

## VACINAS COM MARCADORES ANTIGÊNICOS CONTRA O VÍRUS DA RINOTRAQUEÍTE INFECCIOSA BOVINA E O VÍRUS DA DOENÇA DE AUJESZKY.

### VACCINES WITH ANTIGENIC MARKERS AGAINST BOVINE HERPESVIRUS TYPE-1 AND PSEUDORABIES VIRUS

Janice Reis Ciacci Zanella<sup>1</sup> Eduardo Furtado Flores<sup>2</sup>

#### - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA -

#### RESUMO

Vacinas contra o herpesvírus bovino tipo-1 (IBRV, vírus da rinotraqueíte infecciosa) e o herpesvírus suíno (PRV, vírus da doença de Aujeszky) têm sido amplamente utilizadas em vários países para minimizar as perdas associadas à essas infecções. As vacinas tradicionais, no entanto, induzem uma resposta humoral indistinguível da resposta à infecção natural, o que não permite a distinção entre animais vacinados dos infectados naturalmente. Isto tem dificultado o estabelecimento de medidas de controle e erradicação dessas enfermidades. Nos últimos anos, a manipulação genética desses vírus tem permitido a obtenção de mutantes com marcadores antigênicos específicos. A estratégia consiste na deleção de uma ou mais glicoproteínas do envelope viral que não são essenciais para

a replicação do vírus e o uso desses mutantes como vacinas. A utilização de um teste sorológico específico para a glicoproteína deletada permite a distinção entre animais vacinados dos infectados com o vírus de campo. A utilização de vacinas com marcadores antigênicos, também chamadas de vacinas diferenciais, tem sido a base de programas de controle e erradicação da doença de Aujeszky em vários países e começa a ser utilizada no controle da rinotraqueíte infecciosa bovina. Este artigo apresenta uma breve revisão sobre as bases moleculares e biológicas das vacinas diferenciais para o IBRV e PRV, assim como possíveis aplicações dessas vacinas no controle dessas enfermidades no Brasil em um futuro próximo.

**Palavras-chave:** herpesvírus bovino tipo-1, rinotraqueíte infecciosa, herpesvírus suíno, doença de Aujeszky, pseudorraiva, vacinas.

<sup>1</sup>Médico Veterinário, MSc, Pesquisador Associado em Virologia Molecular, Department of Veterinary and Biomedical Sciences, University of Nebraska, Lincoln, NE, 685883-0905, USA, Bolsista do CNPq.

<sup>2</sup>Médico Veterinário, MSc., Professor Assistente, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Santa Maria, 97119-900, Santa Maria, RS, Brasil. Bolsista do CNPq. Autor para correspondência.

## SUMMARY

Vaccination has been widely used to minimize the economic losses caused by bovine herpesvirus type-1 (IBRV) and pseudorabies virus (PRV) infections. The traditional vaccines, however, induce a humoral response that is indistinguishable from that induced by the natural infection. The impossibility of distinction between vaccinated and naturally infected animals has impaired the establishment of control and eradication programs for these diseases. In the last years, the genetic manipulation of infectious agents has allowed the development of mutants that are defective in expression of specific envelope glycoproteins. The strategy consists of deletion of one or more non-essential viral envelope glycoproteins and the use of these mutants as vaccines. By using a serologic test that is specific for the deleted glycoprotein, it is possible to differentiate the vaccinated animals from those that have been naturally infected. The use of these genetically engineered vaccines, also known as marker vaccines, has been the basis for control and eradication programs of Aujeszky's disease in several countries and has recently begun to be utilized for IBRV. This article presents a brief review on the molecular and biological basis of the differential vaccines against IBRV and PRV and the possible applications of such vaccines in the control of these infections in the near future in Brazil.

**Key words:** bovine herpesvirus-1, bovine rhinotracheitis, Aujeszky's disease, pseudorabies vírus, vaccines.

## INTRODUÇÃO

Os herpesvírus bovino tipo 1 (IBRV)<sup>a</sup> e herpesvírus suíno (PRV) estão entre os patógenos mais importantes dos animais domésticos e causam perdas significativas para a indústria pecuária em todo o mundo (GIBBS & RWEYEMAMU, 1977; KAHRS, 1981; PENSAERT & KLUGE, 1989). O IBRV e PRV pertencem à família HERPESVIRIDAE, subfamília alphaherpesviridae, a qual inclui outros vírus importantes de humanos e animais, como o vírus do herpes simples, vírus da varicela zoster e o herpesvírus eqüino tipo 1 (vírus da rinopneumonite eqüina) (ROIZMAN, 1990). Alphaherpesvírus são vírus DNA de cadeia dupla, com envelope, e que possuem várias propriedades biológicas em comum: infectam várias espécies animais, replicam rapidamente em células de cultivo, e estabelecem infecções latentes em gânglios do sistema nervoso periférico (ROIZMAN, 1990).

O herpesvírus bovino tipo 1, também conhecido como vírus da rinotraqueíte infecciosa (IBRV), tem sido associado à diversas manifestações clínicas em bovinos, incluindo doença respiratória (IBR), vulvovaginite pustulosa (IPV), balanopostite (IBP), aborto e infertilidade em vacas, encefalite em bezerros e infecção sistêmica fatal em recém-nascidos (GIBBS & RWEYEMAMU, 1977; KAHRS, 1981). O IBRV tem sido também considerado o principal agente viral envolvido na complexa doença respiratória chamada "febre do transporte", que causa graves perdas econômicas à atividade pecuária (KAHRS, 1981). A infecção pelo IBRV tem sido diagnosticada em diversos países e é apontada como uma das principais enfermidades infecciosas de bovinos (KAHRS, 1981).

A doença de Aujeszky, ou pseudorabia, é uma infecção causada pelo herpesvírus suíno (PRV), também chamado de vírus da doença de Aujeszky, e acomete primariamente suínos (PENSAERT & KLUGE, 1989; TAYLOR, 1989). A infecção pode ser letal em leitões, devido a lesões do sistema nervoso central (SNC), caracteriza-se principalmente por sinais clínicos respiratórios em leitões desmamados e em animais de engorda e por sinais reprodutivos em animais adultos. Os suínos são os hospedeiros naturais e reservatórios do vírus na natureza, servindo como fonte natural de infecção para outras espécies como bovinos, caninos, felinos, ovinos, caprinos e leporinos, nos quais a doença é sempre fatal (KIMMAN ET AL., 1991, PENSAERT & KLUGE, 1989; TAYLOR, 1989). Além disso, o PRV pode agravar infecções bacterianas como as causadas por *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida* ou *Streptococcus suis* (VAN OIRSCHOT, 1991, VANNIER 1991).

No Brasil o herpesvírus bovino foi isolado de diferentes manifestações clínicas da enfermidade. ALICE (1978) isolou o vírus de casos de vulvovaginite, MUELLER et al., (1978), de feto abortado. Novamente MUELLER et al., (1981) de swabs vaginais, pústulas nasais e fígado; GALVÃO (1984) demonstrou 162 amostras positivas de 315 testadas usando muco cérvico vaginal, raspados vaginais e prepuciais; NOGUEIRA et al. (1986) isolaram o vírus a partir de surto de doenças respiratória e reprodutivas. Também foram relatados isolamentos de vírus de casos de balanopostites infecciosas (WEIBLEN et al., 1991); doença respiratória (SUAREZ-HEILEN et al., 1993), vulvovaginite (LOVATO et al., 1995). Há também relatos de isolamentos do herpesvírus causador da encefalite bovina (RIET-CORREA et al., 1989 & WEIBLEN et al., 1989), hoje reclassificado como herpesvírus bovino tipo 5.

No Brasil, após a descrição inicial da doença de Aujeszky por CARINI & MACIEL em 1912, surtos esporádicos foram descritos em Minas Gerais (HIPOLITO et al., 1960; SILVA et al., 1961), Rio de Janeiro (SILVA et al., 1960), Rio Grande do Sul (BAUER, 1955) e São Paulo (CARNEIRO 1950; MOREIRA et al., 1972). Na década de

80, a doença passou a ter mais destaque devido ao acometimento de criações intensivas de suínos em Santa Catarina (ROMERO et al., 1984, 1986) e São Paulo (KOTAIT et al., 1984; 1986a; 1986b).

