

T686.089 69

R 396d

2002

Simone Alencar Renault



**DESENVOLVIMENTO DE VACINAS INATIVADAS CONTRA A RINOTRAQUEÍTE
INFECCIOSA BOVINA E A DIARRÉIA BOVINA A VÍRUS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola da Veterinária, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária.

Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientadora: Profa. Dra. Zélia Inês Portela Lobato

Belo Horizonte
UFMG – Escola de Veterinária
2002

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA

19/03/03

110503-05

0345-89260

R396d Renault, Simone Alencar, 1977-
2002 Desenvolvimento de vacinas inativadas contra rinotraqueíte
infecciosa bovina e a diarreia bovina a vírus / Simone Alencar
Renault. -Belo Horizonte: UFMG-Escola de Veterinária, 2002.

53p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais,
Escola de Veterinária

1.Bovino – Doenças – Teses. 2.Rinotraqueíte infecciosa Bovina-
Vacinas – Teses. 3. Diarreia em animais – Vacinas – Teses. I. Título.

CDD – 636.208 969

Dissertação defendida e aprovada em 16 de julho de 2002, pela comissão examinadora constituída por:



Profª. Zélia Inês Portela Lobato

Orientador



Rômulo Cerqueira Leite



Francisco Carlos Faria Lobato



Isabella Bias Fortes



Armando Silva Cunha Júnior

*Aos meus pais, pelo que sou hoje e por
me ensinarem o valor real das coisas,
aos meus irmãos pela força e amor.
Com amor, dedico.*

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Zélia Inês Portela Lobato pelo exemplo, orientação, confiança e amizade.

Ao Professor Armando Silva Cunha pela importante participação.

Aos Professores Andrey Pereira Lage e Francisco Carlos Faria Lobato pelo incentivo, amizade e pela enorme ajuda.

Ao Laboratório HERTAPE pela confiança e incentivo especialmente ao tio Ricardo, Prof. Arinos, Paulo Paixão e Rita.

Aos Professores. Israel José da Silva e Walter Motta Ferreira pela ajuda com os coelhos.

Ao Professor Ivan Barbosa Machado Sampaio pela ajuda na estatística.

Aos meus colegas Beth, Clara, Felipe, Marcelo, Eros, Bruno, Leandro, Paula, Cristiane, Telma, Carol, Karina, Paulo Emilio, Ricardo, Cristiano, Aiesca, Josely, Cid, Antônio, Lili, Ronnie, Guilherme, Flávia e Paulo pela amizade, apoio e pelas boas risadas.

As colegas e grandes amigas Luciana e Giovanna pela ajuda, carinho e companheirismo.

Aos alunos dos Laboratórios de Farmacotécnica e Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da UFMG, em especial à Silvia e Raquel.

Aos funcionários do DMVP em especial à Doris, Creuza, Jorge, Ângela, Renata, Luciana e Toninho.

Aos funcionários da biblioteca pela ajuda prestada.

Ao Nelson e Eduardo pela colaboração, amizade e boa vontade.

A Nádia pela enorme ajuda, paciência e amizade.

Aos funcionários do Colegiado de Pós Graduação.

Aos funcionários da Fazenda Prof. Helio Barbosa, em especial ao Sr Antônio.

Aos meus pais pelo exemplo, incentivo, compreensão e apoio incondicional.

Aos meus irmãos, Léo e Julinha, pela amizade.

Às minhas amigas Isabela, Roberta, Flávia, Luciana, Érika, Vivian, Kika, Ro e Dani.

Ao Paulinho pela paciência e disponibilidade.

À FAPEMIG / FIEMG / IEL, FEP/MVP e Laboratório HERTAPE pelo apoio financeiro.

Ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e à Escola de Veterinária.

*"Nossas dúvidas são traidoras e nos fazem perder o que,
com freqüência, poderíamos ganhar, por simples medo de arriscar."
William Shakespeare*

*"Nunca ore suplicando cargas mais leves e sim, ombros mais fortes."
Philips Brooks*

SUMÁRIO

	ABREVIATURAS.....	13
	RESUMO.....	15
	ABSTRACT.....	15
1	INTRODUÇÃO.....	17
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1	Rinotraqueíte Infecciosa Bovina.....	17
2.2	Diarréia Viral Bovina.....	18
2.3	Adjuvantes.....	19
2.4	Vacinas contra a RIB e DBV.....	20
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1.	Preparo da semente.....	23
3.1.1.	Amostras dos vírus.....	23
3.1.2.	Células.....	23
3.1.3.	Inativação viral.....	23
3.1.3.1.	Prova de inativação.....	24
3.2.	Adjuvante de Emulsão Múltipla.....	24
3.2.1.	Teste de análise de condutividade.....	24
3.2.2.	Teste de microscopia óptica.....	24
3.2.3.	Testes de inocuidade.....	24
3.2.3.	Teste de estabilidade.....	25
3.3.	Vacinas.....	25
3.3.1.	Elaboração da vacinas com Hidróxido de Alumínio.....	25
3.3.2.	Elaboração das vacinas com Emulsigen®.....	26
3.3.3.	Testes de estabilidade.....	26
3.4.	Testes de esterilidade.....	26
3.5.	Testes de potência.....	26
3.5.1.	Testes de potência em coelhos.....	26
3.5.1.1.	Teste de Soroneutralização.....	27
3.5.1.2.	Análise macroscópica de lesões.....	27
3.5.1.3.	Análise Estatística.....	27
3.5.2.	Testes de potência em bovinos.....	27
3.5.2.1.	Teste de Soroneutralização.....	28
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
4.1.	Preparo da semente.....	28
4.2.	Adjuvante de Emulsão Múltipla.....	28
4.2.1.	Testes de esterilidade e inocuidade.....	33
4.3.	Vacinas elaboradas.....	33
4.3.1.	Vacinas I e III.....	33
4.3.2.	Vacinas II e IV.....	34
4.4.	Testes de potência.....	34
4.4.1.	Testes de potência em coelhos.....	34
4.4.1.1.	Análise macroscópica de lesões.....	34
4.4.1.2.	Resposta sorológica dos coelhos à vacinação.....	37
4.4.2.	Testes de potência em bovinos.....	43
5	CONCLUSÕES.....	48
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Detalhes das técnicas empregadas por vários autores para produção de vacinas contra a Diarréia Bovina a Vírus e os resultados obtidos com a utilização destas vacinas.....	21
Tabela 2	Detalhes das técnicas empregadas por vários autores para produção de vacinas contra a Rinotraqueíte Infecciosa Bovina e os resultados obtidos com a utilização destas vacinas.....	22
Tabela 3	Cronograma de sangrias e vacinações realizados com os coelhos.....	27
Tabela 4	Cronograma de sangrias e vacinações realizados com os bovinos.....	28
Tabela 5	Detalhes de algumas das formulações desenvolvidas em que não foi observada a formação de Emulsão Primária.....	30
Tabela 6	Detalhes de algumas das formulações desenvolvidas em que foi observada a formação de Emulsão Primária.....	31
Tabela 7	Índice de adsorção das partículas virais de DBV e RIB utilizadas no preparo das vacinas I e III ao gel de hidróxido de alumínio.....	33
Tabela 8	Títulos individuais e medianas dos títulos de anticorpos contra a Diarréia Bovina a Vírus, obtidos na primeira, segunda, terceira e quarta sorologias, em coelhos vacinados e revacinados com as vacinas testadas.....	37
Tabela 9	Títulos individuais e medianas dos títulos de anticorpos contra a Rinotraqueíte Infecciosa Bovina, obtidos na primeira, segunda, terceira e quarta sorologias, em coelhos vacinados e revacinados com as vacinas testadas.....	38
Tabela 10	Títulos individuais e medianas dos títulos de anticorpos contra a Rinotraqueíte Infecciosa Bovina, obtidos na primeira, segunda e terceira sorologias, em bovinos vacinados e revacinados com a vacina II.....	44
Tabela 11	Títulos individuais e medianas dos títulos de anticorpos contra a Diarréia Bovina a Vírus, obtidos na primeira, segunda e terceira sorologias, em bovinos vacinados e revacinados com a vacina II.....	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Esquema representativo de uma Emulsão Múltipla Água/Óleo/Água.....	20
Figura 2	Composição antigênica e de adjuvantes das vacinas utilizadas durante os testes.....	25
Figura 3	Médias de temperatura e espessura da pele dos coelhos inoculados com o adjuvante de Emulsão Múltipla por via intradérmica e subcutânea, observadas durante sete dias.....	33
Figura 4	Lesões na pele de coelhos após duas inoculações subcutâneas das vacinas testadas.....	35
Figura 5	Medianas dos títulos de anticorpos contra a Diarréia Bovina a Vírus e a Rinotraqueíte Infecciosa Bovina, obtidas a partir da primeira sorologia dos coelhos (dia 14), após a vacinação com as vacinas testadas.....	39
Figura 6	Medianas dos títulos de anticorpos contra a Diarréia Bovina a Vírus e a Rinotraqueíte Infecciosa Bovina, obtidas a partir da segunda sorologia dos coelhos (dia 28), após a vacinação com as vacinas testadas.....	40
Figura 7	Medianas dos títulos de anticorpos contra a Diarréia Bovina a Vírus e a Rinotraqueíte Infecciosa Bovina, obtidas a partir da terceira sorologia dos coelhos (dia 42), após a vacinação com as vacinas testadas.....	40
Figura 8	Medianas dos títulos de anticorpos contra a Diarréia Bovina a Vírus e a Rinotraqueíte Infecciosa Bovina, obtidas a partir da quarta sorologia dos coelhos (dia 56), após a vacinação com as vacinas testadas.....	41
Figura 9	Perfil de produção de anticorpos contra a Diarréia Bovina a Vírus e a Rinotraqueíte Infecciosa Bovina em coelhos vacinados com as vacinas testadas.....	43
Figura 10	Títulos de anticorpos individuais e medianas dos títulos de anticorpos contra a Rinotraqueíte Infecciosa Bovina, obtidos na primeira, segunda e terceira sorologias, em bovinos vacinados e revacinados com a vacina II.....	45

ABREVIATURAS

Al(OH)₃: Hidróxido de Alumínio
A/O/A: Água/Óleo/Água
BRSV: Vírus Respiratório Sincicial Bovino
BoHV-1: Bovine Herpesvírus 1
BT: Bovine Turbinate
DBV: Diarréia Bovina a Vírus
EM: Emulsão Múltipla
EP: Emulsão Primária
IFN-γ: Interferon gama
IgE: Imunoglobulina E
IgG: Imunoglobulina G
IL-5: Interleucina 5
IL-12: Interleucina 12
IL-14: Interleucina 14
MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MDBK: Madin Darby Bovine Kidney
MEM: Minimal Essential Medium
O/A: Óleo/Água
PI-3: Parainfluenza 3
RIB: Rinotraqueíte Infecciosa Bovina
SFB: Soro Fetal Bovino
VDBV: Vírus da Diarréia Bovina a Vírus

RESUMO

Foram desenvolvidas duas vacinas inativadas combinadas contra a Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (RIB) e a Diarréia Bovina a Vírus (DBV) e duas monovalentes contra a RIB utilizando como adjuvantes, o hidróxido de alumínio e uma emulsão óleo/água (Emulsigen® - MVP Laboratories) com as mesmas concentrações de antígenos. Desenvolveu-se um adjuvante de Emulsão Múltipla Água/Óleo/Água (EM - A/O/A) para utilização em vacinas inativadas contra estes vírus. As EM estáveis tiveram sua estrutura desestabilizada a medida que os componentes das vacinas foram acrescentados. Cada uma das vacinas teve sua potência testada pelo teste da Soroneutralização a partir da vacinação de cinco coelhos. Os resultados obtidos foram comparados aos de coelhos vacinados com duas vacinas polivalentes comercialmente disponíveis no Brasil. Não foi observada diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) entre as vacinas, no que diz respeito ao adjuvante utilizado. A vacina combinada com Emulsigen® como adjuvante foi testada em bovinos segundo as normas do "Code of Federal Regulation" e induziu níveis de anticorpos suficientes para proteção dos bovinos de acordo com as normas e com dados obtidos na literatura.

