

## Influência da vacinação materna na transferência de imunidade passiva contra as viroses respiratórias dos bovinos

[Influence of maternal vaccination for the passive immune transfer against bovine respiratory viruses]

C.C. Baccili<sup>1</sup>, C.P.C.C. Silva<sup>1</sup>, V.A.P. Baldacim<sup>1</sup>, G.F. Greggi<sup>1</sup>, G.S.F.M. Vasconcellos<sup>1</sup>,  
B.S. Cacciacarro<sup>1</sup>, C.P. Ribeiro<sup>2</sup>, V. Gomes<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade de São Paulo - USP - São Paulo, SP

<sup>2</sup>Instituto Biológico - São Paulo, SP

### RESUMO

O objetivo deste estudo longitudinal foi avaliar a influência da vacinação materna na transferência de anticorpos (ACs) contra as viroses respiratórias em bezerros. Para tanto, vacas e bezerros foram distribuídos em dois grupos conforme a realização (VAC, n=6) ou não (NVAC, n=4) da vacinação no pré-parto. Amostras sanguíneas foram obtidas após a parição (D0); em seguida, apenas os bezerros foram acompanhados até D180. ACs séricos foram determinados pela vírus-neutralização (VN) contra BVDV, BoHV-1, BRSV e BPI3-V. Vacas VAC apresentaram diferenças para ACs contra BoHV-1 (P=0,01) em D0. As frequências (%) de bezerros soropositivos para BoHV-1 foram maiores em VAC do D2 ao D120; para BRSV em D4, D8, D10 e D150 (P≤0,08); medianas de ACs contra BoHV-1 em VAC do D2 ao D120 (P=0,08). A vacinação das vacas no pré-parto foi fundamental para a transferência e a duração de ACs contra BoHV-1 e BRSV, porém o protocolo adotado não foi eficiente para o aumento de ACs para BVDV e BPI3-V. A eficácia parcial da vacinação materna não inviabiliza a sua recomendação devido à importância do Herpesvírus e do BRSV na DRB, porém estratégias para a melhoria nas respostas imunes contra as demais viroses devem ser estabelecidas.

Palavras-chave: bovino, colostro, anticorpos maternos

### ABSTRACT

The aim of this longitudinal research was to evaluate the influence of maternal vaccination for the passive immune transfer of antibodies (Abs) against respiratory viruses in calves. Therefore, cows and calves sourced from two groups according to having received (VAC, n=6) or not (NVAC, n=4) of vaccination at pre-partum period. Blood samples of cows and calves harvested after parturition (D0), and then only calves followed until the age of 180 days. Abs performed by virus neutralization (VN) against BVDV, BoHV-1, BRSV and BPI3-V. VAC cows presented differences for Abs against BoHV-1 (P=0.01) in D0. Frequencies (%) of seropositive VAC calves for BoHV-1 were higher in D2 to D120; to BRSV D4, D8, D10 and D150 (P≤0.08); higher medians of Abs against BoHV-1 in VAC at D2 up to D120 (P=0.08). Partial efficacy of vaccination of cows does not impair its recommendation due to the importance of Herpesvirus and BRSV in BRD, but strategies for improvement in immune responses against other viruses should be established.

Keywords: bovine, colostrum, maternal antibodies

### INTRODUÇÃO

Os bezerros nascem agamaglobulinêmicos e *naive*, devido à espessa barreira placentária sinepiteliocorial. Exposições sucessivas aos antígenos no período pós-natal estimularão o desenvolvimento do sistema imune específico, porém esse processo é lento e gradual. Nessa fase, os anticorpos (ACs) maternos adquiridos pela ingestão do colostro protegem os recém-nascidos contra as infecções (Cortese, 2009).

A triagem do colostro em relação à sua qualidade imunológica geralmente é determinada pela concentração de IgG (≥50g/L) ou de sólidos totais (21%), estimada pelo colostrômetro e refratômetro Brix, entretanto esses métodos não distinguem a especificidade dessas imunoglobulinas (Quigley *et al.*, 2013). Apesar disso, a soroconversão dos bezerros após a ingestão de colostro é um indício da transferência de ACs maternos específicos para o Herpesvírus Bovino tipo-1 (BoHV-1) (Mechor *et al.*, 1987), o Vírus da Diarreia Viral Bovina

Recebido em 13 de março de 2017

Aceito em 25 de março de 2017

E-mail: camila.rcosta@usp.br

(BVDV) (Bolin e Ridpath, 1995) e o Vírus Respiratório Sincicial Bovino (BRSV) (Belknap et al., 1991). A transferência e a duração dos ACs maternos dependem da presença e da quantidade de imunoglobulinas consumidas e absorvidas (Fulton et al., 2004).

A queda dos títulos séricos dos ACs maternos neutralizantes representa o principal fator de risco para o complexo das doenças respiratórias dos bovinos (DRB). BRSV e Parainfluenza Bovina tipo-3 (BPI3-V) são as viroses mais frequentes nas infecções respiratórias. Essas viroses podem resultar em broncopneumonias quando associadas aos agentes bacterianos secundários como o *Mycoplasma* spp., *Histophilus somni*, *Mannheimia haemolytica* e *Pasteurella multocida*. O BoHV-1 pode causar infecção aguda do trato respiratório superior e conjuntivite. Outra importante característica dessas viroses, incluindo o BVDV, é a indução da imunossupressão (Fulton, 2009).

A vacinação das bezerras é um desafio devido ao efeito supressivo dos ACs maternos sobre a imunidade específica induzida pela vacinação ou pela exposição natural aos agentes respiratórios (Ellis et al., 2001). Assim, vacinar as vacas entre 60 e 30 dias pré-parto tem sido o protocolo tradicionalmente utilizado pelas fazendas para melhorar a transferência de imunidade passiva e retardar o surgimento das broncopneumonias.