### O papel da latência na epidemiologia do IBRV e PRV

Uma das principais características dos alphaherpesvírus é a habilidade de estabelecer infecções latentes no hospedeiro (ROIZMAN, 1990). Após a infecção primária, durante a qual replica nas mucosas nasofaríngea ou genital, o vírus invade terminações nervosas e é transportado ao longo dos axônios até os corpos neuronais situados nos gânglios sensoriais ou autonômicos (ROCK, 1994). Nos corpos neuronais, o vírus pode replicar agudamente e causar morte celular ou estabelecer infecção latente (ROCK, 1994). O estado de latência é caracterizado pela presença do DNA viral em neurônios, sem qualquer expressão gênica, replicação viral ou sinais clínicos. Dessa forma, o vírus pode permanecer latente por longo tempo, provavelmente por toda a vida do animal, fora do alcance do sistema imunológico (ROCK, 1994). No entanto, infecções latentes podem ser facilmente reativadas por situações de estresse tais como transporte, parto, confinamento, infecções parasitárias, outras doenças e também pela administração de corticosteróides (SHEFFY & RODMAN, 1973; ROCK, 1994). Uma vez reativado, o vírus migra de volta aos sítios da infecção primária, replica e é excretado ao meio ambiente (SHEFFY & RODMAN, 1973; ROCK, 1994). Uma vez infectados, virtualmente todos os animais tornam-se portadores e fontes potenciais de disseminação do vírus (ROCK, 1994). A habilidade dos herpesvírus em estabelecer e reativar da latência constitui-se no ponto-chave da epidemiologia dessas infecções e tem sido o maior obstáculo para o estabelecimento de medidas de controle e erradicação (KAHRS, 1981; ACKERMANN et al., 1990; VAN OIRSCHOT et al., 1990).

### A vacinação no controle das infecções pelo IBRV e PRV

Durante muitos anos, a vacinação tem sido utilizada no controle da infecção pelo IBRV em regiões endêmicas (KAHRS, 1981; ACKERMANN et al., 1990; VAN DRUNEN-LITTEL et al., 1993). Contraditoriamente, os países que usam a vacinação, não tem tido sucesso nos esforços de erradicação da infecção (ACKERMANN et al., 1990). Em contraste, países que não vacinam e baseiam seus programas de controle na identificação e descarte de animais soropositivos, tem sido bem sucedidos em seus programas de controle e erradicação (ACKERMANN et al., 1990). Estes dados demonstram que, embora as vacinas atuais sejam capazes de prevenir ou atenuar a doença clínica e reduzir a excreção de vírus, são incompatíveis com programas de controle e erradicação (KIT, 1988; ACKERMANN

et al., 1990; VAN OIRSCHOT et al., 1990; KIT & KIT, 1991). Isto deve-se principalmente à impossibilidade de diferenciar-se os animais vacinados daqueles infectados com o vírus de campo, e à habilidade das cepas vacinais atenuadas em estabelecer e reativar da latência (ACKERMANN et al., 1990; KIT & KIT, 1991).

As estratégias de controle da doença de Aujeszky variam entre os países. Na Inglaterra, Dinamarca e outros países escandinavos, considerados livres da doença, os animais são testados sorologicamente e os eventualmente identificados como positivos são eliminados. Em países como Alemanha, França, Bélgica e Espanha, as estratégias variam de acordo com a prevalência da infecção, mas a vacinação com cepas defectivas de glicoproteína I (gI) e sorologia diferencial vem sendo empregadas. Outros países como Itália, Portugal e Grécia ainda estão em fase de implantação de programas de controle e erradicação (NAUWYNCK & PENSAERT, 1994). Um programa intensivo de controle e erradicação da doença vem sendo empregado nos EUA, devido à alta incidência observada nos anos 70 e 80. Este programa tem como objetivo a erradicação da enfermidade até o ano 2000 e baseia-se no exame sorológico dos animais, com eliminação gradual dos positivos, e vacinação de rebanhos infectados. Este programa tem sido recentemente impulsionado pelo uso de vacinas com marcadores antigênicos (Tabela 1; ANNELLI, 1994).

Tabela 1. Vacinas diferenciais para Herpesvírus suíno (PRV) e Herpesvírus bovino tipo 1 (IBRV).

Vírus	Cepa	Vacina	Fenótipo
PRV	BARTHA	Vírus vivo atenuado	TK+, gX+, gI-, gIII-*, gp63-*
PRV	BUKAREST/SKB	Vírus vivo atenuado	TK+, gX+, gI-
PRV	CEPA 783	Manipulação genética	TK-*, gI-
PRV	BEGONIA	Manipulação genética	TK-, gI-
PRV	TOLVID/UPJOHN	Manipulação genética	gX-, gI+
PRV	PRV/MARKER GOLD/SyntroVet	Manipulação genética	TK-, gX-, gI-
PRV	PRV/MARKER BLUE/ SyntroVet	Manipulação genética	gX-, gI+
IBRV	LOS ANGELES	Manipulação genética	TK-, gIII-
IBRV	BHV-1**	Manipulação genética	TK-, gE-
IBRV	CEPA-A**	Vírus vivo atenuado	gE-

\* Deleção parcial

\*\* Vacinas em teste na Europa.

### Vacinas contra o IBRV e PRV

Várias vacinas têm sido utilizadas no controle das infecções pelo IBRV e PRV, incluindo vacinas com vírus vivo modificado, vírus inativado (morto) e subunidades virais. Vacinas vivas contêm cepas virais atenuadas em patogenicidade através de passagens sucessivas em cultivo de células de outras espécies (TODD, 1974), cultivo celular à baixas temperaturas (INABA, 1975), ou modificadas por tratamento com substâncias químicas mutagênicas (ZYGRAICH et al., 1974). Em geral, as mutações responsáveis pela atenuação não são conhecidas e apresentam potencial para reversão à patogenicidade (KIT, 1988; VAN DRUNEN-LITTEL et al., 1993).

### Vacinas tradicionais contra o IBRV

Vacinas vivas, para uso intranasal ou intramuscular, geralmente conferem boa proteção contra a enfermidade clínica quando de uma exposição subsequente ao vírus de campo (TODD et al., 1971). Algumas vacinas, no entanto, são ineficazes na prevenção da doença clínica (CURTIS & ANGULO, 1974); outras podem induzir sinais clínicos da enfermidade e transmissão do vírus vacinal (CURTIS & ANGULO, 1974), enquanto outras têm causado mortalidade em bezerros (BRYAN et al., 1994). Vacinas vivas para uso intramuscular geralmente são menos atenuadas que as intranasais e tem sido freqüentemente associadas a abortos quando fêmeas prenhes são vacinadas ou expostas à animais vacinados recentemente (ROBERTS, 1971). Outra desvantagem das vacinas vivas é a habilidade do vírus vacinal em estabelecer e reativar da infecção latente (NETTLETON et al., 1984). Vacinas inativadas tem sido produzidas através de tratamento do vírus com formalina (ZUSCHEK & CHOW, 1961), betapropiolactona (LEVINGS et al., 1984), etanol (HARALAMBIEV, 1976), radiação ultravioleta ou calor (HRISTOV & KARADJOV, 1975) e a sua eficácia depende fundamentalmente do uso de adjuvantes (HARALAMBIEV, 1976). Vacinas inativadas são seguras para o uso em animais prenhes, são estáveis por longo tempo e não são transmissíveis ou estabelecem latência (VAN DRUNEN-LITTEL et al., 1993). No entanto, a sua habilidade em conferir proteção à uma exposição subsequente geralmente é inferior às das vacinas vivas e depende de revacinações periódicas (SCHIPPER & KELLING, 1975). Entre as limitações comuns à estes dois tipos de vacinas, estão a incapacidade de prevenir a infecção, o estabelecimento e reativação de latência por vírus de campo, além da indução de uma resposta humoral indistinguível da resposta à infecção natural (KIT, 1988; KIT & KIT, 1991; VAN DRUNEN-LITTEL et al., 1993). Nos últimos anos, vacinas preparadas com frações dos vírions (ISRAEL et al., 1992), com glicoproteínas extraídas de vírions (VAN DRUNEN-LITTEL et al., 1990) ou produzidas artificialmen-

te (VAN DRUNEN-LITTEL et al., 1992) tem sido testadas e parecem ser promissoras.