Palavras chave: Rinotraqueíte Infecciosa Bovina, Diarréia Bovina a Vírus, vacinas

ABSTRACT

Two combined inactivated vaccines were developed against Infectious Bovine Rinotracheitis (IBR) and Bovine Viral Diarrhea (BVD) and two monovalents against IBR, using as adjuvants Alum Hydroxide and an oil/water emulsion (Emulsigen® - MVP Laboratories) with the same concentrations of antigen. An adjuvant of Multiple Emulsion Water/Oil/Water (ME - W/O/W) was developed to be used in inactivated vaccines against these virus. The stable ME had their structure disestablished as the components of the vaccine was added. Each vaccine had their potency tested by serumneutralization test from the vaccination of five rabbits. The results obtained were compared to the ones from rabbits vaccinated with two commercial polyvalent vaccines used in Brazil. No significant statistical differences ($p \leq 0,05$) were observed between the vaccines, what concerns to the adjuvant used. The combined vaccine with Emulsigen® as adjuvant was tested in cattle according to Code of federal Regulations and induced sufficient levels of antibodies for protection of cattle according to the rules and data from literature.

Key words: Infectious Bovine Rinotracheitis, Bovine Viral Diarrhea, vaccines

1. INTRODUÇÃO

O Vírus da Diarréia Viral Bovina (VDVB) e o Vírus da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (RIB) estão amplamente distribuídos no Brasil levando a sérios prejuízos reprodutivos, com grandes perdas econômicas.

Em alguns países onde a prevalência de animais soropositivos para estes dois vírus é baixa, foram adotadas estratégias regionais ou nacionais de erradicação. A situação epidemiológica no Brasil entretanto, inviabiliza a adoção de políticas de erradicação destas doenças e a vacinação ainda é a melhor estratégia de controle dessas enfermidades no sentido de minimizar a sintomatologia clínica, diminuir o número de animais susceptíveis e a disseminação do vírus dentro dos rebanhos. As vacinas inativadas são tidas como mais seguras que as vacinas vivas, principalmente para animais gestantes ou imunocomprometidos. Entretanto, existem falhas na proteção conferida pelos microrganismos inativados em relação às infecções virais, principalmente pela pouca estimulação de resposta imunológica celular. Faz-se necessária a adição de adjuvantes aos microrganismos inativados para que a resposta imune seja potencializada. Alguns adjuvantes têm a capacidade de estimular a resposta imunológica por mais tempo, o que diminui os gastos com a revacinação, e diminui a ocorrência de lesões no local de injeção.

No mercado brasileiro estão disponíveis onze vacinas para o controle dessas enfermidades, sendo que nove apresentam os dois vírus em suas formulações e uma delas apresenta apenas o vírus da RIB. A grande maioria é composta por microrganismos inativados, sendo o hidróxido de alumínio e as emulsões oleosas simples os adjuvantes utilizados.

A necessidade de novas tecnologias no sentido de desenvolver e testar adjuvantes para utilização em vacinas veterinárias, e novas vacinas inativadas contra os vírus da DBV e RIB, que confirmam uma imunidade mais duradoura, com maior eficiência

protetora e diminuindo as lesões causadas pelos adjuvantes, motivaram a realização deste trabalho, que teve por objetivos:

- 1) desenvolver e testar uma vacina inativada monovalente contra a RIB e uma bivalente contra a DBV e RIB, utilizando o hidróxido de alumínio como adjuvante;
- 2) desenvolver e testar uma vacina inativada monovalente contra a RIB e uma bivalente contra a DBV e RIB, utilizando uma emulsão simples O/A (óleo/água) (Emulsigen® - MVP Laboratories) como adjuvante;
- 3) desenvolver e testar uma vacina inativada monovalente contra a RIB e uma bivalente contra a DBV e RIB, utilizando um adjuvante de Emulsão Múltipla;
- 4) avaliar macroscopicamente as lesões causadas pela inoculação destes adjuvantes na pele e carcaça de coelhos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Rinotraqueíte Infecciosa Bovina

O Herpesvírus Bovino tipo 1 (BoHV-1), agente etiológico da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (RIB), é um vírus DNA de fita dupla, pertencente a família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*, gênero *Varicellovirus* (ICTV, 2002). O vírus possui envelope tendo cerca de 150 μ m de diâmetro e capsídeo icosaédrico com 162 capsômeros. Replica-se no núcleo da célula e adquire o envelope quando brota da membrana celular (Rodas et al, 1996).

A RIB é uma doença herpética dos bovinos, conhecida principalmente como enfermidade do trato respiratório e reprodutivo. Existe uma variação muito grande dos sinais clínicos associados a infecções pelo BoHV-1, como doenças respiratórias, conjuntivite, balanopostite (Studdert et al, 1964), vulvovaginite (Kendrich et al, 1958) e alterações reprodutivas (Lukas et al, 1963). Animais de todas as idades são suscetíveis, no entanto, a enfermidade é encontrada com maior frequência em bovinos acima de seis meses (Mello, 1998). A enfermidade é de fácil transmissão e tem distribuição mundial,

tendo sido descrita pela primeira vez nos Estados Unidos por Miller, em 1955.

Animais infectados com o BoHV-1, incluindo aqueles com infecções inaparentes, tornam-se portadores permanentes, visto que uma das características desta família é a indução ao estado de latência em algumas células do organismo (Ackermann, 1982; Fenner et al, 1987; Rodas et al, 1996). Sob certas condições de estresse ou tratamento com corticoesteróides, o vírus pode migrar, através das fibras nervosas, à periferia, onde se multiplica e é excretado (Rodas et al, 1996). Animais com infecções latentes com recrudescência periódica são, provavelmente, a principal fonte de infecção do vírus (Fenner et al, 1987).

No Brasil, a RIB está amplamente distribuída, causando prejuízos relacionados principalmente a perdas reprodutivas. O primeiro relato do BoHV-1 no Brasil foi feito por Galvão et al, em 1963, na Bahia que, através de um levantamento sorológico feito em animais adultos, revelou uma positividade de 35%. Em 1978, Alice realizou, também na Bahia, o primeiro isolamento do vírus no país, através do exame de raspados de pústulas vaginais de vacas. A frequência de animais e rebanhos soropositivos indicam que, no Brasil, a infecção pelo BoHV1 apresenta caráter endêmico, tanto em plantéis destinados a produção de leite quanto de carne. Levantamentos sorológicos vêm sendo realizados em todo o país e têm demonstrado uma frequência alta de rebanhos e animais soropositivos com índices que variam de 10,7 a 91% (Galvão et al, 1963; Wizigmann et al, 1972; Mueller et al, 1979; Mueller et al, 1981; Ravazollo et al, 1989; Lage et al, 1996; Melo, 1998).

A situação epidemiológica no Brasil inviabiliza a curto prazo, a adoção de uma política regional ou nacional de erradicação que consiste, principalmente, na identificação, eliminação e na não introdução de animais soropositivos no rebanho. Esta estratégia vem sendo adotada em alguns países como Alemanha, Áustria e Suíça onde a frequência de animais e rebanhos soropositivos é baixa

além da população de bovinos ser relativamente pequena e o movimento de animais poder ser monitorado (Jones et al, 2000; Leite, 1999; Alfieri, AT 46).

Em rebanhos onde a prevalência é desconhecida ou alta, como é o caso do Brasil, a recomendação é vacinar novilhas após os seis meses de idade e revaciná-las antes da cobertura ou aos 18 meses. Essa vacinação não confere imunidade total e duradoura, mas minimiza a sintomatologia clínica evitando prejuízos (Leite, 1999).

2.2. Diarréia Bovina a Vírus

O Vírus da Diarréia Viral Bovina (VDBV), agente etiológico da Diarréia Viral Bovina (DBV), é um vírus RNA, pertencente a família *Flaviviridae*, gênero *Pestivirus* (ICTV, 2002). Existem dois biotipos do vírus na natureza que diferem na capacidade ou não de induzir efeito citopático em monocamadas de células, respectivamente amostras citopatogênicas e não citopatogênicas (Deregt, 1995). A virulência viral é dependente do biotipo, das variações existentes entre as cepas e da via de exposição do animal (Bolin, 1995).

Os *Pestivirus* foram demonstrados como estando associados a perdas reprodutivas significantes, incluindo falhas de fertilização, morte embrionária e abortos (Dubovi, 1994; McGowan, 1995). A transmissão pode dar-se de duas formas: infecção pós-natal (aguda) e infecção fetal precoce com o biotipo não citopatogênico do vírus que, dependendo do estágio da gestação, leva ao nascimento de animais persistentemente infectados (PI) (Larsson et al, 1994). É nestes animais que, após uma nova infecção com uma amostra citopatogênica antígenicamente homóloga, se desenvolverá doença das mucosas (MD) (Backer, 1995; Bielenfeldt-Ohmann, 1995). Animais PI são a principal fonte de manutenção do vírus nos plantéis, pois eles disseminam constantemente o vírus para o ambiente (Bitch & Ronsholt, 1995; Houe, 1995; Houe, 1999; Leite, 1999; Oirschot, 1999). Segundo Barbosa (1999), estudos realizados em diversos países demonstraram uma prevalência de 0,5-2,0%

de animais PI e 60-85% de animais soropositivos em vários rebanhos testados.

Rweyemamu (1990), examinando dados publicados e não publicados, concluiu que o vírus é endêmico na América do Sul. Lindberg & Alenius (1999) demonstraram, através de um estudo feito na Inglaterra, que a prevalência estimada de infecção por VDBV é similar à de resultados de 10 e 20 anos atrás, o que reflete a habilidade do vírus de manter-se endêmico na ausência de medidas sistemáticas de controle.

No Brasil, o VDBV foi isolado pela primeira vez por Vidor, em 1974, a partir de soro bovino proveniente de animais de abatedouro. Levantamentos sorológicos regionais vêm demonstrando que a prevalência é alta em todas as regiões do país (Lemos, 1998).