Nesse cenário, existem alguns estudos brasileiros que demonstram a transferência e a dinâmica de ACs maternos apenas para o BoHV-1 (Hübner et al., 1996; Moreira et al., 2001; Gatti et al., 2010). Recentemente, Gomes et al. (2014) demonstraram que a vacinação de vacas soronegativas no pré-parto não garantiu a transferência de ACs específicos para o BVDV. Além da ausência de dados para o BRSV e o BPI3-V, destaca-se que a dinâmica de ACs não foi estabelecida pelos estudos anteriores devido ao seu curto período de duração.

A hipótese desta pesquisa é a de que a vacinação materna no período pré-parto representa uma estratégia para aumentar a quantidade e duração dos títulos séricos de ACs específicos para as viroses respiratórias. O objetivo deste estudo longitudinal foi avaliar a influência da vacinação materna na transferência e dinâmica de ACs específicos para as viroses respiratórias do nascimento aos seis meses de idade.

## MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade de São Paulo (Protocolo nº. 2574/2012).

O trabalho foi conduzido entre junho de 2012 e abril de 2013, na Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – gado de leite. A fazenda foi selecionada por não realizar vacinação para DRB e possuir baixa soroprevalência para o BVDV (13%). Inicialmente, foram selecionadas apenas vacas híbridas Holandesas de segunda a quarta lactação (Feitosa, 2014). Além disso, a exclusão de vacas persistentemente infectadas para o BVDV foi realizada por meio da VN e reação em cadeia pela polimerase combinada à transcrição reversa (RT-PCR), respectivamente, de acordo com os procedimentos descritos pela OIE (World..., 2016) e Silva (2014). As vacas selecionadas foram distribuídas em dois grupos, compostos por animais não vacinados (NVAC) ou vacinados (VAC), aos 60 e 30 dias do parto previsto. As vacas foram imunizadas pela injeção subcutânea de 5mL de vacina polivalente contendo BVDV 1 (5960) e BVDV 2 (53637) inativados; BoHV-1 (Cooper) e BBPI3-V (RLB 103) vivos e termossensíveis; BRSV (375) vivo atenuado, diluídos em adjuvante contendo a saponina Quil A, colesterol e *amphigen*.

No período experimental, as vacas de ambos os grupos foram mantidas em piquete pré-parto, onde foi realizado o monitoramento dos partos pela equipe de pesquisa. Imediatamente após a parição, as vacas foram encaminhadas para ordenha e coleta de amostras de sangue, por punção da artéria coccígea, em tubos sem anticoagulante, para a realização da VN.

Após o nascimento, os bezerros foram encaminhados para o bezerreiro para os cuidados iniciais, que incluíam avaliação do escore APGAR, desinfecção umbilical e coleta de sangue. Amostras de sangue foram obtidas antes da ingestão de colostro, em tubos sem anticoagulante e com o anticoagulante *Ethylene Diamine Tetraacetic Acid* – EDTA (1.5mg/mL). Essas amostras foram utilizadas para a exclusão de infecção fetal, por meio das provas de VN e RT-PCR, respectivamente, de acordo com os procedimentos descritos pela OIE (World..., 2016) e Silva (2014).

A média de peso dos bezerros era de 30 a 40kg, dessa forma, foi administrado o volume mínimo de quatro litros de colostro fresco das respectivas mães aos recém-nascidos. A primeira mamada (2L) foi realizada até três horas pós-nascimento, sendo o colostro excedente mantido sobre refrigeração (4°C). Às seis horas de vida, o colostro foi levemente aquecido a 37°C, em banho-maria, para o fornecimento da segunda mamada. O fornecimento de colostro foi realizado por sondagem esofágica. A partir do segundo dia de vida, os animais receberam sucedâneo (Sprayfo Violeta<sup>®</sup>, Stolen, Deventer, Holanda), ração comercial (Ração para bezerros<sup>®</sup>, Agromix, São Paulo, SP, Brasil), feno e sal mineral (Fosbovi 20<sup>®</sup>, Tortuga, Mairinque, SP, Brasil), além de água *ad libitum*. Após desmame, os bezerros receberam ração comercial em quantidade máxima equivalente a 3kg por dia.

Os bezerros foram mantidos na fazenda onde nasceram até a segunda semana de idade, em dois bezerreiros coletivos, isolados do restante do rebanho, e foram separados de acordo com o grupo experimental. Em seguida, foram transferidos para o biotério da FMVZ-USP. Os animais do mesmo grupo foram distribuídos em pares por baía, onde foram mantidos até os seis meses de idade.

Amostras de sangue dos bezerros foram obtidas em tubos sem anticoagulante nos seguintes momentos: antes da ingestão de colostro (D0), D2, D4, D6, D8, D10, D15, D30, D60, D90, D120, D150 e D180. Os soros das amostras sanguíneas das vacas e bezerros foram obtidos pela centrifugação a 700 x g por 20 minutos. O soro foi distribuído em alíquotas congeladas a -20°C até a realização da VN.

