



## Efeito dos anticorpos maternos sobre a resposta imune induzida pela vacinação em bezerros Holandeses

[Effect of maternal antibodies on vaccine-induced immune responses in Holstein calves]

B.T. Silva<sup>1</sup>, C.C. Baccili<sup>1</sup>, E.M. Pituco<sup>2</sup>, V. Gomes<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Aluno de pós-graduação - Universidade de São Paulo - São Paulo, SP  
<sup>2</sup>Laboratório de Vírus de Bovídeos - Instituto Biológico - São Paulo, SP  
<sup>3</sup>Universidade de São Paulo - São Paulo, SP

### RESUMO

Objetivou-se avaliar o efeito dos anticorpos (ACs) maternos sobre resposta imune humoral induzida pela vacinação em bezerros Holandeses. Bezerros foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos: G1 – vacinados no D14 e D44 (n=6); G2 – vacinados no D90 e D120 (n=5); G3 – vacinados no D180 e D210 (n=8); controle: não vacinado (n=5). Utilizaram-se 5mL de vacina comercial (Cattle Master Gold FP5+L5<sup>®</sup> – Zoetis, Brasil), por via subcutânea. Foi realizada vírus neutralização (VN) no momento da vacinação, booster e 30 dias após a revacinação. Não foram observadas diferenças entre controle e G1 ou G2 para a frequência de soropositivos ou títulos de ACs contra os vírus respiratórios ( $P \geq 0,05$ ). G3 apresentou maior produção de ACs em relação ao controle para BoHV-1 ( $P < 0,01$ ), BRSV ( $P < 0,01$ ) e BPIV-3 ( $P = 0,02$ ) após o *booster* (D240). A análise no tempo também demonstrou aumento nos títulos de ACs no G3 ( $P \leq 0,05$ ). O perfil clínico revelou broncopneumonia apenas no grupo controle (n=4/5) entre 80-135 dias de vida. A imunidade colostrar e a vacinal apresentaram perfis inversamente proporcionais, com maior produção de ACs aos seis meses de idade. Devido à precocidade da doença respiratória, estudos complementares são necessários para esclarecer o papel da resposta imune celular na vacinação diante dos ACs maternos.

Palavras-chave: vacinação, anticorpo materno, bezerro, doença respiratória bovina

### ABSTRACT

*This research aimed to evaluate the effect of colostral antibodies (ABs) on the humoral immune response induced by vaccination in Holstein calves. Twenty-four calves were randomly assigned into four groups: G1 - vaccinated on D14 and D44 (n= 6); G2 - on D90 and D120 (n= 5); G3 - on D180 and D210 (n= 8); Control: unvaccinated (n= 5). Commercial vaccine (Cattle Master Gold FP5+L5<sup>®</sup> - Zoetis, Brazil) was administered subcutaneously (5mL). Virus neutralization test (VN) was performed at the time of vaccination, booster and 30 days after booster to determine AB titers. No differences were observed between control and G1 or G2 for seropositive frequencies and ABs titers ( $P \geq 0.05$ ). G3 showed higher AB production than control for BoHV-1 ( $P < 0.01$ ), BRSV ( $P < 0.01$ ) and BPIV-3 ( $P = 0.02$ ) after booster (D240). Overtime analysis also exhibited increase in AB titers in G3 ( $P \leq 0,05$ ). Bronchopneumonia was identified in the control group (n= 4/5) between 80-135 days of life. The colostral and vaccinal immunity presented inversely proportional profiles, with higher production of ABs at 6 months of age. Due to the precocity of respiratory disease further studies are required to clarify the role of cellular immune response to vaccination in face of maternal ABs.*

*Keywords: vaccination, maternal antibody, calf, bovine respiratory disease*

## INTRODUÇÃO

Durante a gestação, o sistema imunológico materno reconhece o feto em desenvolvimento como não próprio. O ambiente feto-placentário é regulado, então, por citocinas de perfil Th2 (imunidade humoral), cujo papel é neutralizar as respostas inflamatórias induzidas pelas citocinas do tipo Th1 (imunidade celular) e promover a proliferação e diferenciação das células dos trofoblastos e placentação (Morein *et al.*, 2002). Essa supressão da resposta Th1, no entanto, reflete negativamente no desenvolvimento do sistema imunológico do feto em si e interfere na habilidade do recém-nascido (*naïve*) em direcionar uma resposta imune específica contra as infecções virais até completa maturação de seu sistema imune (Cortese, 2009). Assim, os anticorpos (ACs) maternos adquiridos via colostro são indispensáveis para a proteção dos bezerros contra o herpesvírus bovino tipo 1 – BoHV-1, o vírus respiratório sincicial bovino – BRSV, o vírus da diarreia viral bovina – BVDV e o vírus da parainfluenza bovina tipo 3 – BPIV-3 (Windeyer *et al.*, 2014).