Durante a última década, métodos de controle da DBV têm se concentrado na vacinação (Bolin, 1995; Leite, 1999; Lindberg & Alenius, 1999) e/ou identificação e remoção de animais PI (Bitsch & Ronsholt, 1995; Lindberg & Alenius, 1999, Bitch et al, 2000).

Programas de controle da infecção sem o uso de vacinas vêm sendo realizados nos países da Escandinávia, incluindo a Finlândia, desde 1993 (Lindberg & Alenius, 1999). Os requisitos para estes programas têm que receber uma atenção especial pois os custos são muito altos e estes devem ser comparados às perdas nacionais com a infecção (Bitsch & Ronsholt, 1995).

Os efeitos adversos em criações de bovinos de leite e de corte vêm estimulando a produção de numerosas vacinas e diferentes estratégias de vacinações para o controle da DBV (Bolin, 1995; Kelling, 1996). A vacinação, de acordo com a realidade brasileira, é o meio mais vantajoso em relação custo-benefício na promoção da saúde animal. O programa de vacinação anual, praticado em muitos países, tem contribuído muito para a erradicação da doença. A decisão de vacinar ou não os animais deve basear-se na análise do risco de contaminação e ocorrência de doença

clínica no plantel. Considerando-se a alta prevalência do VDBV e as grandes perdas econômicas a ela relacionadas, a vacinação contra este vírus é certamente indicada (Oirschot et al, 1999; Bolin, 1995), vacinando novilhas após os seis meses de idade e revacinando-as antes da cobertura ou aos 18 meses (Leite, 1999).

2.3. Adjuvantes

Para a fabricação de vacinas efetivas utilizando-se microrganismos inativados ou subunidades destes microrganismos, torna-se necessário potencializar a resposta imune com o auxílio de adjuvantes (Abbas et al, 2000). Os adjuvantes são essenciais quando se pretende estabelecer uma memória de longo prazo contra antígenos solúveis. Estas substâncias promovem imunogenicidade por capturarem os antígenos nos locais onde tornam-se acessíveis aos linfócitos e induzem as células apresentadoras de antígenos (APC) a expressar moléculas co-estimuladoras. Os adjuvantes tanto depositam os antígenos em sítios apropriados, como induzem citocinas que regulam as funções dos linfócitos (Roitt et al, 1996).

Durante trabalhos na década de 20, descobriu-se que certas substâncias, notadamente os sais de alumínio, quando adicionados ou emulsificados a antígenos, melhoram a produção de anticorpos. Desde a década de 30, estes sais precipitados em forma de gel de Hidróxido de Alumínio ($Al(OH)_3$) vêm sendo utilizados em vacinas humanas e veterinárias com excelente segurança através da ligação do antígeno ao gel por interações eletrostáticas, induzindo após inoculação, células T auxiliares classe 2 (T aux 2) e IgE (Cox & Coulter, 1997; Horzinek & Schijns, 1997). Em camundongos, induzem respostas por anticorpos mediadas por IgG1 e IgE como consequência da estimulação de IL-5 (Horzinek & Schijns, 1997).

Outro tipo de adjuvante utilizado em vacinas veterinárias são as emulsões oleosas. Estas emulsões são definidas como sistemas heterogêneos onde um líquido fica disperso em outro. Os dois líquidos não são miscíveis

e quimicamente não reativos (Horzinek et al, 1997). As emulsões óleo-água (O/A) caracterizam-se por microgotículas de óleo estabilizadas por surfactantes em uma fase aquosa contínua. Resultam em uma excelente apresentação antigênica (Cox & Coulter, 1997), liberação lenta de antígenos e promovem uma estimulação duradoura do sistema imune (Bomford, 1997). O Emulsigen®¹ é uma emulsão do tipo O/A comercial e liberada pelo Ministério da Agricultura Americano (USDA) para uso em vacinas veterinárias. As emulsões água-óleo-água (A/O/A – Emulsões Múltiplas) apresentam, em sua fase interna, uma emulsão água-óleo e uma fase aquosa como fase contínua (Horzinek et al, 1997). Silva et al (1998) e Seiler et al (1998), descrevem-nas como emulsões que, devido à sua forma, possuem propriedades muito interessantes para aplicação farmacêutica (Figura 1).

2.4. Vacinas contra a RIB e DBV

Nas Tabelas 1 e 2 estão resumidas algumas técnicas empregadas por vários autores na produção e teste de vacinas contra a DBV e RIB.

Alguns autores, entretanto, não descrevem detalhes das técnicas empregadas na produção de vacinas contra estes vírus, porém realizam testes de potência dessas e fazem observações relevantes sobre a sua eficiência. Oirschot et al (1999), em artigo de revisão, analisaram trabalhos realizados por outros autores sobre a proteção conferida a ovelhas gestantes, que são consideradas bons modelos para a certificação da eficácia de vacinas contra a DBV. Os resultados descritos por estes autores mediante a vacinação das mesmas com vacinas convencionais, demonstraram que nenhuma delas parece conferir proteção completa contra a infecção congênita, após o teste de desafio com amostras virais com títulos altos. Brownlie et al (1995), testando uma vacina inativada contra a DBV em animais gestantes, observaram que ela conferiu 100% de proteção ao feto após vacinar os animais por duas ou três vezes e desafiá-los.

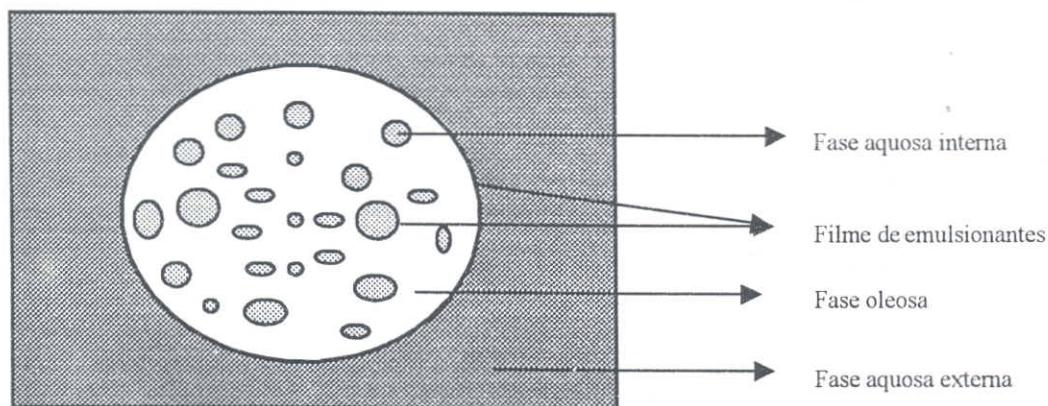


Figura 1: Esquema representativo de uma Emulsão Múltipla Água/Óleo/Água

¹ MVP Laboratories, Inc.

Tabela 1: Detalhes das técnicas empregadas por vários autores para produção de vacinas contra a Diarreia Bovina a Vírus e os resultados obtidos com a utilização destas vacinas.

Autor	Amostras de Vírus Utilizadas	Título Infeccioso/ ¹ dose vacinal	Adjuvante (concentração)	Inativante (concentração)	Nº de vacinações/ ² intervalo	Via de inoculação	Título de Ac após a 1ª vacinação (log ₂) (dias)	Título de Ac após a revacinação (log ₂) (dias)	Desafio / Proteção no desafio
1	BVD NADL	10 ⁶ TCID ₅₀ /ml / 5 ml	Al(OH) ₃ (10%)	β-propiolactona (1:500)	2 / 28 dias	IM ²	1 (14 dias); 2 (28 dias)	8 (7 dias); 10 (14 dias); 12 (21 dias); 10 (28 dias)	-
1	BVD NADL	10 ⁶ TCID ₅₀ /ml / 5 ml	Al(OH) ₃ (10%)	Clorofórmio (5%)	2 / 28 dias	IM	0 (14 e 28 dias)	9 (14 e 28 dias)	-
2	BVD 11249	10 ^{6,5} TCID ₅₀ /ml / 4 ml	Quil A (1 mg / dose)	β-propiolactona (1:2500)	3 / 21 dias	SC ⁴	2,02-5,74 (21 dias)	8,67-10,46 (21 dias)	+ / +
3	IBR, PI ₃ ⁷ e BVD	NE ⁵ / 2 ml	VVM ⁶	VVM	2 / 21 dias	IM e SC	5 - IM (14 dias) 4 - SC (14 dias)	6 - IM (2 dias) 5 - SC (2 dias)	+ / +
4	IBR, BVD, PI ₃ e BRS ^{8*}	NE / NE	NE	NE	3 / 28 e 112 dias	NE	67% ≥ 2 (14 dias)	100% ≥ 2 (14 dias)	-
5	BVD*	NE / NE	NE	NE	2 / 28 dias	IM	≤ 3 (28 dias)	5-7 (28 dias)	+ / +
6	BVD	NE / 2 ml	ISCOM (NE)	Etileno Amina (5mM)	2 / 21 dias	SC	NE	9 (21 dias)	-

¹ Título infeccioso antes da inativação (TCID₅₀/ml); ² Intramuscular; ³ Soroneutralização; ⁴ Subcutânea; ⁵ Não especificado no trabalho; ⁶ Vacina Viva Modificada; ⁷ Parainfluenza-3; ⁸ Vírus Respiratório Sincicial Bovino * Vacina Comercial. Autor: 1. Fernelius et al, 1972; 2. Howard et al, 1984; 3. Chapek et al, 1978; 4. Fulton et al, 1995; 5. Maskoschey et al, 2000; 6. Kamstrup et al, 1999.

Tabela 2: Detalhes das técnicas empregadas por vários autores para produção de vacinas contra a Rinotraquite Infecciosa Bovina e os resultados obtidos com a utilização destas vacinas.