A vírus-neutralização (VN) para BVDV, BoHV-1, BRSV e BPIV-3 foi realizada estritamente de acordo com o manual previamente estabelecido pela OIE (World..., 2016). Para tanto, foram usadas placas de poliestireno de 96 cavidades, utilizando-se uma diluição constante do soro em log<sub>2</sub> a partir das diluições 1:10 (BVDV-NADL), 1:2 (BoHV-1), 1:2 (BRSV) e 1:2 (BPIV-3), tendo como diluente o meio de cultivo celular MEM (*Minimum Essential Medium*) contendo 1% de antibióticos e 5% de soro fetal bovino livre de anticorpos para BVDV. Para as viroses com diluição inicial 1:2, foram adicionados 50µL

de soro em duplicatas nas cavidades das placas, no qual adicionaram-se 50µL da solução do respectivo vírus contendo TCID<sub>50</sub>/100µL (50% *tissue culture infective doses*). Para o BVDV, o soro foi previamente diluído (1:5) antes de adicioná-lo aos poços. Em seguida, as placas foram incubadas por uma hora para BVDV, BRSV, BPIV-3 e por 18-24h para BoHV-1, em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período, suspensão de células MDBK (*Madin-Darby Bovine Kidney*) foi adicionada em cada cavidade das placas. Novamente a placa foi incubada em estufa a 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub>, durante quatro-cinco dias. A infectividade foi indicada pelo “efeito citopático” (ECP) visível na monocamada celular em placas, em microscópio invertido. O título de ACs foi expresso como a maior diluição do soro que inibiu completamente a infectividade e, consequentemente, o ECP em ambas as cavidades de cada diluição.

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa SPSS 20.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA). Inicialmente, a análise qualitativa dos títulos de ACs foi realizada devido ao grande número de animais soronegativos para o BVDV. Os bezerros com títulos acima de 10 para o BVDV e acima de 2 para as demais viroses foram considerados soropositivos. A comparação entre as frequências de animais soropositivos e soronegativos nos grupos vacinados e não vacinados foi realizada pelo teste do Qui-Quadrado.

A análise estatística da quantidade dos títulos de anticorpos foi realizada por testes não paramétricos devido à distribuição anormal dos dados, mesmo que transformados em log<sub>2</sub>. Assim, foram calculadas as medianas dos dados, e as suas diferenças foram determinadas pelo teste de Mann-Whitney. Para apresentação dos dados em valor real, foi obtido o antilog das medianas usando-se a relação 2<sup>a</sup>, em que “a” é a mediana dos títulos de ACs em log de base 2. Diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando o P<0,05.

A presença de infecção ao longo do estudo foi determinada pelo aumento nos títulos de ACs de pelo menos 4x em relação ao momento anterior (Martin e Bohac, 1986).

## RESULTADOS

Os valores individuais dos títulos de ACs nas vacas no dia da parição estão apresentados na Fig. 1. As vacas NVAC (n=4) eram soronegativas ao BVDV e ao BoHV-1 imediatamente após o parto, porém possuíam títulos basais para o BRSV (mediana= 1:4) e o BPI3-V (mediana= 1:16). As vacas VAC (n=6) eram soropositivas para o BoHV-1 (mediana= 1:128), o BRSV (1:4) e o BPI3-V (mediana= 1:128), porém apenas dois animais VAC eram soropositivos para o BVDV com títulos iguais (1:128). Diferenças entre os grupos foram obtidas apenas para os títulos de ACs contra o BoHV-1 ( $P=0,012$ ).

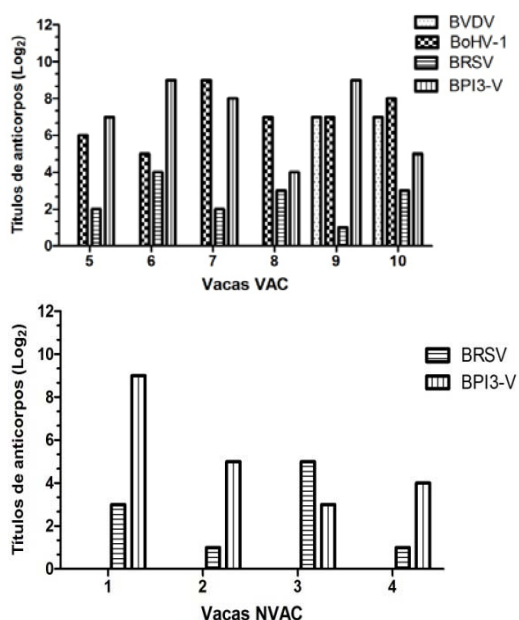


Figura 1. Títulos de anticorpos individuais (log<sub>2</sub>) das vacas não vacinadas (NVAC) e vacinadas (VAC) para as viroses respiratórias imediatamente após o parto.

As frequências de bezerros soropositivos estão demonstradas na Tab. 1. Todos os bezerros de ambos os grupos eram soronegativos ao nascimento (D0) e apresentaram perfil diferenciado após a ingestão do colostro. No D2, os bezerros VAC (6/6, 100%) tornaram-se soropositivos para todas as viroses respiratórias, exceto BVDV. Apenas dois bezerros VAC, filhos das vacas soropositivas, apresentavam

títulos de ACs para o BVDV. Os bezerros filhos das vacas NVAC eram soropositivos apenas para o BRSV e a BPI3-3 (4/4, 100%). Diferentes frequências de animais soropositivos entre grupos foram obtidas para o BoHV-1 entre D2 e D120 ( $P=0,05$ ); e para o BRSV no D4, D8, D10 e D150 ( $P\leq 0,04$ ).

Os valores medianos e individuais dos títulos de ACs séricos nos bezerros NVAC e VAC estão apresentados nas Fig. 2 e 3, respectivamente.

Nos bezerros NVAC, a mediana dos títulos de ACs para o BRSV apresentou queda até a obtenção do valor mínimo ( $< 2$ ) no D60; posteriormente, os títulos aumentaram, observando-se pico no D90 e ligeira queda nos momentos subsequentes. A análise individual dos bezerros permitiu detectar infecção por exposição natural no bezerro 1 entre D15 e D30.

Nos bezerros VAC, a mediana dos títulos de ACs para o BRSV apresentou queda gradual do D2 ao D180. Apesar desse padrão, a análise individual da sorologia dos bezerros permitiu detectar infecção por exposição natural no bezerro 10 entre D8 e D10. Não foi possível detectar diferenças nos títulos de ACs para o BRSV entre os grupos experimentais ( $P\geq 0,05$ ).