A duração desses ACs maternos, porém, depende da concentração de imunoglobulinas (Igs) ingeridas e absorvidas e pode determinar o período de estabelecimento da doença respiratória bovina – DRB. A meia-vida dos ACs específicos correspondentes ao BoHV-1, ao BVDV, ao BPIV-3 e ao BRSV pode ser observada ao redor de 21, 23, 30 e 35 dias, respectivamente (Fulton *et al.*, 2004). Estudos a campo também demonstram que a DRB ocorre de forma precoce, afetando cerca de 7,7% a 9,5% dos animais entre 14 e 90 dias de vida, com elevada taxa de tratamento (21,9%) (Windeyer *et al.*, 2014). No sul do Brasil, a DRB também é mais frequente (19,3%) em bezerros com idade inferior a três meses (Assis-Brasil *et al.*, 2013).

Essa precocidade da DRB aponta para a necessidade da proteção imunológica dos animais, muito embora elevados títulos de ACs maternos possam suprimir a imunidade ativa dos bezerros aos antígenos vacinais (Ellis *et al.*, 2001). Em contrapartida, outros estudos sugerem que bezerros vacinados precocemente apresentam memória imunológica e perfil de anticorpos constante, ao invés da clássica diminuição ao longo do tempo (Endsley *et al.*, 2003; Ridpath *et al.*, 2003).

A elevada ocorrência da DRB na criação de bezerras em aleitamento motiva estudos sobre a resposta imune vacinal precoce e sua relação com a imunidade materna adquirida, com foco na adoção de estratégias e protocolos vacinais que visam à proteção dos bezerros durante a fase de maior susceptibilidade. Contudo, as particularidades em relação aos protocolos e à composição das vacinas brasileiras podem limitar a comparação dos dados e das estratégias conduzidos em estudos no exterior. O objetivo desta pesquisa foi avaliar a interferência de anticorpos maternos adquiridos na resposta imune humoral induzida pela vacinação em bezerros Holandeses com diferentes faixas etárias.

## MATERIAL E MÉTODOS

O delineamento experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (nº 2574) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) – Universidade de São Paulo (USP). Assim, o presente estudo foi realizado de junho de 2013 a maio de 2015, em fazenda comercial localizada na cidade de Araras (22° 10'S, 47° 15'W), São Paulo – Brasil.

O colostro utilizado nesta pesquisa foi obtido e armazenado em banco de colostro antes do nascimento dos bezerros machos. A triagem do colostro foi realizada após a primeira ordenha das doadoras, com o auxílio de colostrômetro (IgG $\geq$ 5.000mg/dL) e índice Brix ( $\geq$ 21%). Assim, o colostro foi identificado e congelado a -20°C, em garrafas plásticas limpas e desinfetadas, com capacidade para dois litros (L). As vacas doadoras eram imunizadas com vacina comercial (Cattle Master Gold FP5 + L5<sup>®</sup>, Zoetis, São Paulo, Brasil), contendo estirpes de BVDV do tipo 1 (5960) e do tipo 2 (53637) inativadas; BoHV-1 (Cooper) e BPIV-3 (RLB 103) vivos/termossensíveis; BRSV (375) vivo/atenuado, além de *Leptospira canicola*, *L. grippotyphosa*, *L. hardjo*, *L. icterohaemorrhagiae* e *L. pomona* inativadas, associadas ao Quil-A, ao colesterol e ao Amphigen como adjuvantes. A vacinação dos animais iniciava-se aos 120 dias (D) de vida e *booster* aos 150 dias, seguidos de revacinações semestrais realizadas nos meses de abril e outubro.

As vacas foram transferidas e mantidas em galpão maternidade, com camas de areia individuais e *cross-ventilation*, por aproximadamente 30 dias antes do parto previsto. Foram selecionados 26 bezerros machos da raça Holandesa, oriundos de parto eutócico. A vitalidade dos animais foi avaliada utilizando-se o teste APGAR (Vannucchi *et al.*, 2015). Os partos ocorreram no inverno de 2012 (n=5) e 2013 (n=5), verão de 2013 (n=4), primavera de 2014 (n=5) e verão de 2014 (n=7).

Após 48 horas da colostragem, amostras de sangue dos bezerros foram coletadas em tubos sem anticoagulante e *Ethylene Diamine Tetraacetic Acid* (1,5mg/mL) (EDTA) para obtenção de soro e *buffy coat*, respectivamente. As amostras foram usadas para realização da vírus neutralização (VN) (Manual..., 2016) e para análise da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) para exclusão de infecções fetais por BVDV, conforme descrito por Weinstock *et al.* (2001). Seguindo esses critérios, 2/26 bezerros foram descartados porque se apresentaram soropositivos antes de ingerirem o colostro. Após o nascimento, os bezerros eram transferidos da maternidade para a área coletiva (10x5m) isolada do rebanho. O local da instalação era previamente higienizado com água e sabão neutro; em seguida, o ambiente era desinfetado com o uso de cal virgem. A cama utilizada era composta por feno.