### Vacinas tradicionais contra o PRV

Idealmente, a vacinação contra o PRV deveria prevenir a infecção, ou ao menos evitar ou reduzir a excreção de vírus (KIMMAN, 1994). No entanto, as vacinas para o PRV disponíveis atualmente não são capazes de prevenir a infecção e o estabelecimento de latência por amostras de campo. A quantidade de vírus necessária para estabelecer uma infecção aumenta e a quantidade de vírus eliminado é reduzida em animais vacinados, mas a vacinação não reduz a transmissão do vírus. Adicionalmente, a vacinação reduz a excreção do vírus infeccioso após a reativação do vírus latente (SCHOENBAUM, 1990). As vacinas inativadas são menos efetivas que as vacinas vivas, além de induzirem reações adversas devido ao adjuvante empregado, sendo que alguns países tem proibido o uso de óleo mineral como adjuvante (KIMMAN, 1994). Exemplos de vacinas de cepas atenuadas são as amostras Bartha e Bukarest (SUHACI et al., 1956; BARTHA, 1961). Estas cepas possuem deleções no gene que codifica a glicoproteína gI (METTENLEITER et al., 1985; LOMNICZI et al., 1987). Devido a falta de expressão de gI, estes mutantes podem crescer em certos tipos de célula, nas quais as amostras virais não-deletadas não o fazem (METTENLEITER et al., 1988). A cepa atenuada Bartha tem deleções e "mutações em ponto" nos genes que codificam gIII, gI e gp63, e em genes que estão envolvidos com a organização do capsídio viral (KIMMAN, 1994).

### Vacinas manipuladas geneticamente

Nos últimos anos, a manipulação genética do IBRV e PRV tem permitido a identificação e deleção de genes associados à patogenicidade e antigenicidade (Figura 1) (VAN DRUNEN-LITTEL et al., 1993; METTENLEITER, 1994). Dentro deste contexto, diversas vacinas com vírus vivo manipulado geneticamente tem sido formuladas (KIT, 1988; KIT & KIT, 1990; LIANG et al., 1992; VAN ENGELBURG et al., 1994). Ao contrário das vacinas vivas modificadas, nas quais a origem da atenuação muitas vezes é desconhecida, a base molecular das vacinas manipuladas geneticamente é bem definida. Devido a isto, as cepas virais manipuladas são geralmente apatogênicas e a reversão à patogenicidade é pouco provável, devido a remoção de grandes segmentos dos genes envolvidos (KIT & KIT, 1991; VAN DRUNEN-LITTEL et al., 1993). As proteínas que determinam virulência em alfa herpesvírus podem ser divididas em: 1) glicoproteínas do envelope 2) enzimas codificadas pelo vírus (timidina quinase, ribonucleotideo redutase, proteína quinase e exonuclease alcalina) e 3) proteínas do capsídio. A enzima timidina quinase (TK)

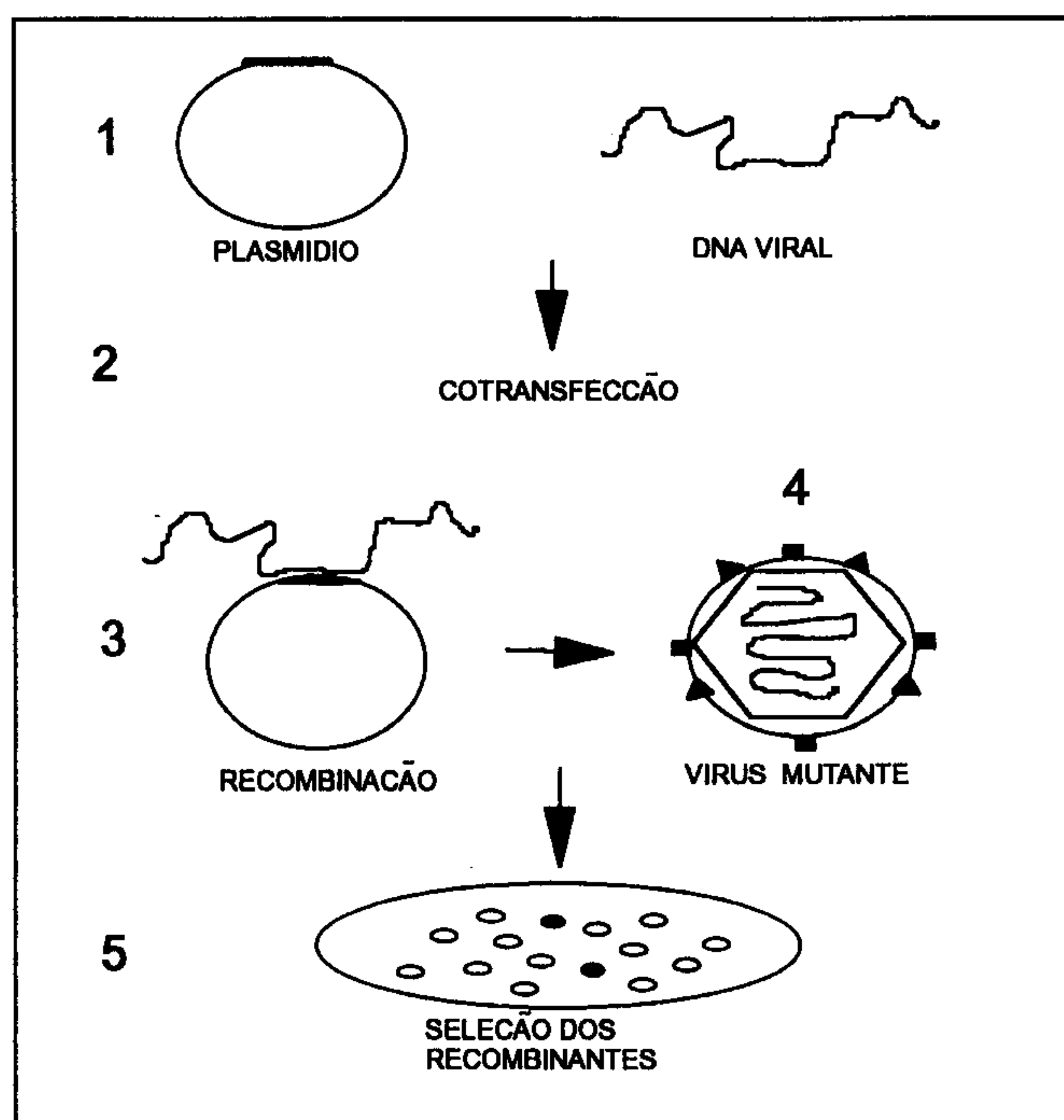


Figura 1. Manipulação genética para obtenção de vírus recombinantes: 1. O DNA de um plasmídeo contendo uma cópia inativada ou incompleta de um gene viral é cotransfectado (2) com o DNA de vírus de campo em células de cultivo. 3. Recombinação genética ocorre entre o DNA do vírus e o DNA do plasmídeo. 4. O resultante é um vírus recombinante que possui uma cópia inativada/deletada do gene (adquirido do plasmídeo). 5. Como a taxa de recombinação é baixa, testes imunológicos ou enzimáticos em placas são necessários para identificar os vírus recombinantes. Estes são isolados e crescidos em estoques para posterior caracterização.