Em relação ao BVDV, a mediana dos títulos de ACs dos dois bezerros VAC soropositivos apresentou queda gradual do D2 ao D180. A análise individual da sorologia permitiu identificar possível infecção natural no bezerro 10 entre D90 e D120. Bezerros NVAC não apresentaram títulos de ACs para o BVDV do nascimento aos seis meses de idade.

As medianas e os valores individuais dos títulos de ACs para o BoHV-1 nos bezerros VAC foram constantes nos primeiros 30 dias de vida, observando-se queda gradual dos valores nos momentos subsequentes. Bezerros NVAC não apresentaram títulos de ACs para o BoHV-1 do nascimento aos seis meses de idade. Diferenças entre os grupos foram obtidas do D2 até o D120 ( $P\leq 0,08$ ).

*Influência da vacinação...*

Tabela 1. Frequências de bezerros soropositivos e soronegativos para os vírus envolvidos na doença respiratória bovina em bezerros de mães vacinadas (VAC) e não vacinados (NVAC) do nascimento aos 180 dias de vida

Idade	Grupos Resultados	BVDV				BoHV-1				BRSV				BPI3-V			
		NVAC		VAC		NVAC		VAC		NVAC		VAC		NVAC		VAC	
		(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
0	N	0	4	0	6	0	4	0	6	0	4	0	6	0	4	0	6
	%	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100
2	N	0	4	2	4	0	4	6	0	4	0	6	0	4	0	6	0
	%	0	100	33	67	0	100	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0
4	N	0	4	2	4	0	4	6	0	3	1	6	0	4	0	6	0
	%	0	100	33	67	0	100	100	0	75	25	100	0	100	0	100	0
6	N	0	4	2	4	0	4	6	0	3	1	5	1	4	0	6	0
	%	0	100	33	67	0	100	100	0	75	25	83,3	16,7	100	0	100	0
8	N	0	4	2	4	0	4	6	0	3	1	6	0	4	0	6	0
	%	0	100	33	67	0	100	100	0	75	25	100	0	100	0	100	0
10	N	0	4	2	4	0	4	6	0	3	1	6	0	4	0	6	0
	%	0	100	33	67	0	100	100	0	75	25	100	0	100	0	100	0
15	N	0	4	2	4	0	4	6	0	4	0	6	0	4	0	6	0
	%	0	100	33	67	0	100	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0
30	N	0	4	2	4	0	4	6	0	4	0	5	1	4	0	6	0
	%	0	100	33	67	0	100	100	0	100	0	83,3	16,7	100	0	100	0
60	N	0	4	2	4	0	4	6	0	2	2	5	1	4	0	6	0
	%	0	100	33	67	0	100	100	0	50	50	83,3	16,7	100	0	100	0
90	N	0	4	2	4	0	4	6	0	4	0	3	3	4	0	5	1
	%	0	100	33	67	0	100	100	0	100	0	50	50	100	0	83,3	16,7
120	N	0	4	1	5	0	4	4	2	3	1	5	1	4	0	6	0
	%	0	100	16,7	83,3	0	100	67	33	75	25	83,3	16,7	100	0	100	0
150	N	0	4	1	5	0	4	2	4	3	1	3	3	3	1	5	1
	%	0	100	16,7	83,3	0	100	33	67	75	25	50	50	75	25	83,3	16,7
180	N	0	4	1	5	0	4	2	4	3	1	2	4	2	2	3	3
	%	0	100	16,7	83,3	0	100	33	67	75	25	33	67	50	50	50	50

(+) soropositivos e (-) soronegativos; N: número de bezerros; (%) frequências; NVAC, bezerros controle; VAC, bezerros experimentais.

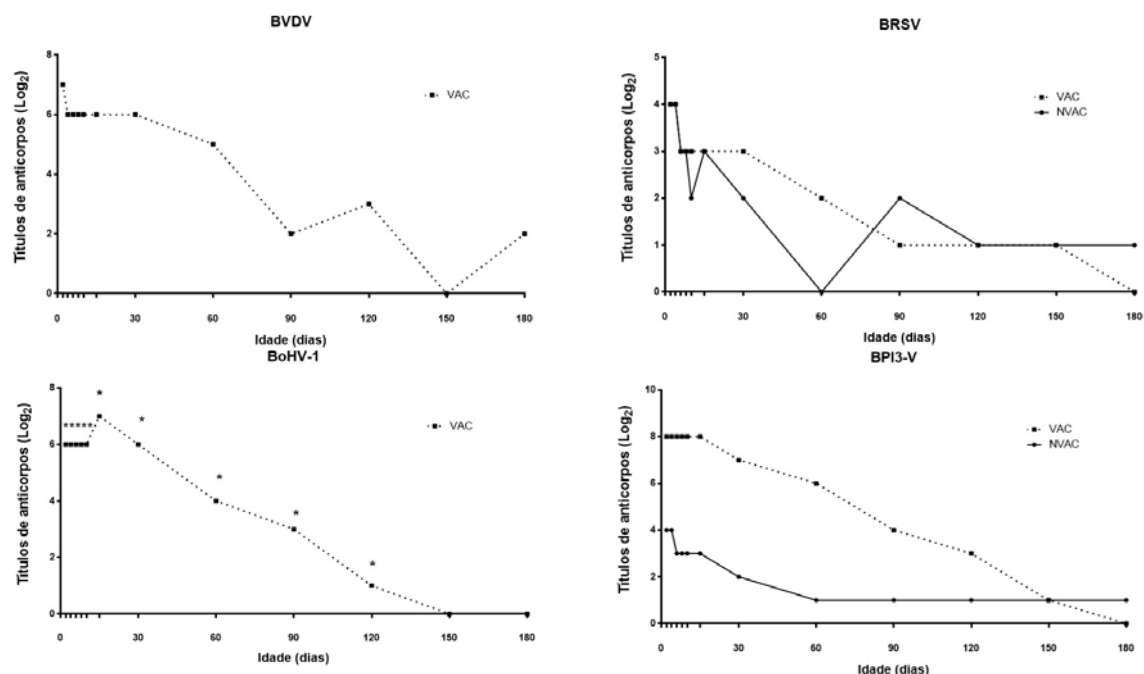


Figura 2. Medianas dos títulos de anticorpos (log<sub>2</sub>) de bezerros que ingeriram colostro de vacas não vacinadas (NVAC) e vacinadas (VAC) no período pré-parto. \* \* Bezerros NVAC foram soronegativos durante todo o período experimental para BVDV e BoHV-1.