Todos os bezerros (40-55kg) foram alimentados com um volume mínimo de quatro litros de colostro provenientes de vacas doadoras múltiparas. Imediatamente após o nascimento, uma mamadeira contendo 2L de colostro foi descongelada em banho-maria (45-50°C), até o colostro atingir temperatura ideal de 37°C para alimentação do bezerro. Assim, a primeira mamada de colostro ocorreu em até três horas pós-nascimento (p.n). Uma segunda garrafa (2L adicionais) foi descongelada imediatamente antes da segunda mamada, que ocorreu entre cinco e oito horas p.n. Uma sonda esofágica foi utilizada para alimentação de bezerros que não sugavam corretamente o bico da mamadeira.

Ao redor de cinco dias de vida, os bezerros foram transferidos da fazenda para a área experimental na Clínica de Bovinos e Pequenos Ruminantes (CBPR) da FMVZ-USP. Na CBPR,

os bezerros foram criados em baias previamente higienizadas e desinfetadas de aproximadamente 5x5m, compartilhadas por, no máximo, três animais do mesmo grupo experimental. Os bezerros foram alimentados com 6L de sucedâneo lácteo (Sprayfo Violeta<sup>®</sup>, Sloten do Brasil Ltda., Santos, Brasil) por dia, ração peletizada (Agromix<sup>®</sup>, Jaboticabal, Brasil), sal mineral e água *ad libitum* até o desmame, realizado gradualmente ao atingirem dois meses de idade. A mochação com ferro quente foi realizada logo após o desmame.

Os bezerros foram distribuídos entre quatro grupos experimentais conforme o protocolo de vacinação: G1 (n=6) – vacinado no D14; G2 (n=5) – vacinado no D90; e G3 (n=8) – vacinado no D180. Todos os bezerros receberam *booster* 30 dias após a vacinação. Além disso, cinco bezerros não vacinados foram criados do nascimento aos oito meses de idade, para a composição do grupo controle. Empregou-se a mesma vacina comercial utilizada para imunização das doadoras de colostro, sendo administradas duas doses de 5mL, por via subcutânea, na região da tábua do pescoço.

Durante o estudo, a doença respiratória foi monitorada por meio do escores de broncopneumonia padronizado pela *University of Wisconsin* (Madison) (Poulsen e McGuirk, 2009). Além disso, a taxa de infecção ativa dos bezerros foi verificada pelo aumento dos títulos de ACs específicos em, pelo menos, quatro vezes em relação ao momento anterior (Martin e Bohac, 1989). Amostras de sangue foram coletadas em tubos sem anticoagulante para obtenção do soro sanguíneo, no D14, D44 e D74 no grupo G1; D90, D120 e D150 no grupo G2; e D160, D210 e D240 no G3. A obtenção das amostras de sangue do grupo controle foi pareada com as coletas realizadas para todos os grupos vacinados.

A VN para BVDV, BoHV-1, BRSV e BPIV-3 foi realizada estritamente de acordo com o manual previamente estabelecido pela OIE (Manual..., 2016). Para tanto, foram utilizadas placas de poliestireno de 96 cavidades, utilizando-se uma diluição constante do soro em  $\log_2$  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 se adicionaram 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 ser adicionado 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, conseqüentemente, o ECP em ambas as cavidades de cada diluição.

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa estatístico SPSS 25.0 (IBM Corporation, Armonk, EUA). A distribuição dos dados quanto à normalidade foi testada pelo teste de Shapiro-Wilk. A soropositividade dos bezerros foi determinada considerando-se os títulos acima de 1:10 para BVDV e 1:2 para BRSV, BPIV-3 e BoHV-1 (Fulton *et al.*, 2004). As médias dos títulos das viroses respiratórias obtidas após 48 horas da colostragem foram

comparadas pela análise de variância (ANOVA) *One-way*, seguida pelo teste *post-hoc* de Gabriel, para identificação das diferenças entre os grupos. A comparação entre as frequências (%) de animais soropositivos e soronegativos entre os grupos foi determinada pelo teste exato de Fisher. A variável títulos de ACs (log<sub>2</sub>) foi comparada entre grupos pelo teste t para amostras independentes. Diferenças entre os momentos foram detectadas pela ANOVA para medidas repetidas. Para identificação dos respectivos momentos em que ocorreram tais diferenças, utilizou-se o teste t para amostras dependentes. Todas as análises foram consideradas estatisticamente diferentes quando P≤0,05.

## RESULTADOS

As médias e os desvios-padrão dos títulos dos ACs para as viroses respiratórias obtidas após a colostragem estão dispostos na Fig. 1. Os títulos de ACs específicos para as viroses, obtidos após as 48 horas de vida, foram semelhantes entre os quatro grupos experimentais para o BoHV-1 e o BPIV-3, porém diferenças foram detectadas para o BVDV (F=6,35; df=3; P≤0,01) e o BRSV (F=6,23; df=3; P≤0,01). Para o BVDV, a diferença foi verificada entre G3 (4,5±6,20) e G2 (10,1±2,28) (P≤0,01) e entre G3 (4,5±6,20) e controle (10,8±0,83) (P=0,01). A diferença para o BRSV foi observada entre G3 (2,37±2,61) e G1 (6,3±1,37) (P≤0,01) e entre G3 (2,37±2,61) e G2 (6,2±2,17) (P=0,01).