foi o primeiro fator de virulência reconhecido em herpesvírus (TATAROV, 1968). Quando esta enzima é inativada, o vírus retém a capacidade de replicar em cultivo celular, porém a virulência *in vivo* diminui dramaticamente (KIT et al., 1985a, 1987, MARCHIOLI et al., 1987). A função desta enzima durante a infecção está aparentemente relacionada com a habilidade do vírus em replicar no SNC. Cepas de IBRV e PRV defectivas na expressão da enzima TK tem demonstrado ser seguras e eficazes na indução de proteção (KIT et al., 1985b; FLORES et al., 1993) e estão atualmente em uso em alguns países, enquanto uma cepa de IBRV defectiva na produção da enzima dUTPase está sendo atualmente testada como vacina (LIANG et al., 1993). Outra função determinante de virulência foi localizada no fragmento 4 do genoma do PRV, gene UL21 (KLUPP et al., 1992), que codifica uma proteína não-essencial do capsídeo (DE WIND et al., 1992). Quando o UL21 é inativado, a

virulência do vírus de campo diminui drasticamente (KLUPP et al., 1992). Deleções de glicoproteínas não-essenciais do envelope, como gI e gIII, reduzem a virulência de cepas do PRV (LOMNICZI et al., 1984; METTENLEITER et al., 1985; BERNIS et al., 1985; QUINT et al., 1987; KIMMAN et al., 1992), o que pode ser atribuído a função de gI na transmissão do vírus dentro do sistema nervoso (KRITAS et al., 1994) (Tabela 1).

### Vacinas com marcadores antigênicos

Uma grande limitação das vacinas tradicionais contra o IBRV e o PRV é a indução de uma resposta humoral indistinguível da resposta humoral induzida em resposta a infecção natural (VAN OIRSCHOT et al., 1990; KIT & KIT, 1991). Como virtualmente todos os animais infectados com alphaherpesvírus tornam-se portadores da infecção latente, os animais soropositivos, sejam vacinados ou infectados naturalmente, são considerados portadores do vírus (VAN OIRSCHOT et al., 1990; KIT & KIT, 1991). Nos últimos anos, a manipulação genética tem permitido a produção de vacinas com marcadores antigênicos, também chamadas de vacinas diferenciais, contra o IBRV e o PRV.

### Base molecular das vacinas diferenciais

O genoma dos alphaherpesvírus codifica vários produtos, entre os quais algumas glicoproteínas do envelope que não são essenciais para replicação do vírus em cultivo celular e *in vivo* (Tabela 2) (VAN DRUNEN-LITTEL et al., 1986; LIANG et al., 1992; SPEAR, 1993). O fato de algumas dessas glicoproteínas serem dispensáveis para a replicação viral tem sido utilizado na manipulação genética desses agentes, com o objetivo de produzir cepas atenuadas ou portadoras de marcadores antigênicos (KIT & KIT, 1990; LIANG et al., 1992; RISJEWIJK et al., 1994; VAN ENGELBURG et al., 1994). Uma representação esquemática da manipulação genética para a obtenção de vírus recombinantes é apresentada na Figura 1.

A base das vacinas diferenciais consiste na inativação ou deleção de um gene que codifica uma glicoproteína não essencial, e o uso desse vírus mutante como vacina (KIT & KIT, 1991). Através do uso de uma prova sorológica que detecta especificamente anticorpos contra a glicoproteína deletada, é possível distinguir-se animais vacinados dos que foram infectados com o vírus de campo (VAN OIRSCHOT et al., 1990; KIT et al., 1992; FLORES et al., 1993) (Figura 2). A glicoproteína a ser deletada/inativada tem que preencher alguns requisitos básicos: 1) ser dispensável para a replicação do vírus *in vitro* e *in vivo*; 2) Não ser necessária para indução de proteção; 3) ser imunogênica o suficiente para induzir uma resposta humoral duradoura que seja detectada por testes sorológicos; 4) se

Tabela 2. Glicoproteínas do envelope do herpesvírus bovino tipo-1 (IBRV) e herpesvírus suíno (PRV).

Família*	IBRV	PRV	Essencial para Replicação	Função
gB	gI	gII	Sim	PRV - Glicoproteína mais abundante (PRV). IBRV - Promove fusão entre as células.
gC	gIII	gIII	Não	IBRV - Glicoproteína mais abundante. IBRV, PRV - Alvo para anticorpos neutralizantes e linfócitos citotóxicos. Promove ligação do vírion com receptores na superfície da célula. Age na liberação dos vírions da célula.
gD	gIV	gp50	Sim	IBRV, PRV - Alvo para anticorpos neutralizantes, promove penetração do vírion na célula e transmissão do vírus entre células, fusão celular.
gH	gH	gH	Sim	Dimeriza com gL.
gL	gL	gL	Sim	PRV - Dimeriza com gH penetração do vírus na célula, transmissão entre células.
gE	gE	gI	Não	PRV - Dimeriza com gp63 determina o neurotropismo, transmissão do vírus entre neurônios.
gi	gi	gp63	Não	Dimeriza com gE/gI.
gG	-	gX	Não	?

\* As glicoproteínas de alphaherpesvírus são classificadas em famílias, de acordo com as semelhanças entre as mesmas. Glicoproteínas classificadas na mesma família são muito similares na seqüência de amino-acidos, estrutura e função.

\*\* Glicoproteínas de diferentes vírus, mesmo pertencendo a mesma família, as vezes tem nomes diferentes, de acordo com peso molecular ou ordem em que foram identificadas (Ex. gp50, ou gI, gII, etc.).

possível, contribuir para a atenuação do agente e 5) estar presente em todos (ou na maioria) dos isolados de campo (KIT & KIT, 1991). Com base nesses requisitos, cepas mutantes de IBRV e PRV para várias glicoproteínas tem sido produzidas e utilizadas como vacinas (Tabela 1). A distinção entre anticorpos induzidos pela infecção natural dos anticorpos induzidos pela vacinação é feita através de