Para o BPI3-V, observou-se queda gradual dos títulos de ACs nos filhos de vacas vacinadas do D2 ao D180. Bezerros NVAC apresentaram queda gradual do D2 ao D60, observando-se títulos estáveis e baixos até D180. Apesar de os valores serem maiores para o BPI3-V nos bezerros VAC, não foi possível identificar diferenças estatísticas entre os grupos experimentais ( $P \geq 0,05$ ). A análise individual dos bezerros dos dois grupos permitiu detectar infecção natural no bezerro VAC 10 entre o D10 e o D15. É válido ressaltar que esse bezerro apresentou o título mais baixo para o BPI3-V (1:16) em relação aos demais bezerros do mesmo grupo.

Os títulos individuais e as medianas para o BPI3-V de ambos os grupos apresentaram ligeiras variações ao longo do tempo. Os valores máximos de ACs foram obtidos após a ingestão do colostro no D2, observando-se valores mínimos no D90. As medianas dos bezerros VAC foram maiores que NVAC ao longo do estudo, entretanto não foi possível observar diferenças estatísticas entre os grupos experimentais ( $P \geq 0,05$ ).

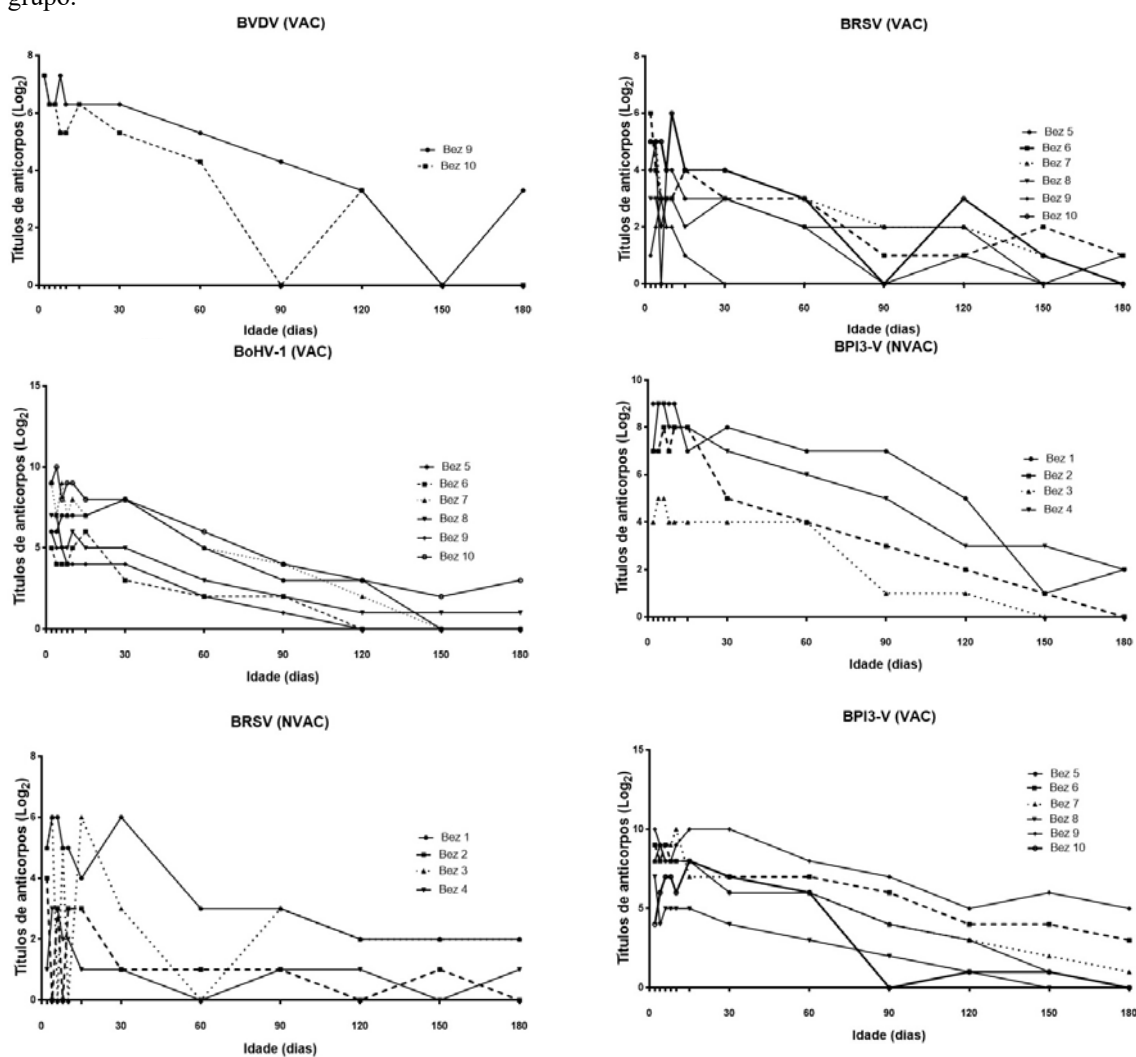


Figura 3. Títulos de anticorpos individuais (log<sub>2</sub>) de bezerros que ingeriram colostro de vacas não vacinadas (NVAC) e vacinadas (VAC) no período pré-parto.