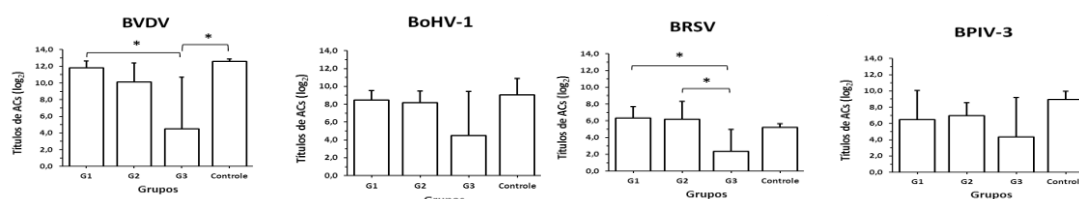


Figura 1. Valores médios de títulos de anticorpos neutralizantes (log<sub>2</sub>) para BVDV, BoHV-1, BRSV e BPIV-3 após colostragem dos 24 bezerros Holandeses distribuídos posteriormente nos grupos 1 (G1), 2 (G2), 3 (G3) e controle\*\*. \*Diferenças significativas entre os grupos, quando P≤0,05, obtidas na ANOVA *One-way*, seguida pelo teste *post-hoc* de Gabriel. \*\*G1 – vacinados no D14 e D44 (n=6); G2 – vacinados no D90 e D120 (n=5); G3 – vacinados no D180 e D210 (n=8); controle: não vacinado (n=5).

A frequência de bezerros soropositivos para as viroses respiratórias (%) e a média dos títulos de ACs (log<sub>2</sub>) obtidos após a vacinação e *booster* estão apresentadas na Fig. 2. Todos os bezerros permaneceram soropositivos para BVDV, BoHV-1 e BPIV-3 entre D14 e D74. Pequenas

variações foram observadas nas frequências para BRSV do grupo vacinado (66,7-83,3%) e do controle não vacinado (80-100%). As frequências de soropositivos e títulos de ACs para as viroses respiratórias foram semelhantes entre os grupos não vacinado e vacinado aos 14

dias de vida ( $P > 0,05$ ). A análise no tempo pela ANOVA para medidas repetidas no grupo não vacinado G1 revelou valores decrescentes dos títulos de ACs neutralizantes do D14 ao D74 para o BVDV ( $P = 0,02$ ) e o BPIV-3 ( $P = 0,01$ ).

A comparação múltipla entre os momentos pelo teste t para amostras dependentes detectou diferenças entre D14-D44 ( $P = 0,04$ ) e D14-D74 ( $P = 0,02$ ) para o BVDV; e entre D14-D44 ( $P = 0,01$ ), D14-D74 ( $P = 0,01$ ) e D44-D74 ( $P = 0,01$ ) para o BPIV-3. A análise no tempo no grupo de bezerros vacinados aos 14 dias de vida também revelou queda nos títulos de ACs para BVDV ( $P < 0,01$ ), BoHV-1 ( $P < 0,01$ ) e BPIV-3 ( $P = 0,01$ ). A comparação múltipla entre momentos revelou diferenças entre D14-D44 ( $P = 0,01$ ), D14-D74 e D44-D74 ( $P < 0,01$ ) para o BVDV; entre D14-D44 ( $P = 0,01$ ), D14-D74 ( $P = 0,04$ ) e D44-D74 ( $P = 0,02$ ) para o BoHV-1; e entre D14-D44, D14-D74 e D44-D74 ( $P = 0,01$ ) para o BPIV-3. Não foram observadas diferenças no tempo para os títulos de ACs neutralizantes contra o BRSV em ambos os grupos experimentais.

Os bezerros dos grupos controle e vacinados aos 90 dias (G2) permaneceram 100% soropositivos para BVDV e BoHV-1 do D90 ao D150. Por outro lado, as frequências de soropositivos para BRSV e BPIV-3 foram semelhantes entre os grupos ( $P > 0,05$ ). Os títulos de ACs para BVDV, BRSV e BoHV-1 também foram semelhantes entre os grupos, entretanto os bezerros do grupo controle apresentaram maiores títulos de ACs específicos para BPIV-3 no D90 ( $P = 0,02$ ). A análise no tempo pela ANOVA e pelo teste t para amostras dependentes detectou queda apenas nos títulos de ACs contra o BPIV-3 ( $P = 0,05$ ) entre os momentos D90 e D150 ( $P = 0,04$ ) no grupo controle.