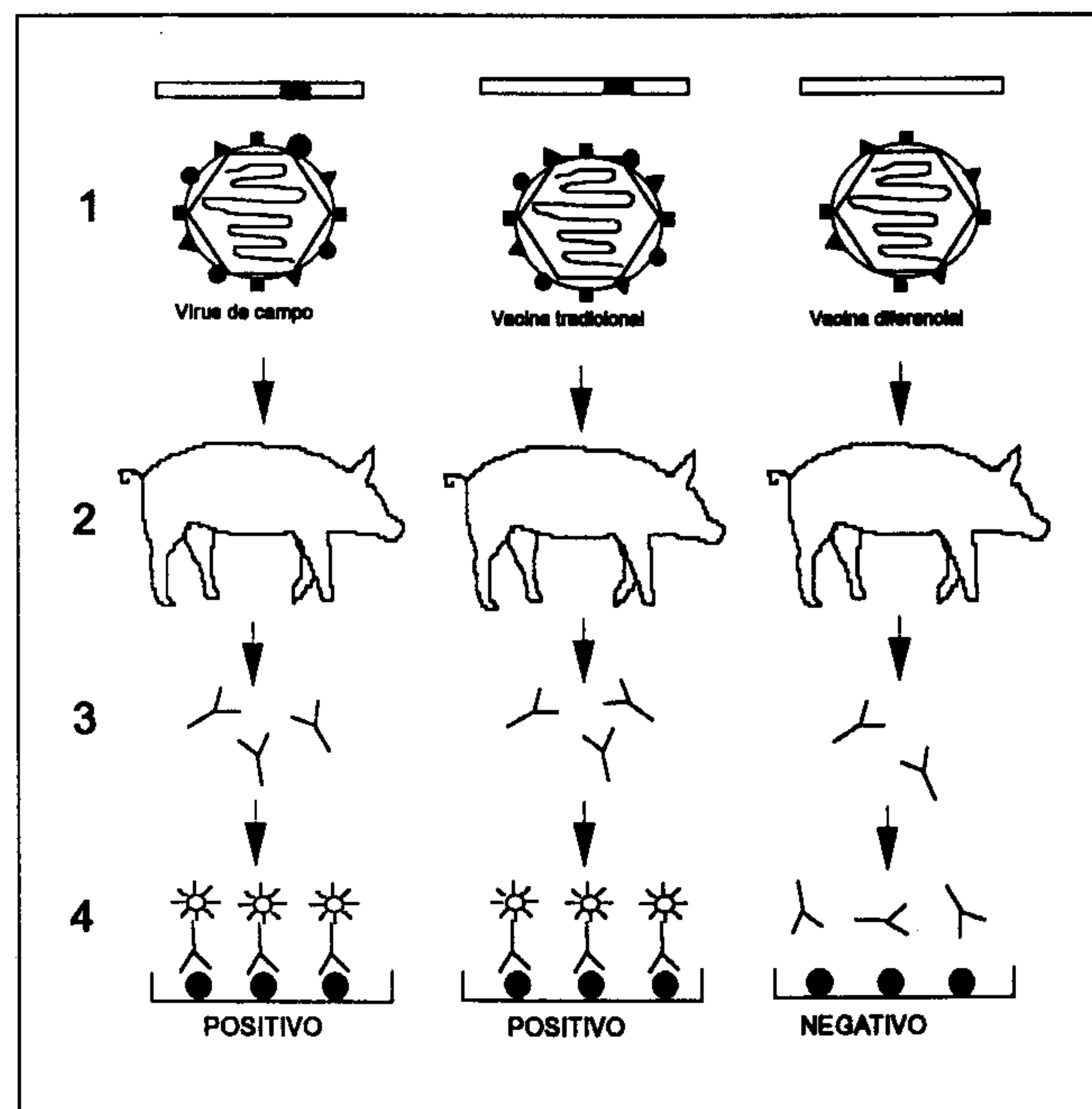


Figura 2. Base das vacinas e diagnóstico diferenciais. 1. Identificação e deleção/inativação de um gene que codifica uma glicoproteína não-essencial do envelope viral. 2. A infecção natural e a vacinação com vacinas tradicionais induzem resposta imunológica diferente da induzida pelas vacinas diferenciais. 3. Anticorpos contra todas as glicoproteínas do envelope são formados em animais infectados naturalmente e vacinados com vacinas tradicionais. Animais vacinados com o vírus mutante não desenvolvem anticorpos contra glicoproteína deletada. 4. Um teste sorológico (ELISA), que é baseado na glicoproteína deletada, permite a distinção entre os animais infectados pelo vírus de campo (positivos) ou vacinados com vacinas tradicionais (positivos) dos vacinados com o vírus mutante (negativos).

testes sorológicos como ELISA e aglutinação em latex (KIT et al., 1992).

### Vacinas diferenciais contra o IBRV

Vacinas com marcadores antigênicos para o IBRV são mais recentes e conseqüentemente menos difundidas que as vacinas contra o PRV (Tabela 1). A primeira vacina diferencial contra o IBRV foi desenvolvida por Dr. Saul Kit (KIT & KIT, 1990) nos Estados Unidos. A cepa vacinal, denominada IBRVdltk(NG)dlgIII, foi obtida a partir da cepa padrão "Los Angeles", através de deleções nos genes que codificam a enzima timidina quinase (TK) e a glicoproteína gIII (KIT & KIT, 1990). A deleção na enzima TK é a principal responsável pela atenuação (KIT et al., 1985a), enquanto a deleção em gIII constitui-se no marcador antigênico (KIT et al., 1992). Bezerros vacinados intramuscularmente com esta cepa não apresentaram sinais clínicos

da enfermidade, não excretaram vírus e foram satisfatoriamente protegidos da enfermidade clínica quando subsequentemente infectados com uma cepa altamente patogênica (FLORES et al., 1993). Da mesma forma, a vacinação reduziu significativamente a excreção e o estabelecimento de latência pelo vírus de campo (FLORES et al., 1993; WHEELER et al., 1994). Anticorpos séricos contra a glicoproteína gIII, que não são induzidos pela cepa vacinal, foram detectados de 9 a 11 dias após o desafio através de um ELISA específico para gIII (KIT et al., 1992; FLORES et al., 1993). Recentemente, uma cepa de IBRV defectiva na enzima TK e na glicoproteína gE foi testada na Europa (VAN ENGELENBURG et al., 1994). O duplo mutante TK/gE demonstrou ser apatogênico após administração intranasal e conferiu proteção contra a enfermidade clínica após desafio com vírus de campo (VAN ENGELENBURG et al., 1994). Estudos recentes com mutantes de IBRV defectivos nas glicoproteínas gIII, gE, gG ou gI tem sugerido que mutantes na glicoproteína gE são os que apresentam as melhores propriedades vacinais, incluindo atenuação e imunogenicidade (RIJSEWIJK et al., 1994).

### Vacinas diferenciais contra o PRV

A maioria das cepas vacinais do PRV que foram obtidas por manipulação genética possuem o gene da TK inativado, em combinação com uma deleção total ou parcial dos genes que codificam gIII, gI ou gX (KIT et al., 1987; MARCHIOLI et al., 1987; MOORMANN et al., 1990) (Tabela 1). Um outro vírus mutante, com deleções na TK, gX e gI foi construído (MCMILLEN, 1991). O gene que codifica a TK é envolvido na determinação de virulência dos herpesvírus, e por isso é deletado com frequência nas cepas vacinais do PRV que são construídas por engenharia genética. Estas cepas são geralmente menos capazes de causar reativação em infecções latentes (MENGELING, 1991). No entanto, cepas vacinais atenuadas e avirulentas, construídas por engenharia genética, podem recombinar *in vivo* e produzir uma nova amostra do PRV, quando co-inoculadas no mesmo animal (KATZ et al., 1990).

As cepas vacinais 783 e Begonia foram construídas a partir de deleções na amostra NIA-3, que é virulenta e altamente imunogênica. Na cepa Begonia, os primeiros 2055 pares de bases da região "unique short" do genoma foram deletados. Esta região inclui o gene que codifica a glicoproteína gI e parte do gene que codifica a proteína 11K (QUINT et al., 1987). Esse mutante inicial deu origem a duas outras cepas virais defectivas na expressão da TK: a cepa Begonia foi obtida através de crescimento desse vírus em meio de cultura contendo bromodeoxiuridina, a qual seleciona mutantes que não expressam TK (VISSER et al., 1989) e a cepa 783 foi obtida através de deleção de 19 pares de bases do gene da TK (MOORMAN et al., 1990).

As vacinas vivas diferem quanto a eficiência (PENSAERT et al., 1990; VANIER et al., 1991). A amostra 783 tem sido indicada por ser mais eficaz que a cepa Bartha na redução da quantidade e duração de excreção do vírus de campo em exposições subsequentes (VANNIER et al., 1991; VAN OIRSCHOT et al., 1991). Em alguns animais vacinados com a cepa 783, não detectou-se excreção de vírus após o desafio, sugerindo uma proteção efetiva quanto a infecção. Além disso, quando a vacinação com a cepa 783 foi repetida em suínos soronegativos, preveniu-se a transmissão do vírus de campo para suínos susceptíveis que foram mantidos em contato com os animais vacinados. Estes dados indicam que animais sem anticorpos maternos, que receberam doses duplas da cepa 783 tiveram indução de imunidade suficiente para prevenir excreção e conseqüente transmissão do vírus (DE JONG & KIMMAN, 1994). Recentemente, tem observado-se que a vacinação sistemática com a cepa 783 é capaz de reduzir a prevalência da infecção (STEGEMAN et al., 1992).