## DISCUSSÃO

Esta pesquisa avaliou a transferência passiva de ACs maternos específicos para as viroses respiratórias das vacas e seus conceitos, assim como a dinâmica de ACs do nascimento aos seis meses de idade.

A interpretação da dinâmica sérica de ACs nos primeiros seis meses de vida é fundamental para a identificação dos pontos de susceptibilidade às infecções causadas pelas viroses respiratórias. Os ACs neutralizantes ligam-se aos vírus e impedem o alcance dos órgãos-alvo (Mechor *et al.*, 1987). Além disso, a IgG do colostro participa da citotoxicidade celular mediada por ACs, que culmina com a destruição das células infectadas pelos agentes virais (Biburger *et al.*, 2014).

Na parição, a sorologia das vacas revelou similaridade entre os grupos para todas as viroses respiratórias, exceto para o BoHV-1. A obtenção das amostras de soro no dia da parição pode não ter sido o ideal, considerando-se que a colostrogênese é caracterizada pela transferência de ACs da circulação sanguínea para a glândula mamária a partir da quarta semana pré-parto (Baumrucker e Bruckmaier, 2014). Assim, já era esperado que os títulos séricos apresentados nesse momento fossem baixos. Inicialmente, pretendia-se mensurar os ACs maternos valendo-se das amostras de colostro, entretanto estudos prévios da equipe verificaram citotoxicidade do sobrenadante do colostro sobre as células MDBK usadas na VN e reações falso-positivas, por meio da realização do teste imunoenzimático indireto (Gomes *et al.*, 2014). Assim, a VN do soro das vacas foi a alternativa encontrada para averiguar se as vacas eram soropositivas com potencial de transferir ACs aos recém-nascidos.

Os títulos basais apresentados para o BRSV e o BPI3-V nas vacas NVAC apontam para a exposição natural e a circulação do vírus no rebanho (Fulton *et al.*, 2004); em contrapartida, esses animais eram soronegativos ao BVDV e ao BoHV-1. Não foi possível observar diferenças entre os títulos de ACs entre grupos para todas as viroses, exceto para o BoHV-1.

A taxa de soropositivos encontrada para os bezerros foi semelhante às suas respectivas mães, visto que apenas duas vacas soroconverteram ativamente após a vacinação para BVDV. A

baixa frequência de bezerros VAC (2/6) soropositivos para o BVDV após a ingestão de colostro já havia sido relatada por Gomes *et al.* (2014), apesar das diferentes composições e origens das vacinas entre os estudos. No estudo de Gomes *et al.* (2014), as vacas foram vacinadas com produto comercial de origem argentina com hidróxido de alumínio como adjuvante.

A baixa transferência de ACs maternos aos recém-nascidos pode ser atribuída à menor resposta vacinal das vacas aos antígenos inativados presentes na vacina comercial. No Brasil, é permitida apenas a comercialização de vacinas inativadas para BVDV, entretanto a maioria desses produtos não induz resposta imune humoral consistente (Anziliero *et al.*, 2015). A maior diferença entre a resposta imune aos antígenos vivos modificados e inativados está atrelada à inabilidade de o antígeno morto replicar-se nas células do hospedeiro e induzir resposta imune citotóxica (Th1) mediada pelos linfócitos T CD8<sup>+</sup> (Platt *et al.*, 2008; Seder e Hill, 2000). Teoricamente, os vírus presentes nas vacinas inativadas atuam como microrganismos extracelulares que induzem resposta imune predominantemente humoral (Th2), mediada pelos linfócitos B, no entanto apenas duas vacas VAC apresentavam ACs específicos para o BVDV. Assim, recomenda-se a busca por estratégias para amplificar as respostas imunes induzidas pelas vacinas comerciais contra o vírus da BVD, pois, apesar da diversidade de imunógenos disponíveis, ainda não existe uma vacina totalmente efetiva para o controle dessas enfermidades (Silva *et al.*, 2007).

Bolin e Ridpath (1995) observaram que o colostro protege os bezerros contra a infecção aguda causada pelo BVDV não citopático (estirpe 890). Em contrapartida, os bezerros que apresentavam títulos de ACs séricos abaixo de 1:16 manifestaram infecção aguda caracterizada por febre, leucopenia, trombocitopenia e diarreia. Todos os bezerros NVAC (4/4) e 66% (4/6) dos bezerros VAC estavam susceptíveis às infecções causadas pelo BVDV porque não apresentaram títulos de ACs nos primeiros seis meses de vida. Entre os dois animais VAC soropositivos após a ingestão do colostro, observou-se que o bezerro 10 apresentou exposição ao BVDV (Martin e Bohac, 1986). Nesse caso, a infecção natural ocorreu tardiamente, o que indica, de modo

indireto, que a concentração de ACs no colostro das mães dos bezerros soropositivos era alta (Fulton *et al.*, 2004).

A interpretação da sorologia dos bezerros para o BoHV-1 permite afirmar que a vacinação materna no pré-parto foi fundamental para a transferência de ACs específicos aos recém-nascidos. Gatti *et al.* (2010) não encontraram diferenças entre os títulos de ACs em filhos de vacas não vacinadas e vacinadas contra o BoHV-1 em rebanho com baixa prevalência de BoHV-1. Nesse trabalho, os autores vacinaram as vacas com vacina monovalente contendo o BoHV-1 inativado. Vacinas contendo o vírus vivo atenuado termossensível possuem maior imunogenicidade que aquelas com o vírus inativado (Anziliero *et al.*, 2015). A cepa de BoHV-1 vivo modificado termossensível replica-se apenas em temperaturas inferiores (30-33°C) ao corpo (37°C), o que evita o desenvolvimento de infecções sistêmicas (Patterson *et al.*, 2012). Diferentes composições nas vacinas adotadas para a imunização materna poderiam justificar os diferentes perfis séricos observados para os bezerros entre os estudos citados.