Os grupos controle e vacinados aos 180 dias de vida (G3) apresentaram frequências de soropositivos semelhantes, exceto para o BVDV ( $P = 0,02$ ) no D180. Os títulos de ACs para o BVDV também foram maiores no grupo controle em relação ao G3 no D180 ( $P < 0,01$ ) e no D210 ( $P = 0,01$ ). Em contrapartida, as médias dos títulos de ACs para BoHV-1 ( $P < 0,01$ ), BRSV ( $P < 0,01$ ) e BPIV-3 ( $P = 0,02$ ) foram maiores no grupo vacinado G3 após o *booster* (D240). A análise no tempo pela ANOVA e pelo teste t para amostras dependentes revelou queda nos títulos de ACs

apenas para o BVDV no controle ( $P = 0,03$ ), detectando-se diferenças entre D180-D240 ( $P = 0,03$ ) e D210-D240 ( $P = 0,03$ ). No grupo vacinados aos 180 dias (G3), as diferenças no tempo foram detectadas para BoHV-1 ( $P < 0,01$ ), BRSV ( $P = 0,02$ ) e BPIV-3 ( $P = 0,02$ ). A análise múltipla detectou aumento nos títulos de ACs entre D180-D240 ( $P < 0,01$ ) e D210-D240 ( $P = 0,01$ ) para o BoHV-1; D180-D240 ( $P = 0,03$ ) e D210-D240 para o BRSV ( $P = 0,04$ ); e D180-D240 para o BPIV-3 ( $P = 0,03$ ).

A avaliação do escore de doença respiratória permitiu identificar manifestações clínicas compatíveis com broncopneumonia (escore  $> 5$ ) em quatro bezerros (80%) do controle aos 80 dias ( $n = 2$ ), 90 dias ( $n = 1$ ) e 135 dias de vida ( $n = 1$ ). Não foram observadas manifestações clínicas (escore  $> 5$ ) nos bezerros pertencentes aos grupos vacinados.

## DISCUSSÃO

Esta pesquisa avaliou diferentes protocolos de vacinação para DRB em bezerros Holandeses com diferentes faixas etárias e níveis de ACs maternos circulantes. A ingestão do colostro oriundo de vacas vacinadas garantiu a transferência de ACs maternos contra as viroses respiratórias. Os títulos de ACs contra as viroses respiratórias após ingestão do colostro demonstraram que a quantidade de Igs específicas transferidas das mães aos recém-nascidos não foi completamente homogeneizada entre os grupos, apesar da padronização do protocolo de vacinação das vacas, além da seleção do colostro por qualidade pelos testes do colostrômetro e Brix. Esses dados refletem a variação individual entre as vacas referente à qualidade imunológica do colostro, o que, infelizmente, não pôde ser evitado pela ausência de provas para a avaliação das concentrações de ACs específicos no colostro. Pesquisas têm demonstrado que o colostro é tóxico para as células MDBK, inviabilizando o uso da VN para a detecção de ACs maternos contra as viroses respiratórias (Gomes *et al.*, 2014). A formação de *pool* pela mistura de colostro das vacas doadoras não pôde ser realizada, devido à diminuição nos níveis de ACs após processos repetidos de descongelamento (Godden *et al.*, 2006).

Efeito dos anticorpos...