### CONCLUSÕES

A utilização de vacinas com marcadores antigênicos tem representado um avanço notável no controle e erradicação da doença de Aujeszky em diversos países europeus, Japão, Austrália e Estados Unidos. Da mesma forma, vacinas diferenciais contra o IBRV estão iniciando a ser utilizadas nos EUA e certamente vão ter a mesma utilização. No Brasil, vacinas inativadas têm sido utilizadas no controle dessas infecções: algumas vacinas para a doença de Aujeszky são produzidas no país e outras importadas, enquanto vacinas contra o IBRV são ainda importadas. A necessidade de vacinação, e conseqüentemente o uso da vacina mais apropriada, dependem fundamentalmente de uma avaliação da situação epidemiológica da enfermidade em questão. É entendimento dos autores, que a tendência natural do Brasil em um futuro próximo é a de seguir a estratégia que vem sendo utilizada com sucesso em diversos países, ou seja, o uso de vacinas vivas geneticamente manipuladas, com marcadores antigênicos. Nesse sentido, a possibilidade de diferenciar-se os animais vacinados dos infectados naturalmente representará um passo fundamental para o estabelecimento de programas de controle e erradicação dessas infecções no país.

### INFORMAÇÃO

a - Várias abreviações tem sido utilizadas para esses vírus: o herpesvírus suíno é abreviado HVS, PRV (pseudorabies vírus), VDA (Vírus da doença de Aujeszky) ou ADV (Aujeszky's Disease Virus). O herpesvírus bovino tipo 1 é chamado HVB-1, (bovine herpesvirus type 1) ou IBRV (infectious Bovine Rhinotracheitis Virus). Neste artigo, a nomenclatura IBRV e PRV foi utilizada.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACKERMANN, M., MULLER, H.K., BRUCKNER, L., et al. Eradication of infectious bovine rhinotracheitis in Switzerland: review and prospects. *Veterinary Microbiology*, v. 23, p. 365-370, 1990.
- ALICE, F.J., Isolamento do vírus da rinotraqueite infecciosa bovina (IBR), no Brasil. *Revista Brasileira Biologia*, v. 38, n. 4, p. 919-920, 1978.
- ANNELLI, J.K. Status of Aujeszky's disease (Pseudorabies) in the Americas. In: **OIE SYMPOSIUM**, 1994. Bangkok, Thailand. *Proceedings...* Bangkok, 1994, p. 71-75.
- BARTHA, A. Experiments to reduce the virulence of Aujeszky's virus. *Magyar Allatorvosok Lapja*, v. 16, p. 42-45, 1961.
- BAUER, A.G. Primeira constatação do mal de Aujeszky no Rio Grande do Sul. *Arquivo do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor*, Porto Alegre, v. 1, p. 15-16, 1955.
- BERNS, A., VAN DEN OUWELAND, A., QUINT, W., et al. Presence of markers for virulence in the unique short region or repeat region or both of pseudorabies hybrid viruses. *Journal of Virology*, v. 53, p. 89-93, 1985.
- BRYAN, L.A., FENTON, R.A., MISRA, V., et al. 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, p. 223-228, 1994.
- CARINI, A., MACIEL, J. La Pseudoragie ou paralysie bulbaire infectieuse au Bresil. *Bulletin de La Societe de Pathologie Exotique et de Ses Filiales*, v. 5, p. 576-578, 1912.
- CARNEIRO, V. Distribuição geográfica e frequência da doença de Aujeszky no Brasil. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v. 16, p. 49-58, 1950.
- CURTIS, R.A., ANGULO, A. A field trial to evaluate an intranasal infectious bovine rhinotracheitis virus vaccine. *Canadian Veterinary Journal*, v. 15, p. 327-330, 1974.
- DE JONG, M.C.M., KIMMAN, T.G. Experimental quantification of vaccine-induced reduction in virus transmission. *Vaccine*, v. 12, p. 761-766, 1994.
- DE WIND, N., WAGENAAR, F., POL, J., et al. The pseudorabies virus homolog of the herpes simplex virus UL21 gene product is a capsid protein which is involved in capsid maturation. *Journal of Virology*, v. 66, p. 7096-7103, 1992.
- FLORES, E.F., OSORIO, F.A., ZANELLA, E.L., et al. Efficacy of a deletion mutant bovine herpesvirus-1 (BHV-1) vaccine that allows serologic differentiation of vaccinated from naturally infected animals. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 5, p. 534-540, 1993.
- GALVÃO, C.L. Diagnóstico da infecção genital do herpesvírus 1 (HBV-1) pelos métodos de isolamento e imunofluorescência direta. 1984. 42 p. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária) - Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Minas Gerais, 1984.
- GIBBS, E. P. J., RWEYEMAMU, M. M. Bovine herpesviruses part I. Ovine herpesvirus type 1. *Veterinary Bulletin*, v. 47, p. 317-342, 1977.
- HARALAMBIEV, H. Immunogenicity studies of an inactivated IBR vaccine administered into the nasal mucosa. *Acta Veterinaria Academiae Scientiarum Hungaricae*, v. 26, p. 215-217, 1976.
- HIPOLITO, O., SILVA, J.M.L., BATISTA JUNIOR, J.A., et al. A Doença de Aujeszky em suínos no Estado de Minas Gerais. *Arquivos da Escola Superior de Veterinária*, Belo Horizonte, v. 13, p. 1-67, 1960.
- HRISTOV, S., KARADJOV, I. Study on the immunogenic properties of inactivated vaccines produced with the virus of the infectious bovine rhinotracheitis. *Veterinarno Meditsinski Nauki*, v. 13, p. 8-13, 1975.
- INABA, Y. Development of bovine infectious rhinotracheitis live virus vaccine. *Journal of Japanese Medical Association*, v. 28, p. 10-414, 1975.
- ISRAEL, B.A., HERBER, R., GAO, Y., et al. Induction of a mucosal barrier to bovine herpesvirus-1 replication in cattle. *Virology*, v. 188, p. 256-264, 1992.
- KAHRS R. F. Infectious bovine rhinotracheitis. In: **Viral diseases of cattle**. Iowa State University Press, 1981. 256 p.
- KATZ, J.B., HENDERSON, L.M., ERICKSON, G.A. Recombination *in vivo* of pseudorabies vaccine strains to produce new virus strains. *Vaccine*, v. 8, p. 286-287, 1990.
- KIMMAN, T.G., BINKHORST, G.J., VAN DEN INGH, T.S.G.A.M., et al. Aujeszky's disease in horses fulfils Koch's postulates. *Veterinary Record*, v. 128, p. 103-106, 1991.
- KIMMAN, T., DE WIND, N., OEI-LIE, N., et al. Contribution of single genes within the unique short region of Aujeszky's disease virus (Suid Herpesvirus Type 1) to virulence, pathogenesis and immunogenicity. *Journal of General Virology*, v. 73, p. 243-251, 1992.
- KIMMAN, T.G. Immunological protection against pseudorabies virus. In: **OIE SYMPOSIUM**, 1994. Bangkok, Thailand. *Proceedings...* Bangkok, p. 11-22, 1994.
- KIT, S., KIT, M., PIRTLE, C.C. Attenuated properties of thymidine kinase-negative deletion mutant of pseudorabies virus. *American Journal of Veterinary Research*, v. 46, p. 1359-1367, 1985a.
- KIT, S., QAVI, H., GAINES, J.D., et al. Thymidine kinase-negative bovine herpesvirus-1 mutant is stable and highly attenuated in calves. *Archives of Virology*, v. 86, p. 63-83, 1985b.
- KIT, S., SHEPPARD, M., ICHIMURA, H. et al. Second generation of pseudorabies virus vaccine with deletions in thymidine kinase and glycoprotein genes. *American Journal of Veterinary Research*, v. 48, p. 780-793, 1987.
- KIT, S. Genetically engineered pseudorabies and infectious bovine rhinotracheitis virus vaccines. *Technology and Advances in Vaccine Development*, v. 2, p. 183-195, 1988.
- KIT, S., KIT, M. Gene deleted IBRV marker vaccine. *Veterinary Record*, v. 14, p. 363-364, 1990.
- KIT, S., KIT, M. Genetically engineered herpesvirus vaccines. *Progress in Medical Virology*, v. 38, p. 128-166, 1991.
- KIT, S., OTSUKA, H., KIT, M. Blocking ELISA for distinguishing IBRV-infected animals from those vaccinated with a gene-deleted modified-live