Autor	Amostras de Virus Utilizadas	Título Infeccioso ¹ /dose vacinal	Adjuvante (concentração)	Inativante (concentração)	Nº de vacinação/ intervalo	Via de inoculação	Título de Ac após a 1ª vacinação (dias)	Título de Ac após a revacinação (dias)	Desafio / Proteção no desafio
1	IBR	10 ^{8,75} TCID ₅₀ /ml / 5 ml	Al(OH) ₃ (50%)	β-propiolactona (1:4000)	2 / 14 dias	IM ²	>3 (log ₂) (14 dias)	>3 (log ₂) (14 dias)	+ / +
2	IBR BK-5 IBR R-6	10 ⁸ TCID ₅₀ /ml / 2 ml	AIF ⁴ (NE ⁵)	Formaldeído (NE)	2 / 14 dias	IM	Animais (+) ⁶ : 5-8 (log ₂) (7 dias) e (-) ⁷ : 1 (log ₂) (14 dias)	Animal (+): 5-9 (log ₂) (7 dias) e (-): 7-8 (log ₂) (7 dias)	+ / +
3	IBR 758	10 ⁶ TCID ₅₀ /ml / 2 ml	Óleo (10, 20, 30 e 40%); Sais (0,1, 0,2, 0,4 e 0,5%)	β-propiolactona (1:4000)	2 / 28 dias	SC	0 (log ₂) (Para qualquer concentração e adjuvante até a revacinação)	1 (log ₂) (Para qualquer concentração e adjuvante)	-
4	IBR, PI ₃	10 ⁴ TCID ₅₀ /ml / 5 ml + 1 ml de leucotoxina	Al(OH) ₃ (25%)	Formalina (NE)	2 / 28 dias	SC	1 (log ₂) (7 dias)	4 (log ₂) (14 dias)	-
5	IBR*	NE / 5 ml	Oleoso (NE)	Etileno Amina (NE)	2 / 14 dias	NE	0,2 (log ₂) (14 dias)	3,4 (log ₂) (14 dias)	-
5	IBR, AD ⁹ *	NE / 5 ml	Oleoso (NE)	Etileno Amina (NE)	2 / 14 dias	NE	1,3 (log ₂) (14 dias)	3 (log ₂) (14 dias)	-
5	IBR, AD e PI ₃ ¹⁰ *	NE / 5 ml	Oleoso (NE)	Etileno Amina (NE)	2 / 14 dias	NE	0,2 (log ₂) (14 dias)	2,6 (log ₂) (14 dias)	-
5	IBR AD PI ₃ e RS ¹¹ *	NE / 5 ml	Oleoso (NE)	Etileno Amina (NE)	2 / 14 dias	NE	0,8 (log ₂) (14 dias)	2 (log ₂) (14 dias)	-
6	IBR*	NE / 5 ml	Oleoso (NE)	NE	3 / 21 dias	NE	0-6 (log ₂) (21 dias)	1-7 (log ₂) (21 dias)	+ / +
7	IBR*	NE / 2 ml	NE	NE	2 / 28 dias	IM	0,2 (log ₁₀) (14 dias)	0,8 (log ₁₀) (14 dias)	+ / +
7	IBR*	NE / 2 ml	NE	NE	3 / 14 e 41 dias	IM	0,2 (log ₁₀) (14 dias)	0,5 (log ₁₀) (14 dias)	+ / +
8	IBR, BVD, PI ₃ e BRS*	NE / NE	NE	NE	3 / 28 e 112 dias	NE	86,6% > 3 (log ₂) (14 dias)	100% > 3 (log ₂) (14 dias)	-

¹ Título infeccioso antes da inativação (TCID₅₀/ml); ² Intramuscular; ³ Soroneutralização; ⁴ Adjuvante Incompleto de Freund; ⁵ Não especificado no trabalho; ⁶ Animal positivo; ⁷ Animal negativo; ⁸ Subcutâneo; ⁹ Adenovírus; ¹⁰ Parainfluenza-3; ¹¹ Vírus Respiratório Sincicial Bovino * Vacina Comercial. Autor: 1. Merhotra & Shukla, 1991; 2. Zuffa et al, 1984; 3. Islas et al, 1995; 4. Odendaal et al, 1997; 5. Kelemen et al, 1987; 6. Popsil et al, 1996; 7. Straub & Mawhinney, 1998; 8. Fulton et al, 1995.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Preparo da semente

3.1.1. Amostras dos vírus

Foram utilizadas as amostras de referência BVD NADL biotipo citopatogênico (ATCC VR 1422), BVD NY biotipo não citopatogênico (ATCC VR 524) e IBR Colorado 1 (ATCC VR 864).

3.1.2. Células

Os vírus foram passados três vezes em culturas de células MDBK (Madin Darby Bovine Kidney – ATCC CRL 22) previamente determinadas como livres de DBV e RIB pela técnica de imunofluorescência direta (Hay, 1992; Kwapinski, 1972) e pela técnica de RT-PCR (nested) desenvolvida no Laboratório de Microorganismos Intracelulares¹. As amostras foram inoculadas em monocamadas 90% confluentes cultivadas em meio MEM² com 2 U/ml de penicilina G potássica, 2 µg/ml de sulfato de estreptomicina e 10µg/ml de fungizona, acrescidos de 5% de Soro Fetal Bovino². As culturas de células inoculadas foram incubadas em estufa de CO₂ a 37°C até que se observasse 85-90% de efeito citopático para as amostras citopatogênicas e por 96 horas para a amostra não citopatogênica. Estas suspensões virais foram utilizadas nos testes de Soroneutralização (SN).

Paralelamente, os vírus foram passados três vezes em culturas de células BT (Bovine Turbinate – ATCC CRL 1390) previamente determinadas como livres de DBV e RIB pela técnica de imunofluorescência direta (Hay, 1992; Kwapinski, 1972) e pela técnica de RT-PCR (nested) desenvolvida no Laboratório de Microorganismos Intracelulares¹. As amostras foram inoculadas em monocamadas 90% confluentes cultivadas em meio Dulbecco's² com 2 U/ml de penicilina G potássica e 2 µg/ml de sulfato de estreptomicina,

acrescidos de 10% de Soro Equino². As culturas de células inoculadas foram incubadas em estufa de CO₂ a 37°C até que se observasse 85-90% de efeito citopático para as amostras citopatogênicas e por 96 horas para a amostra não citopatogênica. Estas amostras virais foram utilizadas na produção das vacinas.

A partir da terceira passagem das amostras virais, foram realizadas novas inoculações (quarta passagem) em monocamadas 90% confluentes de células MDBK e BT, cultivadas em garrafas Roller (850 cm²) para produção de 100 ml de cada uma das suspensões virais. Todas as amostras foram tituladas em placas de cultura de células de 96 orifícios e incubadas em estufa de CO₂ a 37°C por 96 horas. A titulação da amostra DBV NY foi revelada pela técnica de Imunoperoxidase em monocamadas de células (Andrade, 2001). Os títulos virais foram calculados segundo Reed & Muench (1938).

As amostras virais foram alíquotadas e estocadas a -70°C.

3.1.3. Inativação viral

A quarta passagem das suspensões virais VDBV NADL e VDBV NY produzidas em células BT foram inativadas pela β-propiolactona na proporção de 1:40000 e 1:4000 e a quarta passagem da suspensão viral de RIB Colorado 1 em células BT, foi diluída 100 vezes e inativada também pela β-propiolactona, na proporção de 1:40000, 1:4000 (Islas et al, 1995; Mehrotra & Shukla, 1991) e 1:1000. As suspensões virais foram mantidas sob agitação a 37°C por duas horas e por mais quatro horas a 25°C, sendo o pH ajustado para 7,2 com K₂HPO₄ 1M, sempre que necessário (Lobato, 1990).

Após a inativação com cada uma das concentrações de β-propiolactona, uma alíquota de cada suspensão viral inativada foi dialisada em salina 0,85% por 24 horas, a 4°C (Sambrook et al, 1989).

¹ ICB/UFMG – Depto de Microbiologia, Av. Antônio Carlos, 6627, cp 486, cep:31270-910

² Gibco BRL

3.1.3.1. Prova de inativação

As suspensões virais dialisadas foram inoculadas em monocamadas de células BT 100% confluentes e incubadas a 37°C por 96 horas.

3.2. Adjuvante de Emulsão Múltipla

Foi desenvolvido e formulado um adjuvante de emulsão múltipla (EM - A/O/A - água/óleo/ água)³ (Silva et al, 1998 e Seiler et al, 1998). Esta emulsão foi preparada em condições assépticas, pelo método conhecido como "duas etapas". Inicialmente, fabricou-se uma emulsão primária (EP) água/óleo (A/O - Água/Óleo) vertendo-se a suspensão aquosa em uma solução de óleo e emulsionante lipofílico, mantendo-a sob agitações variadas, sendo de moderada a forte e, em seguida, verteu-se a emulsão primária obtida em uma solução aquosa de emulsionante hidrofílico mantendo-a sob agitações variadas e obteve-se a EM A/O/A.

Como matéria prima para o desenvolvimento e formulação da EM foram utilizados os seguintes ingredientes, previamente filtrados em membrana de 0,22µm:

Fase aquosa interna: foi utilizada suspensão de NaCl 0,9% em concentrações que variaram de 41 a 56g / 100 ml.

Fase oleosa: foram testados óleo de soja, miristato de isopropila⁴, e esqualeno⁵ como fase oleosa intermediária. Todos estes ingredientes tiveram suas concentrações variadas entre 40 e 55 g / 100 ml.

Emulsionantes: foram testados Mannide monooleato⁶, Pluronic L121⁷, Abil EM90⁷

³ Laboratório de Farmacotécnica e Laboratório de Tecnologia Farmacêutica - Faculdade de Farmácia UFMG. Av. Olegário Maciel 2360, Cidade Jardim, cep: 30180-112. Belo Horizonte, MG.

⁴ SIGMA M 8136

⁵ SIGMA 3626

⁶ SIGMA A 8009

⁷ BASF

e Span 65⁸ com concentração de 4g/100ml como emulsionantes lipofílicos, Pluronic F68⁷, e Tween 80⁹, com concentrações de 0,5g/100ml como emulsionantes hidrofílicos. A temperatura de dissolução dos emulsionantes variou entre 25°C e 37°C.

A velocidade e o tempo de agitação para o preparo da EM variaram conforme a etapa do processo: acréscimo da fase aquosa na EP, 500 a 1300 rpm por 20 minutos; preparo da EP, 1300 e 1700 rpm por 20 ou 30 minutos; acréscimo da EP, 400 a 500 rpm por 20 minutos e preparo da EM, 400 a 500 rpm por 20 ou 30 minutos.

As agitações foram feitas em Eurostar digital (Ika labortechnik) modelo Euro - ST D.

Ao todo foram feitas 65 EP, sendo 23 estáveis, e 23 EM, sendo três estáveis.

3.2.1. Teste de análise de condutividade

Foi realizado a partir de um eletrólito (NaCl) adicionado na fase aquosa interna, para acompanhamento de possíveis variações da condutividade do sistema, que é um indicativo da ocorrência de ruptura dos glóbulos múltiplos com liberação do eletrólito para a fase aquosa externa.

3.2.2. Teste de microscopia óptica

Foi realizado com objetivo de verificar a presença dos glóbulos múltiplos (A/O/A) através da observação utilizando objetiva de imersão.

3.2.3. Testes de inocuidade

Foi realizado através da inoculação da EM em dois coelhos por via subcutânea (2 ml) e intradérmica (0,5 ml). Os animais foram observados, a temperatura foi medida e a regressão das lesões causadas foi medida, com o auxílio de um paquímetro, diariamente, por um período de sete dias.

⁸ SIGMA S2028

⁹ SIGMA P1754

3.2.3. Teste de estabilidade

Foi realizado a partir da observação da separação das fases e formação de depósitos, grumos e crescimento de cristais, sendo a solução de NaCl 0,9% substituída por suspensão aquosa de células MDBK em meio MEM com 2 U/ml de penicilina G potássica, 2 µg/ml de sulfato de estreptomicina, 10µg/ml de fungizona e 5% de SFB. Cinquenta ml da formulação foram

estocados em frascos âmbar a 25°C e a 40°C por um período de sete meses. Durante este período, o pH das formulações foi medido semanalmente.