Mechor *et al.* (1987) demonstraram que a administração de colostro com altos títulos de ACs maternos protege os recém-nascidos contra a infecção aguda provocada pelo BoHV-1, entretanto os bezerros filhos de vacas não vacinadas apresentaram ruminite, faringite, glossite, esofagite, laringite, traqueíte e bronqueolite necrosante. Os bezerros filhos das vacas não vacinadas apresentavam títulos de ACs entre 2 e 4; assim, todos os animais NVAC estavam susceptíveis às infecções agudas por BoHV-1 nos primeiros seis meses de vida. No presente estudo, os títulos de ACs contra BoHV-1 inferiores a 1:4 foram observados a partir dos 60 dias de vida.

Em geral, os títulos de ACs para o BRSV nas vacas e nos bezerros foram muito baixos, assim os bezerros já apresentavam títulos de ACs maternos abaixo dos protetores ( $\leq 45$ ) desde 48h de vida (Windeyer *et al.*, 2015). O papel da imunidade passiva na proteção ao BRSV foi avaliado por Belknap *et al.* (1991), que observaram menor tensão arterial de O<sub>2</sub> e maior perda de área pulmonar após a inoculação experimental nos animais privados de colostro. A baixa soroconversão para BRSV pode

justificar a detecção de infecção precoce no bezerro 1 (NVAC) entre 15 e 30 dias de vida e no bezerro 10 (VAC) entre oito e 10 dias de vida (Martin e Bohac, 1986). Este achado, associado à baixa transferência de ACs das mães aos recém-nascidos, sinaliza para a adoção de protocolos precoces de vacinação para o BRSV, porém as vacinas para o BRSV tendem a ser de curta duração (<4 meses) (Ellis *et al.*, 2013). As vacinas intranasais compostas por cepas vivas podem ser uma boa estratégia para estimular resposta imune de mucosas sem interferência dos anticorpos maternos (Endsley *et al.*, 2003).

A frequência de bezerros soropositivos foi maior no grupo de vacas vacinadas em alguns momentos deste estudo, apesar da ausência de diferenças estatísticas para os títulos de ACs. Esses dados são indícios de que a vacinação materna aumentou a persistência dos ACs contra o BRSV nos filhos das vacas vacinadas, considerando-se que a duração dos ACs maternos é dependente da quantidade ingerida e absorvida (Fulton *et al.*, 2004).

Os títulos de ACs para o BPI3-V foram maiores nos bezerros VAC, porém não foi possível comprovar diferenças estatísticas em relação à frequência de soropositivos ou aos títulos entre os grupos. O bezerro VAC 10 manifestou infecção natural ao BPI3-V entre o D10 e o D15 (Martin e Bohac, 1986). Dudek *et al.* (2014) encontraram maiores concentrações de ACs séricos contra o BRSV e o BPI3-V em filhos de vacas vacinadas no período pré-parto, porém estes autores detectaram os ACs séricos pelo teste imunoenzimático indireto, que geralmente é mais sensível que a VN (Brodersen, 2010; Ellis, 2010). Em geral, os bezerros apresentaram perfil sorológico semelhante às suas mães. O ideal seria a realização deste estudo com vacas soronegativas para as quatro viroses respiratórias, porém a aplicação desse modelo é inviável, considerando-se as elevadas taxas de soroprevalência para as quatro viroses respiratórias. Os títulos basais contra o BRSV e o BPI3-V apresentados pelas vacas antes da vacinação podem ter dificultado a obtenção de diferenças entre os grupos, especialmente porque o número de animais usados nesta pesquisa foi pequeno, devido à dificuldade em criar os bezerros por seis meses de idade com o objetivo de cobrir todo o período de duração dos ACs maternos. A realização deste estudo a campo é



inviável pela alta taxa de circulação do vírus nos rebanhos, pois, mesmo transferindo os bezerros da fazenda para um biotério na universidade, observou-se infecção natural em dois bezerros (NVAC 1 e VAC 10) ao longo do estudo.

A inoculação experimental dos bezerros após a ingestão do colostro não foi considerada porque o objetivo da pesquisa era conhecer a dinâmica de ACs nos primeiros seis meses de vida para nortear os períodos de susceptibilidade com foco no estabelecimento de protocolos de vacinação futura dos bezerros. Além disso, com base nos estudos internacionais realizados, pôde-se prever que os bezerros soronegativos para as viroses apresentariam manifestações clínicas compatíveis com as infecções agudas provocadas por cada um dos agentes estudados.

Os dados desta pesquisa permitem afirmar que a exposição das vacas aos agentes respiratórios por vacinação ou por infecção natural é fundamental para a transferência de imunidade passiva aos recém-nascidos.

### CONCLUSÃO

A vacinação das vacas soronegativas no período pré-parto foi fundamental para a transferência e a duração de ACs contra o BoHV-1 e o BRSV, porém o protocolo adotado não foi eficiente para o aumento de ACs séricos contra o BVDV e o BPI3-V. A eficácia parcial da vacinação das vacas não inviabiliza a sua recomendação devido à importância do herpesvírus e do BRSV na DRB, porém estratégias para a melhoria nas respostas imunes contra as demais viroses devem ser estabelecidas.

### AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo [2010/ 015865-9].

### REFERÊNCIAS

ANZILIERO, D.; MARTINS, M.; WEISS, M. *et al.* Serological response to bovine herpesvírus 1 and 5 and bovine viral diarrhea virus induced by comercial vaccines. *Ciênc. Rural*, v.45, p.58-63, 2015.

BAUMRUCKER, C.R.; BRUCKMAIER, R.M. Colostrogenesis: IgG1 transcytosis mechanisms. *J. Mamm. Gland Biol. Neopl.*, v.19, p.103-117, 2014.