- IBRV gIII-deleted marker vaccine. *Journal of Virological Methods*, v. 40, p. 45-56, 1992.
- KLUPP, B., KERN, H., METTENLEITER, T.C. The virulence-determining genomic Bam HI fragment 4 of pseudorabies virus contains genes corresponding to the UL15 (partial), UL18, UL19, UL20, and UL21 genes of herpes simplex virus and a putative origin of replication. *Virology*, v. 191, p. 900-908, 1992.
- KOTAIT, I., QUEIROZ, L.H., BERSANO, J.G., et al. Sorologia e pesquisa de vírus em amígdala de suínos sadios de uma propriedade com foco da doença de Aujeszky em ovinos. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v. 50, p. 143-147, 1984.
- KOTAIT, I., CUNHA, E.M.S., QUEIROZ, L.H., et al. Doença de Aujeszky no Estado de São Paulo: inquérito sorológico em plantéis de reprodutores suínos realizado no período de 1982-1986. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v. 53, p. 71-73, 1986a.
- KOTAIT, I., PEIXOTO, Z.M.P., CUNHA, E.M.S., et al. Focos da doença de Aujeszky no Estado de São Paulo no período de 1982-1986. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 53, p. 65-70, 1986b.
- KRITAS, S.K., PENSAERT, M., METTENLEITER, T.C. Invasion and spread of single deleted mutants of Aujeszky's disease virus (ADV) in the trigeminal nervous pathway of pigs after intranasal inoculation. *Veterinary Microbiology*, v. 40, p. 323-334, 1994.
- LEVINGS, R.L., KAEBERLE, M.L., REED, D.E. The effect of some common inactivation procedures on the antigens of bovine herpesvirus-1. *Veterinary Microbiology*, v. 9, p. 313-328, 1984.
- LIANG, X., BABIUK, L. A., ZAMB, T. J. An *in vivo* study of a glycoprotein gIII-negative bovine herpesvirus 1 (BHV-1) mutant expressing galactosidase: evaluation of the role of gIII in virus infectivity and its use as a vector for mucosal immunization. *Virology*, v. 189, p. 629-639, 1992.
- LIANG, X., TANG, M., MANNS, B., et al. Identification and deletion mutagenesis of the bovine herpesvirus-1 dUTPase gene and a gene homologous to herpes simplex UL49.5. *Virology*, v. 195, p. 42-50, 1993.
- LOMNICZI, B., WATANABE, S., BEN-PORAT, T., et al. Genetic basis of the neurovirulence of the pseudorabies virus. *Journal of Virology*, v. 52, p. 198-205, 1984.
- LOMNICZI, B., WATANABE, S., BEN-PORAT, T., et al. Genome location and identification of functions defective in the bartha vaccine strain of the pseudorabies virus. *Journal of Virology*, v. 61, p. 796-801, 1987.
- LOVATO, L.T., WEIBLEN, R., RABUSKE, M., et al. Herpesvírus bovino tipo 1: isolamento de casos de vulvaginite, *Semina*. v. 16, n. 1, p. 1995. (No prelo).
- MARCHIOLI, C.C., YANCEY, R.J., WARDLEY, R.C., et al. A vaccine strain of pseudorabies virus with deletions in the thymidine kinase and glycoprotein X genes. *American Journal of Veterinary Research*, v. 48, p. 1577-1583, 1987.
- MCMILLEN, J. A. New generation in pseudorabies vaccination and control. In: *INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE ERADICATION OF PSEUDORABIES VIRUS*, 1991. St. Paul. University of Minnesota, St Paul, 1991, p. 271-272.
- MENGELING, W.K. Virus reactivation in pigs latently infected with a thymidine kinase negative strain of pseudorabies virus. *Archives of Virology*, v. 120, p. 57-70, 1991.
- METTENLEITER, T.C., LUKACS, N. AND RZIHA, H.J. Pseudorabies virus avirulent strains fail to express a major glycoprotein. *Journal of Virology*, v. 56, p. 307-311, 1985.
- METTENLEITER, T.C., LOMNICZI, B., SUGG, N., et al. Host cell-specific growth advantage of pseudorabies virus with a deletion in the genome sequences encoding a structural glycoprotein. *Journal of Virology*, v. 62, p. 12-19, 1988.
- METTENLEITER, T.C. Pseudorabies (Aujeszky's Disease) virus. a brief introduction. In: *OIE SYMPOSIUM*, 1994. Bangkok, Thailand. *Proceedings...* Bangkok, 1994, p. 1-9.
- MOORMANN, R.J.M., DE ROVER, T., BRIARE, J., et al. Inactivation of the thymidine kinase gene of a gI deletion mutant of pseudorabies virus generates a safe but still highly immunogenic vaccine strain. *Journal of General Virology*, v. 71, p. 1591-1595, 1990.
- MOREIRA, C.R.C., NILSSON, M.R., LANDIM, Z.M.P., et al. Ocorrência simultânea da doença de Aujeszky em cão e suíno no município de Pirassununga, Estado de São Paulo. In: *CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINARIA*, 1972. Brasília, *Anais...* Brasília, 1972, p. 276.
- MUELLER, B.K., IKUNO, A.A., CAMPOS, M.T.G.R., et al. Isolamento e identificação do vírus da rinotraqueíte infecciosa dos bovinos de um rim de feto de bovino (IBR/IPV). *Arquivo Instituto Biologia São Paulo*. v. 45, n. 3, p. 187-190, 1978.
- MUELLER, B.K., IKUNO, A.A., MACHADO, J.S., et al. Prevalência de anticorpos contra o vírus da rinotraqueíte infecciosa/vulvovaginite pustular infecciosa (IBRV/IPV) em bovinos do Estado de São Paulo. *Arquivo Instituto Biologia São Paulo*, v. 47, n. 2, p. 55-59, 1981.
- NAUWYNCK, H.J., PENSAERT, M.B. Programmes for the eradication of Aujeszky's disease virus (Pseudorabies Virus) in the member states of the European Union. In: *OIE SYMPOSIUM*, 1994. Bangkok, Thailand. *Proceedings...* Bangkok, 1994, p. 55-66.
- NETTLETON, P.F., SHARP, J.M., HERRING, A.J. Infectious bovine rhinotracheitis virus after vaccination, challenge, and immunosuppression. In: WHITTMAN, G., GASKILL, R.M., RHIZA, H.J. (eds) *Latent herpesvirus infections in veterinary medicine*. Boston: Martinus Nijhoff, 1984. p. 191-209.
- NOGUEIRA, F.R.C., CAMARGO, A.J.R., RESEN, O.A., et al. Ocorrência de rinotraqueíte infecciosa/vulvo-vaginite pustular infecciosa em bovinos no estado do Rio de Janeiro. *PESAGRO.RIO (Comunicado Técnico)*, v. 86, n. 167, p. 1-5, 1986.
- PENSAERT, M.B., KLUGE, J.P. Pseudorabies virus (Aujeszky's Disease). In: M.B. PENSAERT (Editor) *Virus Infections of Porcines*. Amsterdam: Elsevier Science. v. 3, p. 39-64, 1989.
- PENSAERT, M.B., DE SMET, K., DE WAELE, K. Extent and duration of virulent virus excretion upon challenge of pigs vaccinated with different glycoprotein deleted Aujeszky's disease vaccines. *Veterinary Microbiology*, v. 22, p. 1-11, 1990.
- QUINT, W.G.V., GIELKENS, A.L.J., VAN OIRSCHOT, J.T. et al. Construction and characterization of deletion mutants of pseudorabies virus: A new generation of "Live" vaccines. *Journal of General Virology*, v. 68, p. 523-534, 1987.