3.3. Vacinas

Foram elaboradas quatro vacinas e duas vacinas comerciais foram também utilizadas, estando a composição de cada uma descrita no Figura 2.

Figura 2: Composição antigênica e de adjuvantes das vacinas utilizadas durante os testes.

Vacinas	Descrição
Vacina I	Vacina contra DBV e IBR utilizando o Hidróxido de Alumínio como adjuvante
Vacina II	Vacina contra DBV e IBR utilizando o Emulsigen® como adjuvante
Vacina III	Vacina contra IBR utilizando o Hidróxido de Alumínio como adjuvante
Vacina IV	Vacina contra IBR utilizando o Emulsigen® como adjuvante
Vacina V (comercial)	Vacina inativada oleosa contra a DBV e IBR
Vacina VI (comercial)	Vacina inativada contra os vírus da DBV, IBR, Parainfluenza-3, Vírus Respiratório Sincicial e bacterinas de <i>Leptospira pomona</i> , <i>Leptospira hardjo</i> , <i>Leptospira grippotyphosa</i> , <i>Leptospira canicola</i> , <i>Leptospira icterohaemorrhagiae</i> utilizando o Hidróxido de Alumínio como adjuvante

No que se refere aos testes de esterilidade, inativação viral e testes de estabilidade foram seguidas as recomendações do "Manual of Standard Techniques" (OIE, 2000). A dose vacinal foi estipulada em 5ml. As vacinas V e VI (comerciais) foram adquiridas em casas especializadas em produtos agro-pecuários sendo a vacina V válida até 06/2002 e a vacina VI válida até 01/2003 e mantidas conforme a especificação dos laboratórios fabricantes. Apesar de ser um dos objetivos deste trabalho o desenvolvimento de vacinas utilizando a EM como adjuvante, não foram

obtidas emulsões estáveis (como descrito no item 4.2) e, por isto, os testes destas vacinas não constam na metodologia.

3.3.1. Elaboração da vacinas com Hidróxido de Alumínio (vacinas I e III)

Vacina I: Para o preparo da vacina bivalente, as suspensões virais DBV NADL e DBV NY inativadas foram utilizadas com título de 10^7 TCID₅₀/5ml e a suspensão RIB Colorado 1 foi utilizada com título de 10^9 TCID₅₀/5ml. Gel de Al(OH)₃ (2,83% de óxido de alumínio), numa concentração final de

10% foi acrescentado às suspensões virais inativadas diluídas em PBS pH 7,4 e deixado sob agitação à temperatura ambiente por 24 horas (Fernelius et al, 1972).

Vacina III: Foram aplicados os mesmos procedimentos utilizados para o preparo da vacina I, utilizando apenas a suspensão de RIB Colorado 1 inativada com título de 10^9 TCID₅₀/5ml diluída em PBS pH 7,4. Durante o período de agitação, o pH das vacinas I e III foi medido e quando necessário, ajustado para 7,2 com bicarbonato de sódio a 7,5% (Lobato, 1990).

As vacinas foram estocadas a 4°C.

Para verificar a proporção de adjuvante, uma amostra de cada vacina foi coletada, centrifugada a 377g por 15 minutos e a proporção adjuvante foi conferida.

Para verificar o índice de adsorção das partículas virais ao gel de Al(OH)₃, foram realizados os mesmos procedimentos de preparo das vacinas I e III porém, utilizando suspensões com amostras virais vivas e a agitação foi feita a 4°C. Após preparadas, as vacinas foram centrifugadas a 377g por 15 minutos e os sobrenadantes foram titulados em placas de 96 orifícios. Os títulos virais dos sobrenadantes foram calculados segundo Reed & Muench (1938).

3.3.2. Elaboração das vacinas com Emulsigen® (vacinas II e IV)

Vacina II: Para o preparo da vacina bivalente, as suspensões virais DBV NADL e DBV NY inativadas foram utilizadas com título de 10^7 TCID₅₀/5ml e a suspensão RIB Colorado 1 foi utilizada com título de 10^9 TCID₅₀/5ml. Vinte por cento de Emulsigen® e 5% de gel de Al(OH)₃ (2% de óxido de alumínio), foram acrescentados às suspensões virais inativadas diluídas em PBS pH 7,4 e deixados sob agitação à temperatura ambiente por 24 horas, segundo normas do fabricante.

Vacina IV: Foram aplicados os mesmos procedimentos utilizados para o preparo da

vacina II, utilizando apenas a suspensão de RIB Colorado 1 inativada com título de 10^9 TCID₅₀/5ml, diluída em de PBS pH 7,4. O pH das vacinas II e IV foi medido durante o período de agitação.

As vacinas foram estocadas a 4°C.

Com o objetivo de verificar a proporção de adjuvante, uma amostra de cada vacina foi colhida, centrifugada a 377g por 15 minutos e a proporção adjuvante foi conferida.

3.3.3. Testes de estabilidade

Foram realizados a partir da observação da separação das fases das vacinas, com 10ml de cada uma estocados a 25°C e a 40°C. O pH das vacinas foi medido semanalmente, por um período de dois meses e, sete meses depois, foram realizadas novas observações e o pH foi novamente medido.

3.4. Testes de esterilidade

Amostras das suspensões virais inativadas, antes e após a diálise do adjuvante de EM e das vacinas, foram inoculadas, em duplicata, em caldos nutritivos: tioglicolato, sob condições de anaerobiose e aerobiose, e ágar sangue, incubadas a 37°C e Sabourraud, incubadas a temperatura ambiente. As provas foram lidas diariamente, por um período de 28 dias.

3.5. Testes de potência

3.5.1. Testes de potência em coelhos

Os testes foram realizados em coelhos das raças Nova Zelândia e Borboleta, machos e fêmeas com aproximadamente 1,5 Kg de peso mantidos em gaiolas (dois coelhos/gaiola) em galpão semi aberto na Fazenda Experimental Prof. Hélio Barbosa, situada no município de Igarapé, Minas Gerais. Os coelhos foram alimentados com ração uma vez ao dia. Foram utilizados 35 animais divididos em sete grupos e vacinados por via subcutânea, com duas doses de 2,0 ml cada, com intervalo de 28 dias, como se segue:

Grupo 01: Animais vacinados com a vacina VI

Grupo 02: Animais vacinados com a vacina V

Grupo 03: Animais vacinados com a vacina IV

Grupo 05: Animais vacinados com a vacina III

Grupo 06: Animais vacinados com a vacina II

Grupo 07: Animais vacinados com a vacina I

Grupo 09: (Controle Negativo): Animais inoculados com PBS pH 7,4

O sangue dos animais foi coletado por secção da veia auricular marginal em tubos estéreis e centrifugado em centrífuga refrigerada por 15 minutos a 377g para separação do soro. Os soros dos animais foram alíquotados e congelados a -20°C . As sangrias e vacinações foram realizadas de acordo com a Tabela 3.

Tabela 3: Cronograma de sangrias e vacinações realizados com os coelhos.

Dias	Sangrias	Vacinações
0	X	X
14	X	
28	X	X
42	X	
56	X	

3.5.1.1. Teste de Soroneutralização

Os soros dos animais foram inativados a 56°C por 30 minutos e testados, em duplicata, pelo teste da SN segundo o "Manual of Standard Techniques" (OIE, 2000) para detecção da presença de anticorpos contra os vírus DBV NADL (Browlie & Edwards, 2000) e RIB (Oirschot, 2000) utilizando a linhagem celular MDBK e amostras virais adaptadas a esta linhagem.

Os testes de SN para a DBV foram feitos utilizando apenas a amostra citopatogênica

(NADL) pois esta não pode ser sorologicamente distinta da amostra não citopatogênica (NY) (Radostis & Littlejohns, 1988). Como a observação da ação da amostra NADL é mais rápida e fácil, ela foi utilizada nos testes.

3.5.1.2. Análise macroscópica de lesões

Após o término do experimento, os animais foram sacrificados e foram feitas observações macroscópicas do impacto da administração de cada uma das vacinas na pele e carcaça de cada coelho. A pele e carcaça dos animais foram fotografadas com filme FUJI® Asa 100 em máquina digital Sony® modelo MVC – FD85.

3.5.1.3. Análise Estatística

Os resultados obtidos a partir das sorologias dos coelhos vacinados com as vacinas I, II, III, IV, V e VI foram comparados pelo método de Kruskal-Wallis (Sampaio, 1998).

3.5.2. Teste de potência em bovinos

Foram selecionados nove bovinos de corte, machos, cruzados, com peso entre 200–250kg, criados em pasto de capim braquiara. Os animais foram vermifugados com ivermectina¹⁰ na dose de 1ml/50kg de peso e previamente determinados como livres da DBV e RIB pelo teste de SN segundo o "Manual of Standard Techniques" (OIE, 2000) (Browlie & Edwards, 2000; Oirschot, 2000). Os animais foram divididos em dois grupos, conforme as normas do "Code of Federal Regulations" (2001), sendo um composto por cinco animais vacinados, por via subcutânea, com 5 ml de vacina, e o outro por quatro animais, utilizados como controle negativo, inoculados, por via subcutânea, com 5 ml de PBS pH 7,4. Os grupos foram divididos como se segue:

Grupo 01: Animais vacinados com a vacina II

Grupo 02 (Controle Negativo): Animais inoculados com PBS pH 7,4.

¹⁰ IVOMEC – Ouro Fino

O sangue dos animais foi coletado por secção da artéria jugular, em tubos Vacutainer® estéreis com estimulador de coágulo e centrifugado em centrífuga refrigerada por 15 minutos a 377g para separação do soro. Os soros dos animais foram aliqüotados e congelados a -20°C. As sangrias e vacinações foram realizadas de acordo com a Tabela 4.

Tabela 4: Cronograma de sangrias e vacinações realizados com os bovinos

Dias	Sangrias	Vacinações
0	X	X
14	X	
28	X	X
42	X	

3.5.2.1. Teste de Soroneutralização

Os soros dos animais foram inativados a 56°C por 30 minutos e testados, em duplicata, pelo teste da SN para detecção da presença de anticorpos contra os vírus DBV NADL (Browlie & Edwards, 2000) e RIB (Oirschot, 2000) utilizando a linhagem celular MDBK e amostras virais adaptadas a esta linhagem, conforme procedimento realizado com o soro dos coelhos (Item 3.5.1.1).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Preparo da semente

Após a titulação da quarta passagem das amostras virais produzidas em células MDBK, em placas de 96 orifícios, encontrou-se um título viral das amostras DBV NADL, DBV NY e RIB de $10^{3,4}$ TCID₅₀/ml, $10^{2,8}$ TCID₅₀/ml e $10^{6,5}$ TCID₅₀/ml respectivamente. Em células BT, os títulos virais obtidos foram de 10^7 TCID₅₀/ml para os vírus DBV NADL e DBV NY e 10^{11} TCID₅₀/ml para o vírus da RIB.

