, n. 3, p. 363-372, 2004.

YEWDELL, J. W.; HAERYFAR, S. M. Understanding presentation of viral antigens to CD8+ T cells in vivo: the key to rational vaccine design. **Annual Review of Immunology**, v. 23, p. 651-682, 2005.

ZHU, Y. M.; SHI, H. F.; GAO, Y. R.; XIN, J. Q.; LIU, N. H.; XIANG, W. H.; REN, X.G.; FENG, J.K., ZHAO, L.P.; XUE, F. Isolation and genetic characterization of bovine parainfluenza virus type 3 from cattle in China. **Veterinary Microbiology**, v. 149, n. 3, p. 446-451, 2011.