BELKNAP, E.B.; BAKER, J.C.; PATTERSON, J.S. *et al.* The role of passive immunity in bovine respiratory syncytial virus-infected calves. *J. Infect. Dis.*, v.163, p.470-476, 1991.

BIBURGER, M.; LUX, A.; NIMMERJAHN, F. How immunoglobulin g antibodies kill target cells: revisiting na old paradigma. *Adv. Immunol.*, v.124, p.67-94, 2014.

BOLIN, S.R.; RIDIPATH, J.F. Assessment of protection from systemic infection or disease afforded by low to intermediate titers of passively acquired neutralizing antibody against bovine viral diarrhea virus in calves. *Am. J. Vet. Res.*, v.56, p.755-759, 1995.

BRODERSEN, B.W. Bovine respiratory syncytial virus. *Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract.*, v.26, p.323-333, 2010.

CORTESE, V.S. Neonatal immunology. *Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract.*, v.25, p.221-227, 2009.

DUDEK, K.; BEDNAREK, D.; AYLING, R.D.; SZACAWA, E. Stimulation and analysis of the immune response in calves from vaccinated pregnant cows. *Res. Vet. Sci.*, v.97, p.32-37, 2014.

ELLIS, J.A. Bovine parainfluenza-3 virus. *Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract.*, v.26, p.575-593, 2010.

ELLIS, J.A.; GOW, S.P.; MAHAN, S.; LEYH, R. Duration of immunity to experimental infection with bovine respiratory syncytial virus following intranasal vaccination of young passively immune calves. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.243, p.1602-1608, 2013.

ELLIS, J.A.; 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. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.219, p.351-356, 2001.

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

FEITOSA, F.L.F. *Semiologia de recém-nascidos ruminantes e equídeos*. Semiologia veterinária: a arte do diagnóstico. 3.ed. Roca, São Paulo, 2014.

FULTON, R.W. Bovine respiratory disease research. *Anim. Health Res. Rev.*, v.10, p.131-139, 2009.

FULTON, R.W.; BRIGGS, R.E.; PAYTON, M.E.; CONFER, A.W. *et al.* Maternally derived humoral immunity to bovine viral diarrhea virus (BVDV) 1a, BVDV1b, BVDV2, bovine herpesvírus-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, p.643-646, 2004.

- GATTI, S.P.; AFFONSO, I.B.; DIAS, F.C. *et al.* Títulos de ACs anti-herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) de bezerras em três rebanhos leiteiros do estado de São Paulo, Brasil. *Ars Vet.*, v.26, p.147-152, 2010
- GOMES, V.; BACCILI, C.C.; SILVA, C.P.C. *et al.* Humoral immunity 1 assessment in calves born to cows immunized with inactivated vaccine for bovine herpesvirus 1 and bovine viral diarrhea virus. *Acta Sci. Vet.*, v.42, p.1239, 2014.
- HÜBNER, S.D.O.; WEIBLEN, R.; SILVA, A.M.D. *et al.* Evolução da imunidade passiva contra o herpesvírus bovino tipo 1. *Cienc. Rural*, v.26, p.435-439, 1996.
- MARTIN, S.W.; BOHAC, J.G. The association between serological titers in infectious bovine rhinotracheitis virus, bovine virus diarrhea virus, parainfluenza-3 virus, respiratory syncytial virus and treatment for respiratory disease in Ontario feedlot calves. *Can. J. Vet. Res.*, v.50, p.351, 1986.
- MECHOR, G.D.; ROUSSEAU, C.G.; RADOSTITS, O.M. *et al.* Protection of newborn calves against fatal multisystemic infectious bovine rhinotracheitis by feeding colostrum from vaccinated cows. *Can. J. Vet. Res.*, v.51, p.452-459, 1987.
- MOREIRA, S.P.G.; SAMARA, S.I.; ARITA, G.M.M. *et al.* Monitoração de anticorpos neutralizantes para o vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina em bezerros. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v.38, p.127-130, 2001.
- PATTERSON, R.; NERREN, J.; KOGUT, M. *et al.* Yeast-surface expressed BVDV E2 protein induces a Th1/Th2 response in naïve T cells. *Dev. Comp. Immunol.*, v.37, p.107-114, 2012.
- 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. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.122, p.8-15, 2008.
- QUIGLEY, J.D.; LAGO, A.; CHAPMAN, C. *et al.* Evaluation of the Brix refractometer to estimate immunoglobulin G concentration in bovine colostrum. *J. Dairy Sci.*, v.96, p.1148-1155, 2013.
- SEDER, R.A.; HILL, A.V.S. Vaccines against intracellular infections requiring cellular immunity. *Nature*, v.406, p.793-798, 2000.
- SILVA, L.C. *Prevalência e fatores de risco associados ao vírus da diarréia viral bovina no estado de São Paulo, Brasil.* 2014. 67f. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico, São Paulo, SP.
- SILVA, L.F.; DIEHL, D.G.; CILENTO, M.C. *et al.* Cobaías como modelo para teste de vacinas inativadas contra o herpesvírus bovino tipo 1 e o vírus da diarréia viral bovina. *Cienc. Rural*, v.37, p.1060-1065, 2007.
- WINDEYER, M.C.; LESLIE, K.E.; GODDEN, S.M. *et al.* Association of bovine respiratory disease or vaccination with serologic response in dairy heifer calves up to three months of age. *Am. J. Vet. Res.*, v.76, p.239-245, 2015.
- WORLD Organisation for Animal Health, manual of diagnostics tests and vaccines for terrestrial animals, 2016. Available in: <<http://www.oie.int/en/internationalstandard-setting/terrestrial-manual/access-online/>>. Accessed in: 3 Mar. 2016.