Através das provas de inativação viral, observou-se que a β-propiolactona empregada na proporção de 1:40000 para os vírus DBV NADL e DBV NY não foi suficiente para conferir uma inativação completa destas suspensões virais. Quando

empregada na proporção de 1:4000, a β-propiolactona inativou as suspensões virais com sucesso.

Observou-se que o emprego da β-propiolactona na proporção de 1:40000, 1:4000 (Islas et al, 1995; Mehrotra & Shukla, 1991) e 1:1000 foram insuficientes para inativar completamente a suspensão de RIB, provavelmente pela grande quantidade de partículas virais na suspensão. A partir disto, a suspensão foi diluída 100 vezes, para que a suspensão viral ficasse menos concentrada (10^9 TCID₅₀/ml) e o inativante foi empregado nas mesmas concentrações, observando-se uma inativação completa quando este foi adicionado na proporção de 1:1000.

Não foi observada a presença de qualquer tipo de contaminante nos testes de esterilidade realizados com as amostras inativadas.

4.2. Adjuvante de Emulsão Múltipla

Inicialmente, foram testadas várias combinações de ingredientes da fase oleosa, em diferentes concentrações, e emulsionantes e diferentes concentrações da fase aquosa para obtenção da EP. Toda a matéria prima utilizada nas formulações adjuvantes é autorizada para uso injetável¹¹. As Tabelas 5 e 6 mostram, as diferentes temperaturas, velocidades e tempos de agitação testados. No caso de uma das EP por exemplo, optou-se pela substituição dos emulsionantes Pluronic L121® e Span 65® pelo emulsionante Abil EM 90®, pelo fato de os primeiros serem formadores de micelas e, por isso, sofrerem alterações devido a leves variações de força iônica. No caso do Abil EM 90®, que é um derivado do silicone, este tipo de variação não ocorre porque ele é polimérico e não formador de micelas. Segundo Silva et al (1998), o preparo da EP deve ser realizado com uma velocidade de agitação forte (em torno de 1500 rpm) por 25 a 35 minutos e a temperatura deve ser

¹¹ UNITED STATES PHARMACOPEIA 24, 2000; MARTINDALE 31ed.; USP DI DRUG INFORMATION FOR THE HEALTH CARE PROFESSIONAL, 18th, 1998

em torno de 70°C. Na maioria das formulações que formaram EP, a velocidade de agitação utilizada foi de 700 rpm e a temperatura em que esta foi preparada foi de 25°C e o tempo de agitação, 20 minutos. Quando observou-se formação de EP, estas foram adicionadas, aos poucos, com velocidade de agitação baixa e em concentrações variadas, a soluções aquosas com uma baixa concentração de emulsionantes (Silva et al, 1998).

No caso destas formulações, a temperatura de formação das EP não pode ser tão elevada quanto a recomendada por Cunha et al (1998), porque temperaturas em torno

de 70°C causariam desnaturação das proteínas virais. Provavelmente as velocidades de agitação para a formação de EP foram menores que as recomendadas por Silva & Seiller (1998) devido aos ingredientes utilizados nestas formulações. Não foi observada a formação de EP quando utilizadas combinações de alguns ingredientes independente das concentrações, velocidades e tempos de agitação e temperatura de preparo (Tabela 5). A não formação de EP, provavelmente ocorreu, nestes casos, devido a incompatibilidade dos ingredientes utilizados e, talvez, pela utilização de baixas temperaturas.

Tabela 5: Detalhes de algumas das formulações desenvolvidas em que não foi observada a formação de Emulsão Primária.

Emulsão	Fase oleosa (concentração)	Emulsionantes (concentração)	Temperatura de dissolução do Emulsionante	Fase aquosa (concentração)	Velocidade e tempo de agitação para formação da EP
1	Óleo de Soja (45g)	Pluronic L121 (4g)	TA ¹	NaCl 0,9% (50g)	1300 rpm ² ; 20min ³
2	Óleo de Soja (45g)	Span 65 (4g)	TA	NaCl 0,9% (50g)	1300 rpm; 20min.
3	Óleo de Soja (45g)	Span 65 (4g)	37°C	NaCl 0,9% (50g)	1300 rpm; 20min.
4	Óleo de Soja (45g)	Span 65 (4g)	TA	NaCl 0,9% (50g)	1700 rpm; 20min.
5	Óleo de Soja (45g)	Pluronic L121 (4g)	37°C	NaCl 0,9% (50g)	1700 rpm; 20min.
6	Óleo de Soja (45g)	Pluronic L121 (4g)	37°C	NaCl 0,9% (50g)	1700 rpm; 20min.
7	Miristato de Isopropila (40g)	Span 65 (4g)	37°C	NaCl 0,9% (56g)	1900 rpm; 30min.
8	Miristato de Isopropila (45g)	Span 65 (4g)	37°C	NaCl 0,9% (51g)	1900 rpm; 30min.
9	Miristato de Isopropila (55g)	Span 65 (4g)	37°C	NaCl 0,9% (41g)	1900 rpm; 30min.
16	Óleo de Soja (45g)	Span 65 (4g)	37°C	NaCl 0,9% (51g)	1900 rpm; 30min.
26	Miristato de Isopropila (45g)	Mannide monooleato (4g)	TA	NaCl 0,9% (51g)	1900 rpm; 30min.
27	Miristato de Isopropila (40g)	Mannide monooleato (4g)	TA	NaCl 0,9% (56g)	1900 rpm; 30min.
28	Miristato de Isopropila (45g)	Mannide monooleato (4g)	TA	NaCl 0,9% (42g)	1900 rpm; 30min.
29	Óleo de Soja (40g)	Mannide monooleato (4g)	TA	NaCl 0,9% (56g)	1900 rpm; 30min.

¹ Temperatura Ambiente; ² Rotações por minuto; ³ Minutos.

Tabela 6: Detalhes de algumas das formulações desenvolvidas em que foi observada a formação de Emulsão Primária, sendo o tempo e velocidade de agitação para formação de Emulsão Primária de 30 minutos a 1900 rpm.

Emulsão	Fase oleosa (concentração)	Emulsionantes (concentração)	Temperatura de dissolução do Emulsionante	Fase aquosa (concentração)	Velocidade e tempo de agitação para acréscimo da fase aquosa
10	Miristato de isopropila (45g)	Pluronic L121 (4g)	TA ¹	NaCl 0,9% (51g)	700 rpm ² ; 20min ³
11	Miristato de isopropila (40g)	Pluronic L121 (4g)	TA	NaCl 0,9% (56g)	700 rpm; 20min.
12	Miristato de isopropila (45g)	Pluronic L121 (4g)	TA	NaCl 0,9% (41g)	700 rpm; 20min.
13	Óleo de soja (40g)	Pluronic L121 (4g)	TA	NaCl 0,9% (56g)	700 rpm; 20min.
14	Óleo de soja (45g)	Pluronic L121 (4g)	TA	NaCl 0,9% (51g)	700 rpm; 20min.
15	Óleo de soja (55g)	Pluronic L121 (4g)	TA	NaCl 0,9% (51g)	700 rpm; 20min.
30	Miristato de isopropila (40,5g)	Abil EM 90 (4g)	37°C	NaCl 0,9% (51g)	500 rpm; 20min.

¹ Temperatura Ambiente; ² Rotações por minuto; ³ Minutos;

Em relação às EP estáveis utilizadas no preparo de EM não estáveis, Silva et al (1998) afirmam que, por ser a EP uma emulsão mais viscosa, sua dispersão é difícil e que, durante a formação da EM, as gotículas de óleo podem romper-se, causando uma mistura de parte da fase aquosa interna com a fase aquosa externa. Parece ter sido, exatamente devido a este fator que, na maioria das tentativas de desenvolvimento de EM estáveis, a partir de EP estáveis, não foram formadas EM estáveis, apesar de terem sido seguidos todos os requisitos recomendados, tais como a velocidade de agitação.

As EP estáveis 11, 12 e 13, formaram EM estáveis quando incorporada na fase interna solução aquosa de NaCl 0,9%. Vinte e três gramas dessas EP foram vertidas em solução de água (10 ml) e tween 80 (0,5 g) com velocidade de agitação de 400 rpm por 20 minutos. Observou-se formação de EM após 30 minutos de agitação a 400 rpm. Entretanto, a estabilidade destas EM foi quebrada a medida que a solução de NaCl 0,9% foi substituída por suspensão aquosa de células MDBK em meio MEM com 2 U/ml de penicilina G potássica, 2 µg/ml de sulfato de estreptomicina, 10 µg/ml de fungizona e 5% de SFB. Esta desestabilização ocorreu devido a variações observadas na condutividade do sistema que, por sua vez, ocorreu pelo acréscimo de várias substâncias contidas no meio MEM (aminoácidos, carboidratos, sais e vitaminas), além do SFB, dos antibióticos, antifúngico e das proteínas e restos celulares, resultando em um aumento da osmolaridade da fase interna, tornando-a hipertônica em relação à fase externa, desestabilizando a EM.

A condutividade do sistema e a presença dos glóbulos múltiplos foram observados até o momento da desestabilização por eletrólitos de NaCl e por microscopia ótica, respectivamente. Nos testes de microscopia ótica pode-se observar, claramente, a ruptura dos glóbulos e, nos testes de condutividade do sistema, um aumento na condutividade através do eletrólito de NaCl adicionado à fase interna da EM.

Existem relações sobre os ingredientes e concentrações, tempos e velocidades de

agitação, além de temperaturas de formação das emulsões mais indicados para o desenvolvimento das EM. Entretanto, todas as vezes em que estas EM foram utilizadas como veículos ou adjuvantes, o que incorporava-se na fase interna eram suspensões menos complexas que as incorporadas neste trabalho, geralmente substâncias puras como hormônios, antineoplásicos, antibióticos, antígenos purificados, antiinflamatórios, cosméticos, entre outros (Cunha & Gontijo [200_]). Pode-se perceber isto pelo fato de terem sido formadas EM e, a medida que substituiu-se a fase interna pelos componentes da vacina, observou-se uma desestabilização, que era percebida imediatamente pela separação das fases devido à ruptura dos glóbulos. Devido a este problema, este adjuvante não foi utilizado na produção de vacinas contra a RIB e a DBV, como foi mencionado anteriormente no item 3.3.

Deve-se considerar, porém, que o uso desse tipo de adjuvante em vacinas veterinárias pode ser altamente vantajoso, visto que estas emulsões apresentam muitas vantagens em relação aos adjuvantes comumente utilizados como, proteção do(s) ingrediente(s) ativo(s) encapsulado(s), separação de ingredientes incompatíveis, elevada capacidade de encapsulamento de substâncias quando comparadas a outros sistemas e possibilidade de liberação prolongada das substâncias encapsuladas. Os primeiros estudos realizados com estas emulsões como estimuladores do sistema imunológico demonstraram serem elas melhores estimuladoras de produção de anticorpos que as emulsões simples água/óleo (Cunha e Gontijo, [200_], Silva et al, 1998).