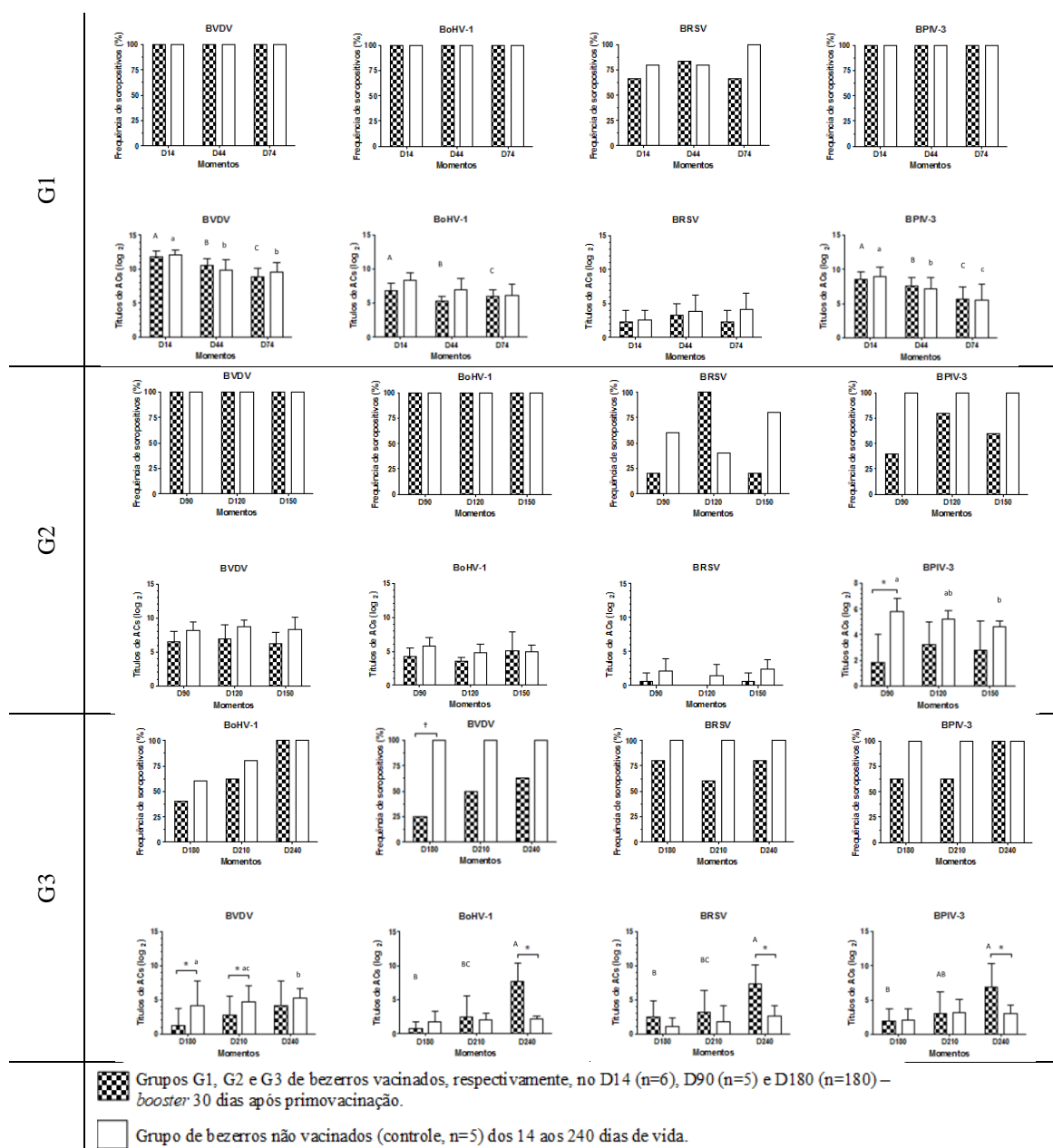


Figura 2. Frequências de animais soropositivos (%), valores médios de títulos de anticorpos ( $\log_2$ ) e desvios-padrão para BVDV, BoHV-1, BRSV e BPIV-3 obtidos em bezerros Holandeses não vacinados (controle) e vacinados do D14 ao D240. \*Diferenças significativas entre os valores médios dos grupos quando  $P \leq 0,05$  no teste t para amostras independentes. †Diferenças significativas entre as frequências dos grupos, quando  $P \leq 0,05$ , obtidas no teste exato de Fisher. Letras diferentes e maiúsculas indicam diferenças significativas no tempo para o grupo vacinado pelo teste t para amostras dependentes, enquanto letras diferentes e minúsculas indicam diferenças para o grupo controle ( $P \leq 0,05$ ).

Os baixos títulos de ACs contra o BRSV observados no soro dos bezerros às 48h de vida são provavelmente devido à nula ou baixa concentração de ACs específicos no colostro das vacas doadoras. Apesar do intensivo calendário

sanitário da fazenda, sabe-se que esse vírus possui particularidade de não induzir memória imunológica de longa duração (Guzman e Taylor, 2015). As diferenças nos títulos de ACs para BVDV e BRSV entre o controle e os grupos

vacinados após a ingestão de colostro desapareceram ao longo do tempo, sendo os níveis de Igs iguais ao início dos protocolos de vacinação no G1 (D14), G2 (D90) e G3 (D180). As diferenças encontradas antes da aplicação da primeira dose da vacina provavelmente são consequência de exposições naturais aos vírus respiratórios detectadas no grupo controle ao longo do estudo, que resultaram em maiores títulos de ACs contra o BPIV-3 no D90 e o BVDV no D180.

A queda gradual dos títulos de ACs maternos no G1 e no controle entre D14-D74 pode ser explicada pelos períodos de meia-vida das Igs de aproximadamente 23, 21, 36 e 30 dias para BVDV, BoHV-1, BRSV e BPIV-3, respectivamente (Fulton et al., 2004). A ausência de diferenças entre os grupos experimentais, associada ao decréscimo nos títulos de ACs ao longo do tempo, indica que a vacinação dos bezerros aos 14 dias de vida não induziu resposta imune humoral para nenhuma das viroses respiratórias. Os efeitos negativos dos elevados títulos de ACs maternos na resposta imune humoral induzida pela vacinação também foram enfatizados por outros autores (Ellis et al., 2001; Fulton et al., 2004). Estudos retrospectivos a campo também demonstram a ineficácia das vacinas em estimular imunidade humoral em bezerras na segunda e quinta semanas de vida (Windeyer et al., 2015).

A revisão de Niewiesk (2014) aborda os mecanismos pelos quais a resposta imune vacinal pode ser afetada diante dos ACs maternos. O principal meio envolveria uma ligação cruzada entre a vacina e os ACs maternos (IgG), ou seja, entre o receptor de células B - BCR (que reconhece o antígeno da vacina) e o receptor FcγIIb (que liga a região Fc da IgG) na superfície das células B. Essa ligação não afetaria a resposta das células T, porém resultaria em um sinal negativo que inibe tanto a proliferação de células B quanto a secreção de ACs. No entanto, o delineamento experimental do presente estudo incluiu somente a avaliação da resposta imune humoral.