- RIET-CORREA, F.R., VIDOR, T., SCHILD, A.L., et al. Meningoencefalite e necrose do córtex cerebral em bovinos causadas por herpes vírus bovino-1. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 9, n. 1-2, p.13-16, 1989.
- RISJEWIJK, F. A. M., RUULS, R., VAN OIRSCHOT, J.T. Virulence and immunogenicity of bovineherpesvírus 1(BHV-1) mutants with a deletion in the gC, gE, gG or gI gene. In: ANN MEETING CRWAD, 1994. Chicago, IL. *Proceedings...* p. 185.
- ROBERTS, S.L. *Veterinary obstetrics and genital diseases*, 2.ed. Ithaca, NY, Roberts, 1971. 156 p.
- ROCK, D. Latent infections with bovine herpesvirus type-1. *Seminars in Virology*, v. 5, p. 233-240, 1994.
- ROIZMAN, B. Herpesviridae: a brief introduction. In: FIELDS, B.N. et al. *Fundamental Virology*. 2ed. New York: Raven Press, 1990, p. 841-848.
- ROMERO, C.H. ROWE, C.A., PROVENZANO, G.I., et al. Distribuição e prevalência de anticorpos precipitantes para o vírus da doença de Aujeszky em plantéis de suínos no Estado de Santa Catarina. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Rio de Janeiro, v. 4, p. 123-127, 1984.
- ROMERO, C.H., ROWE, C.A., FLORES, R.S., et al. Erradicação do vírus da doença de Aujeszky de plantéis de reprodutores suínos através da testagem e eliminação de suínos com anticorpos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Rio de Janeiro, v. 6, p. 1-4, 1986.
- SCHIPPER, I.A., KELLING, C.L. Evaluation of inactivated infectious bovine rhinotracheitis vaccines. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, v. 39, p. 402-405, 1975.
- SCHOENBAUM, M.A. Pseudorabies virus latency and reactivation in vaccinated swine. *American Journal of Veterinary Research*, v. 51, p. 334-338, 1990.
- SHEFFY, B.E., RODMANN, S. Reactivation of latent infectious bovine rhinotracheitis virus infection. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 163, p. 850-851, 1973.
- SILVA, R.A. DOBEREINER, J. Nota sobre a Doença de Aujeszky no município de Sapucaia. *Arquivos do Instituto Biológico Animal*, v. 3, p. 83-90, 1960.
- SILVA, R.A., GIOVINI, N. Novos focos da doença de Aujeszky no Estado de Minas Gerais. I. Estudo do foco no município de Almenara. *Arquivo do Instituto Biológico Animal*, v. 4, p. 99-104, 1961.
- SPEAR, P.G. Entry of alphaherpesvíruses into cells. *Seminars in Virology*, v. 4, p. 167-180, 1993.
- STEGEMAN, J.A., HUNNEMAN, W.A., KIMMAN, T.G., et al. Attempts to reduce the spread of Aujeszky's disease (Pseudorabies) virus by intensive vaccination in area with high pig density. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE ERADICATION OF PSEUDORABIES VÍRUS, 1992. St.Paul, Minesotta. *Proceedings...* St Paul, 1992, p. 175-179.
- SUAREZ-HEILEIN, A.S., METZLER, A.E., WEBLEN, R., et al. Molecular characterization of South American bovine herpesvirus-1 isolates with monoclonal antibodies and SDS-PAGE. *Journal Veterinary Medicine*. v. 40, p. 125-130, 1993.
- SUHACI, I., URSBACHE, R., TOMESCU, V. Cultivation of virus of the Aujeszky's disease in chick embryos. *Studii Si Cercetari De Infra-microbiologie*, v. 7, p. 111-117, 1956.
- TATAROV, G. Apathogener mutants des Aujeszky-vírus, induziert von 5-Jodo-2-Deoxyuridin (JUDR). *Zentralblatt Fur Veterinarmedizin Reihe B*, v. 15, p. 847-853, 1968.
- TAYLOR, T.J. *Aujeszky's Disease (Pseudorabies). Pig Diseases*. 5<sup>th</sup> Ed. The Burlington Press, 1989. p. 44-52.
- TODD, J.D., VOLENEC, F.J., PATON, I.M. Intranasal vaccination against infectious bovine rhinotracheitis: studies on early onset of protection and use of the vaccine in pregnant cows. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 159, p. 1370-1374, 1971.
- TODD, J.D. Development of intranasal vaccination for the immunization of cattle against infectious bovine rhinotracheitis. *Canadian Veterinary Journal*, v. 15, p. 257-259, 1974.
- VAN DRUNEN LITTEL-VAN DER HURK, S., HURK, V., BABIUK, L.A. Synthesis and processing of bovine herpesvirus 1 glycoproteins. *Journal of Virology*, v. 59, p. 401-410, 1986.
- VAN DRUNEN LITTEL-VAN DER HURK, S., GIFFORD, G.A., AND BABIUK, L.A. Epitope specificity of the protective immune response induced by individual bovine herpesvírus-1 glycoproteins. *Vaccine*, v. 11, p. 358-367, 1990.
- VAN DRUNEN LITTEL-VAN DER HURK, S., PARKER, M.D. MASSIE, B., et al. Protection of cattle from BHV-1 infection by immunization with recombinant glycoprotein gIV vaccine. *Vaccine*, v. 11, p. 25-35, 1992.
- VAN DRUNEN LITTEL-VAN DER HURK, S., TIKOO, S.K., LIANG, X., et al. Bovine herpesvirus-1 vaccines. *Immunology and Cell Biology*, v. 71, p. 405-420, 1993.
- VAN ENGELBURG, F.A., KAASHOEK, M.J., RISJEWIJK, F.A., et al. A glycoprotein E deletion mutant of bovine herpesvirus 1 is avirulent in calves. *Journal of General Virology*, v. 75, p. 2311-2318, 1994.
- VANNIER, P., HUTET, E., BOURGEUIL, E., et al. Level of virulent vírus excreted by infected pigs previously vaccinated with different glycoprotein-deleted Aujeszky's disease vaccine. *Veterinary Microbiology*, v. 29, p. 213-223, 1991.
- VAN OIRSCHOT, J.T., GIELKENS, A.L.J., MOORMANN, R.J.H., et al. Marker vaccines, virus proteinspecific, antibody assays and the control of Aujeszky's disease. *Veterinary Microbiology*, v. 23, p. 85-101, 1990.
- VAN OIRSCHOT, J.T. Why pseudorabies is a candidate for eradication. In: FIRST INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE ERADICATION OF PSEUDORABIES (AUJESZKY'S) VIRUS, 1991. St. Paul, Minnesota. *Proceedings...* St. Paul, 1991, p. 85.
- VAN OIRSCHOT, J.T., MOORMANN, R.J.M., BERNS, A.J.M. Efficacy of a pseudorabies virusvaccine based on deletion mutant strain 783 that does not express thymidine kinase and glycoprotein I. *American Journal of Veterinary Research*, v. 52, p. 1056-1060, 1991.
- VISSER, N., LUTTICKEN, D. Experiences with a gI/TK-modified live pseudorabies virus vaccine: strain begonia. In: VAN OIRSCHOT, J.T. (Editor) *CEC Seminar on Vaccination and Control of Aujeszky's Disease*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1989. p. 37-44.
- WEIBLEN, R., LOMBARDO DE BARROS, C.S., CANABARRO, T.F., et al. Bovine meningoencephalitis from IBR virus. *Veterinary Record*. v. 124, n. 24, p. 666-667, 1989.

WEIBLEN, R., KREUTZ, L.C., CANABARRO, T.F., et al. Balanoposthitis in bulls due to bovine herpesvirus in South Brazil. **Brazilian Journal Medicine Biological Research**, v. 24, n. 8, p. 1-3, 1991.

WHEELER, J.G., FLORES, E.F., KIT, S., et al. Quantitative study of the efficacy of a deletion mutant BHV-1 differential vaccine in preventing the establishment of latency. In: ANN MEETING OF CRWAD, 1994. Chicago, Il. **Proceedings...** p. 84.

ZUSCHEK, F., CHOW, T.L. Immunogenicity of infectious bovine rhinotracheitis vaccines. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 139, p. 236-237, 1961.

ZYGRAICH, N., LOBMANN, M., VASCOBOINIC, E., et al. **In vivo** and **in vitro** properties of a temperature-sensitive mutant of infectious bovine rhinotracheitis virus. **Research in Veterinary Science**, v. 16, p. 328-335, 1974.