Existem substâncias que aumentam a estabilidade e, proporcionalmente a viscosidade destes sistemas quando acrescentadas à fase interna da EM (Seiller et al, 1998). Tendo em vista todas as vantagens oferecidas por estes sistemas, faz-se necessário o desenvolvimento de novas formulações com o acréscimo destas substâncias para que estas possam ser utilizadas na produção de vacinas sem haver a necessidade de nenhum processo de filtração, purificação ou diálise das

suspensões virais já que estes processos não se mostram muito práticos para a produção em larga escala.

4.2.1. Testes de esterilidade e inocuidade

Não foi observada a presença de qualquer tipo de contaminante nos testes de esterilidade.

Com relação aos testes de inocuidade, foi observado um aumento de volume na pele do coelho inoculado com 2 ml do adjuvante de EM por via subcutânea. No coelho inoculado com 0,5 ml do adjuvante por via intradérmica observou-se lesão dos vasos

sanguíneos com pequena hemorragia e aumento da espessura da pele. Entretanto, através da mensuração com o auxílio do paquímetro, foi observado que a pele dos animais voltou a apresentar a mesma medida que apresentava antes das inoculações após três dias tanto no animal inoculado por via subcutânea quanto no animal inoculado por via intradérmica. A pequena hemorragia apresentada pelo coelho inoculado por via intradérmica desapareceu após dois dias e, após sete dias, observou-se que os vasos sanguíneos estavam recuperados da inoculação e a pele do animal apresentava um aspecto normal (Figura 3).

Figura 3: Médias de temperatura e espessura da pele dos coelhos inoculados com o adjuvante de Emulsão Múltipla por via intradérmica e subcutânea, medidas durante sete dias.

	Antes da inoculação	Dia 01	Dia 02	Dia 03	Dia 04	Dia 05	Dia 06	Dia 07
Temperatura	39,3°C	39,5°C	39,0°C	38,9°C	39,2°C	39,1°C	39,5°C	39,0°C
Inoculação Subcutânea	3,2 mm ¹	4,9mm	3,6mm	3,0mm	2,9mm	2,9mm	3,4mm	3,2mm
Inoculação intradérmica	3,3 mm	6,9mm	3,9mm	3,4mm	3,5mm	3,2mm	2,7mm	3,0mm
Horário	18hs	18hs	17hs	17:45hs	16:30hs	18hs	17:30hs	18hs

¹ milímetros

4.3. Vacinas elaboradas

4.3.1. Vacinas I e III

Sabendo-se que, a efetividade do Al(OH)₃ como adjuvante, depende crucialmente do índice de adsorção do antígeno ao gel (Bomford, 1997) e que, segundo a Organização Mundial de Saúde, esta

adsorção deve ser superior a 80% (OMS, 1977). O uso do gel de Al(OH)₃ na proporção de 10% foi eficiente para a adsorção de mais de 80% de cada uma das suspensões virais (Tabela 7). Após a conferência da porcentagem de adjuvante, constatou-se que esta permaneceu a mesma, ou seja, 10%, após o preparo da vacina

Tabela 7: Índice de adsorção das partículas virais de DBV e RIB utilizadas no preparo das vacinas I e III ao gel de hidróxido de alumínio.

Vírus / Vacina	Título inicial de suspensão (TCID ₅₀ / ml)	Título do sobrenadante (após a adsorção)	% de adsorção
DBV NY / I	10 ⁷	10 ^{0,53}	92%
DBV NADL / I	10 ⁷	10 ^{0,35}	95%
RIB / I	10 ⁹	10 ^{0,48}	95%
RIB / III	10 ⁹	0	100%

As vacinas apresentaram aspecto homogêneo e baixa viscosidade. Após cinco dias de incubação a 40°C, observou-se separação das fases caracterizada pela deposição do gel de Al(OH)₃ e meio de cultura no sobrenadante. No caso da vacina incubada a 25°C, esta separação aconteceu no 19º dia de incubação. Nas vacinas incubadas a 40°C a separação das fases ocorreu mais precocemente que nas vacinas incubadas a 25°C, o que se deve ao fato de que, temperaturas mais altas aceleram a velocidade de ocorrência dos efeitos do tempo sobre estas vacinas devido à diminuição da viscosidade das mesmas. As vacinas voltaram a apresentar-se homogêneas após leve agitação dos frascos.

Não foram observadas variações no pH e a presença de qualquer tipo de contaminante nos testes de esterilidade.

4.3.2. Vacinas II e IV

O uso de Emulsigen® combinado com Al(OH)₃ nas proporções de 20 e 5%, respectivamente, permitiu a elaboração de vacinas homogêneas com baixa viscosidade.

Não foi observada separação de fases e variações no pH das vacinas incubadas a 25°C e a 37°C durante o período de dois meses. Quando incubadas a 40°C, observou-se uma leve separação de fases a partir do dia 30. Esta separação foi caracterizada pela deposição de parte do Emulsigen® e meio de cultura e o restante do Emulsigen® no sobrenadante. As vacinas voltaram a apresentar-se homogêneas após leve agitação do frasco.

Não foram observadas variações no pH e a presença de qualquer tipo de contaminante nos testes de esterilidade.

4.4. Testes de potência

4.4.1. Testes de potência em coelhos

O teste de potência foi realizado em coelhos para que fosse feita uma estimativa da capacidade de estimulação das vacinas em produzir anticorpos contra DBV e RIB e para que a melhor delas fosse, posteriormente, inoculada em bovinos. Como não existem

dados na literatura que relatem a potência de vacinas contra estes vírus em coelhos, foram utilizadas duas vacinas comerciais (vacinas V e VI), uma com adjuvante oleoso e a outra com Al(OH)₃ como parâmetro para a comparação da potência das vacinas experimentais nestes animais.

4.4.1.1. Análise macroscópica de lesões

Sabendo-se que a utilização de adjuvantes faz-se necessária para potencializar a resposta imune de animais vacinados com vacinas inativadas e de subunidade, deve-se levar em consideração que eles induzem a reações inflamatórias que podem ser severas no local da injeção (Abbas et al, 2000). Para uma completa caracterização do grau de impacto dessas lesões, seria necessária a realização de estudos histológicos como os realizados por Broderson, em 1989, para analisar o impacto da aplicação do adjuvante incompleto de Freund na pele de coelhos e macacos. Neste trabalho realizou-se apenas uma análise macroscópica das lesões causadas pelos adjuvantes (hidróxido de alumínio, Emulsigen® e emulsão oleosa) na pele e carcaça dos coelhos vacinados. As lesões estão ilustradas na Figura 4.

Pode-se perceber, independente do adjuvante utilizado, externamente, ao toque da pele no local da inoculação, aumento de volume com consistência firme. Internamente, foram observadas lesões subcutâneas circulares irregulares variando de um a três centímetros de diâmetro. Nestas lesões foi observada a presença de vesículas com aumento de volume e saliências na região da inoculação. Após a inoculação da vacina V (adjuvante oleoso), foi observado, ao corte, presença de líquido caseoso.

As lesões observadas após as inoculações da vacinas comerciais (V e VI) apresentaram maior diâmetro e áreas maiores de hemorragias sugerindo uma maior resposta inflamatória. Isso pode ser devido, em relação a vacina VI (vacina com Al(OH)₃) à concentração de adjuvante empregada e, na vacina V, à qualidade e concentração dos óleos utilizados no preparo da emulsão oleosa (Bomford, 1997).

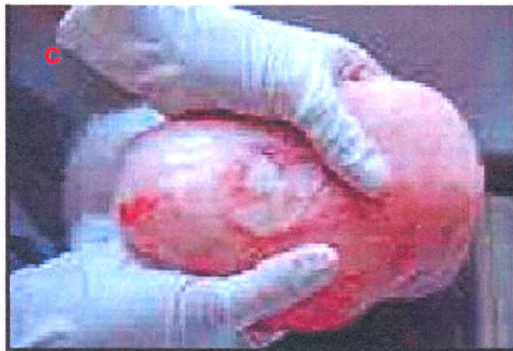


Figura 4: Lesões na pele de coelhos após duas inoculações subcutâneas das vacinas testadas. (a): vacina VI; (b): vacina I; (c): vacina V; (d): vacina II; (e): animal controle negativo inoculado com PBS.

4.4.1.2. Resposta sorológica dos coelhos à vacinação

O comportamento sorológico dos coelhos vacinados com as vacinas I, II, V e VI

(grupos 7, 6, 2 e 1, respectivamente) em relação ao vírus da DBV, e com as vacinas I, II, III, IV, V e VI (grupos 7, 6, 5, 3, 2 e 1, respectivamente) em relação ao vírus da RIB, estão descritos nas Tabelas 8 e 9.

Tabela 8: Títulos individuais e medianas de anticorpos contra a Diarréia Bovina a Vírus, obtidos na primeira, segunda, terceira e quarta sorologias, em coelhos vacinados e revacinados com as vacinas testadas.

Grupo	Vacina	Coelhos	Dia 14	Mediana Dia 28	Mediana Dia 42	Mediana Dia 56	Mediana Dia 28	Mediana Dia 42	Mediana Dia 56	
1	Vacina VI (comercial) *	01	-	2	32	32				
		02	0	0	32	16				
		03	0	0	8	256	64	128 (7 log2)	64	64 (6 log2)
		04	0	32	128	128				
		05	0	2	128	64				
2	Vacina V (comercial) Composição: DBV, RIB e emulsão oleosa	01	0	0	2	0				
		02	0	0	0	0				
		03	0	0	0	0	0	0	0	
		04	0	0	0	0	0			
		05	0	0	0	0	0			
6	Vacina II (Experimental) Composição: DBV, RIB e Emulsigen®	01	0	0	0	0				
		02	0	0	8	32				
		03	0	0	4	8	32	8 (3 log2)	32	32 (5 log2)
		04	0	2	4	4	32			
		05	0	0	16	16				
7	Vacina I (Experimental) Composição: DBV, RIB e Al(OH) ₃	01	T	4	4	16				
		02	T	4	8	8				
		03	T	4	4	8	16	8 (3 log2)	16	8 (3 log2)
		04	T	0	0	0	0			
		05	T	4	8	8				

T: Efeito tóxico devido a problemas na coleta de sangue (hemólise); * Composição: DBV, RIB, Parainfluenza-3, Vírus Respiratório Sincicial Bovino e bacterinas de *Leptospira pomona*, *Leptospira hardjo*, *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira canicola*, *Leptospira icterohaemorrhagiae* e Al(OH)₃ como adjuvante; ↓ Revacinação

Tabela 9: Títulos individuais e medianas de anticorpos contra a Rinotraqueíte Infecciosa Bovina, obtidos na primeira, segunda, terceira e quarta sorologias, em coelhos vacinados e revacinados com as vacinas testadas.