A vacinação dos bezerros aos 90 dias de idade não induziu resposta imune humoral para o BVDV, o BoHV-1 e o BPIV-3, provavelmente devido ao efeito de bloqueio dos ACs maternos, considerando-se que os bezerros ainda possuíam

altos títulos de ACs para essas viroses (Fulton et al., 2004). Os estudos de Endsley et al. (2003) e Ridpath et al. (2003) sugerem ainda que bezerros vacinados na presença ACs maternos circulantes podem desenvolver uma resposta mais rápida e maior à vacinação subsequente, mesmo quando uma resposta humoral na primovacinação não foi detectada. Apesar dos baixos títulos de ACs para o BRSV no D90, em ambos os grupos experimentais, a vacinação também não induziu resposta. A via de administração da vacina seria um fator importante a se considerar para esse agente, visto que o BRSV é mais dependente dos níveis de IgA específicas na mucosa respiratória que títulos séricos de ACs (Guzman e Taylor, 2015).

A comparação entre os títulos de ACs do controle e vacinados aos 90 dias deve ser realizada com cautela devido à elevada taxa de infecção nos bezerros não vacinados nesse período. A criação dos bezerros deste estudo em ambiente hospitalar, mesmo que em ala isolada dos pacientes, pode ter favorecido especialmente a disseminação do BPIV-3 no grupo controle dos 90-150 dias de idade, o que explicaria a diferença dos títulos encontrados com o grupo vacinado. Contudo, nenhum dos animais dos grupos vacinados (G1, G2 e G3) apresentou manifestação clínica da DRB, o que poderia sugerir uma resposta pelas células T presentes nesses animais (Chamorro et al., 2016).

Os elevados títulos de ACs maternos para BVDV, adquiridos após ingestão de colostro, provavelmente protegeram os bezerros controle por um período mais longo que outras viroses, o que explicaria a infecção tardia (D120-D150) desse grupo para essa virose e maiores títulos de ACs em relação aos vacinados no D180. Contudo, a vacinação do G3 não demonstrou resposta humoral eficaz para BVDV, visto que o controle e G3 apresentaram mesmo perfil após *booster* da vacina em D240. Em contrapartida, títulos de ACs para as demais viroses respiratórias aumentaram após *booster* no G3. Provavelmente a completa metabolização dos ACs maternos aos seis meses de idade favoreceu a indução de imunidade humoral pela vacinação (Fulton et al., 2004).

A resposta ao BVDV após a vacinação no D180 apresentou menor intensidade em relação às demais viroses porque esse era o único vírus

inativado na vacina comercial usada nesta pesquisa. Lima *et al.* (2005) reportaram maior intensidade da resposta imune humoral ao BVDV em vacina experimental que continha vírus atenuado, quando comparada com outras três comerciais com vírus inativado. O estímulo da imunidade apresentada pela vacina contendo apenas vírus inativado, apesar de parecer limitado, pode conferir biossegurança e proteção imunológica quando utilizado em protocolos de reforço anual após primovacinação com BVDV vivo (Walz *et al.*, 2017). No Brasil, a vacina contendo BVDV vivo começou a ser comercializada no início de 2018 e, portanto, estudos acerca de seus efeitos a longo prazo deverão ser realizados.

Embora a soroconversão dos ACs específicos não tenha sido identificada no G1 e no G2, pesquisas internacionais têm demonstrado que a vacinação é capaz de estimular linfócitos T e B, mesmo na presença de altos títulos de ACs maternos (Endsley *et al.*, 2003). Segundo Chamorro *et al.* (2016), a ausência de soroconversão em bezerros vacinados diante de ACs maternos não deve ser interpretada como evidência de falha na vacinação, pois a imunidade celular pode ser ativada dentro de poucos dias após primovacinação, e o aumento da responsividade das células T específicas pode persistir por semanas a meses (células de memória). Fatores como idade do animal, concentração de ACs maternos, tipo de vacina, presença ou não de adjuvante e via de administração da vacina (produção de IgA) determinariam o sucesso dessa resposta imune vacinal e, conseqüentemente, a proteção clínica dos animais (Chamorro *et al.*, 2016).

Entre as condições experimentais apresentadas por este estudo, foi possível demonstrar que a vacinação induziu maiores produções de ACs contra as viroses respiratórias nos bezerros vacinados aos 180 dias de vida, quando os títulos de ACs maternos eram nulos ou baixos. A precocidade da doença respiratória e a ausência de estudos nacionais sobre a indução de resposta celular pelas vacinas comerciais brasileiras apontam para a necessidade de estudos futuros, com o objetivo de validar o melhor protocolo de vacinação na criação de bezerras.

## CONCLUSÃO

As imunidades colostrais e vacinais apresentaram perfis inversamente proporcionais. Assim, a maior produção de ACs contra BoHV-1, BRSV e BPIV-3 ocorreu aos seis meses de idade, na ausência de ACs maternos circulantes. Ademais, a vacinação dos bezerros aos três meses de idade manteve a produção de ACs específicos contra as viroses respiratórias.

## AGRADECIMENTOS

Os autores são gratos a todos os colaboradores da Fazenda Colorado e pelo suporte financeiro viabilizado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (São Paulo, Brasil; Processo 2012/02129-8) e pela empresa Zoetis. Agradecem também ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsas de iniciação científica e mestrado.

## REFERÊNCIAS

- ASSIS-BRASIL, N.D.; MARCOLONGO-PEREIRA, C.; HINNAH, F.L. *et al.* Enfermidades diagnosticadas em bezerros na região sul do Rio Grande do Sul. *Pesqui. Vet. Bras.*, v.33, p.423-430, 2013.
- CHAMORRO, M.F.; WOOLUMS, A.; WALZ, P.H. Vaccination of calves against common respiratory viruses in the face of maternally derived antibodies (IFOMA). *Anim. Health Res. Rev.*, v.17, p.79-84, 2016.
- CORTESE, V.S. Neonatal immunology. *Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract.*, v.25, p.221-227, 2009.
- ELLIS, J.A.; WEST, K.; CORTESE, V. *et al.* Effect of maternal antibodies on induction and persistence of vaccine-induced immune responses against bovine viral diarrhoea 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. *et al.* Maternal antibody blocks humoral but not T cell responses to BVDV. *Biologicals*, v.31, p.123-125, 2003.



- FULTON, R.W.; BRIGGS, R.E.; PAYTON, M.E. *et al.* 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, p.643-649, 2004.
- GODDEN, S.; MCMARTIN, S.; FEIRTAG, J. *et al.* Heat-treatment of bovine colostrum. II: effects of heating duration on pathogen viability and immunoglobulin G. *J. Dairy Sci.*, v.89, p.3476-3483, 2006.
- GOMES, V.; BACCILI, C.C.; SILVA, C.P.C. *et al.* Humoral immunity assessment in calves born to cows immunized with inactivated vaccine for bovine herpesvirus 1 and bovine viral diarrhoea virus. *Acta Sci. Vet.*, v.42, p.1239, 2014.
- GUZMAN, E.; TAYLOR, G. Immunology of bovine respiratory syncytial virus in calves. *Mol. Immunol.*, v.66, p.48-56, 2015.
- LIMA, M.D.; VOGEL, F.S.F.; FLORES, E.F. *et al.* Anticorpos neutralizantes contra o vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV): comparação entre um imunógeno experimental atenuado e três vacinas comerciais inativadas. *Ciênc. Rural*, v.35, p.230-234, 2005.
- MANUAL of diagnostics tests and vaccines for terrestrial animals. Paris: OIE, 2016. Available in: <<http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>>. Accessed in: 3 Mar. 2016.
- MARTIN, S.W.; BOHAC, J.G. The association between serological titers in infectious bovine rhinotracheitis virus, bovine virus diarrhoea 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.
- MOREIN, B.; ABUSUGRA, I.; BLOMQUIST, G. Immunity in neonates. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.87, p.207-213, 2002.
- NIEWIESK, S. Maternal antibodies: clinical significance, mechanism of interference with immune responses, and possible vaccination strategies. *Front. Immunol.*, v.5, p.446, 2014.
- POULSEN, K.P.; MCGUIRK, S.M. Respiratory disease of the bovine neonate. *Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract.*, v.25, p.121-137, 2009.
- RIDPATH, J.F.; NEIL, J. D.; ENDSLEY, J. *et al.* Effect of passive immunity on the development of a protective immune response against bovine viral diarrhoea virus in calves. *Am. J. Vet. Res.*, v.64, p.65-69, 2003.
- VANNUCCHI, C.I.; RODRIGUES, J.A.; SILVA, L.C.G. *et al.* Effect of dystocia and treatment with oxytocin on neonatal calf vitality and acid-base, electrolyte and haematological status. *Vet. J.*, v.203, p.228-232, 2015.
- WALZ, P.H.; GIVENS, M.D.; RODNING, S.P. *et al.* Evaluation of reproductive protection against bovine viral diarrhoea virus and bovine herpesvirus-1 afforded by annual revaccination with modified-live viral or combination modified-live/killed viral vaccines after primary vaccination with modified-live viral vaccine. *Vaccine*, v.35, p.1046-1054, 2017.
- WEINSTOCK, D.; BHUDEVI, B.; CASTRO, A.E. Single-tube single-enzyme reverse transcriptase PCR assay for detection of bovine viral diarrhoea virus in pooled bovine serum. *J. Clin. Microbiol.*, v.39, p.343-346, 2001.
- WINDEYER, M.C.; LESLIE, K.E.; GODDEN S.M. *et al.* Factors associated with morbidity, mortality, and growth of dairy heifer calves up to 3 months of age. *Prev. Vet. Med.*, v.113, p.231-240, 2014
- 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.