Grupo	Vacina	Coelhos	Dia 14	Mediana	↓ Dia 28	Mediana	Dia 42	Mediana	Dia 56	Mediana
1	Vacina VI (comercial)*	01	-		16		16		128	
		02	2		8		8		16	
		03	2	2 (1 log2)	2	4 (2 log2)	8	16 (4 log2)	32	32 (5 log2)
		04	2		4		16		32	
		05	2		4		32		32	
2	Vacina V (comercial) Composição: DBV, RIB e emulsão oleosa	01	8		8		32		32	
		02	2		8		8		16	
		03	2	2 (1 log2)	8	8 (3 log2)	8	8 (3 log2)	32	32 (5 log2)
		04	0		8		8		32	
		05	2		2		16		16	
3	Vacina IV (Experimental) Composição: RIB e Emulsigen®	01	0		4		8		8	
		02	0		4		4		0	
		03	0	0	2	4 (2 log2)	32	16 (4 log2)	32	32 (5 log2)
		04	0		-		16		256	
		05	4		4		32		32	
5	Vacina III (Experimental) Composição: RIB e Al(OH) ₃	01								
		02	0		8		32		32	
		03	0	0	16	8 (3 log2)	32	32 (5 log2)	32	32 (5 log2)
		04	0		4		16		16	
		05	8		8		64		64	
6	Vacina II (Experimental) Composição: DBV, RIB e Emulsigen®	01	0		4		32		32	
		02	2		4		32		64	
		03	2	0	4	4 (2 log2)	128	32 (5 log2)	128	64 (6 log2)
		04	0		8		64		64	
		05	0		4		32		32	
7	Vacina I (Experimental) Composição: DBV, RIB e Al(OH) ₃	01	T		32		32		128	
		02	T		4		8		32	
		03	T	-	2	4 (2 log2)	32	32 (5 log2)	128	128 (7 log2)
		04	T		4		4		64	
		05	T		4		128		256	

T: Efeito tóxico devido a problemas na coleta de sangue (hemólise); * Composição: DBV, RIB, Parainfluenza-3, Virus Respiratório Sincicial Bovino e bacterinas de *Leptospira pomona*, *Leptospira hardjo*, *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira canicola*, *Leptospira icterohaemorrhagiae* e Al(OH)₃ como adjuvante; ↓ Revacinação

Os animais do grupo 2, vacinados com a vacina V não desenvolveram nenhum tipo de resposta por anticorpos contra o vírus da DBV (Tabela 8). Provavelmente este vírus apresentava-se, nesta vacina, com um título muito baixo ou perdeu suas características

antigênicas no momento da inativação. Os animais do grupo 2 foram excluídos das análises da resposta dos animais ao vírus da DBV e essa vacina foi considerada monovalente (só contendo vírus da RIB).

No dia 14 foi observado que nenhum dos coelhos apresentava anticorpos contra o vírus da DBV e que apenas os vacinados com as vacinas comerciais (V e VI) produziram anticorpos contra o vírus da RIB (Figura 5). Nesta data, quando analisadas separadamente as vacinas monovalentes e polivalentes em relação ao vírus da RIB,

não foi observada diferença estatística significativa entre os grupos. Quando analisadas separadamente as vacinas com $Al(OH)_3$ como adjuvante e as vacinas que utilizavam adjuvantes oleosos, não foi observada diferença estatística significativa em relação a nenhum dos dois vírus.

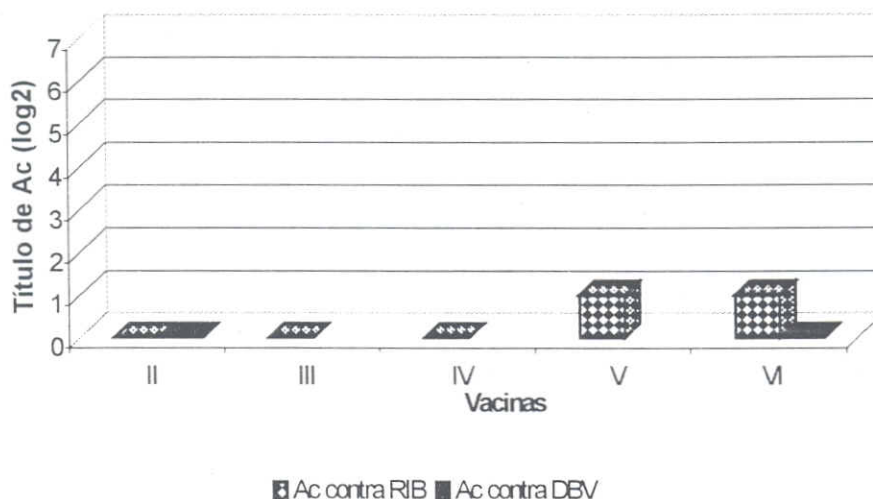


Figura 5: Medianas dos títulos de anticorpos contra a Diarréia Bovina a Vírus e a Rinotraqueite Infecciosa Bovina, obtidas a partir da primeira sorologia dos coelhos (dia 14), após a vacinação com as vacinas testadas.

No dia 28, não foi observada diferença estatística significativa entre os animais vacinados com as vacinas em relação a produção de anticorpos contra a DBV ou a RIB (Figura 6). Em todos os grupos, pelo menos dois animais já apresentavam anticorpos contra os dois vírus. Quando analisadas separadamente as vacinas monovalentes e polivalentes em relação ao

vírus da RIB, não foi observada diferença estatística significativa entre os grupos. Quando analisadas separadamente as vacinas com $Al(OH)_3$ como adjuvante e as vacinas que utilizavam adjuvantes oleosos, não foi observada diferença estatística significativa em relação a nenhum dos dois vírus, 28 dias após a vacinação.

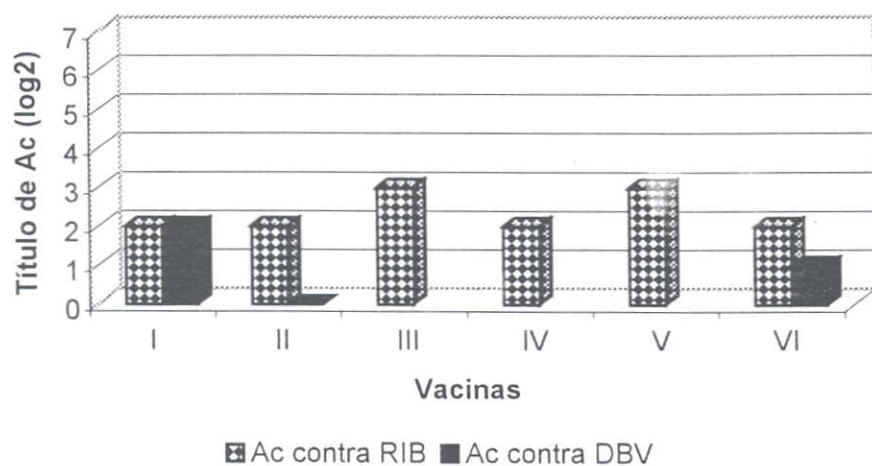


Figura 6: Medianas dos títulos de anticorpos contra a Diarréia Bovina a Vírus e a Rinotraqueíte Infecciosa Bovina obtidos a partir da segunda sorologia dos coelhos (dia 28) após a vacinação com as vacinas testadas.

Todos os grupos apresentaram um aumento na produção de anticorpos produzidos contra os vírus da DBV e RIB a partir da administração da segunda dose da vacina (Figuras 7 e 8).

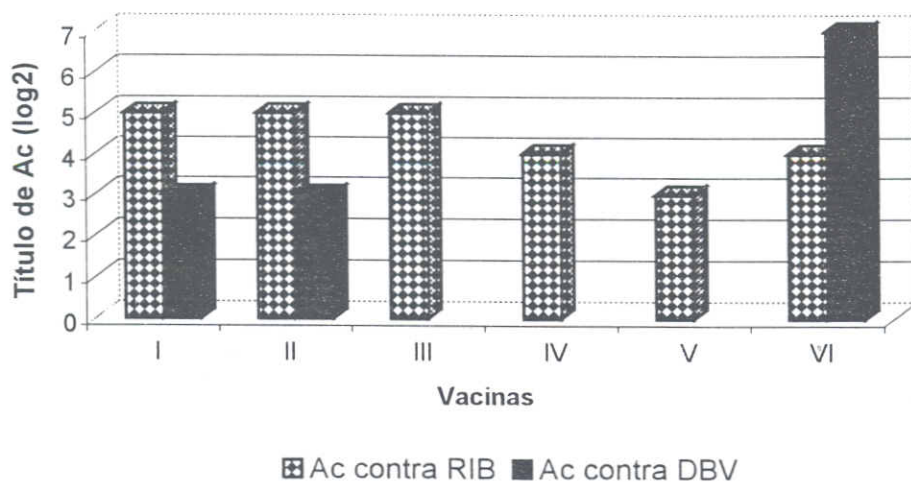


Figura 7: Medianas dos títulos de anticorpos contra a Diarréia Bovina a Vírus e a Rinotraqueíte Infecciosa Bovina obtidos a partir da terceira sorologia dos coelhos (dia 42) após a vacinação com as vacinas testadas.

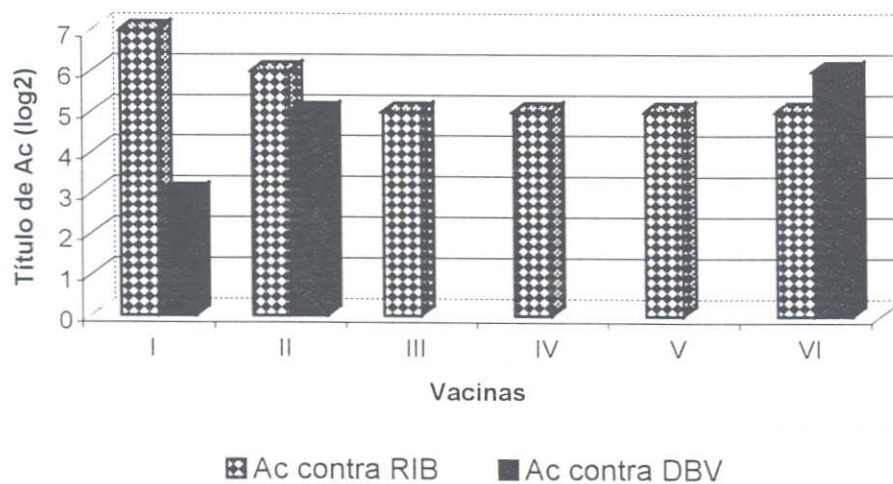


Figura 8: Medianas dos títulos de anticorpos contra a Diarréia Bovina a Vírus e a Rinotraqueíte Infecciosa Bovina obtidos a partir da quarta sorologia dos coelhos (dia 56) após a vacinação com as vacinas testadas.

No dia 42, analisando as vacinas no que diz respeito à produção de anticorpos tanto para a DBV quanto para a RIB, pode-se inferir que:

em relação ao vírus da DBV, observou-se diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) entre os grupos, sendo os maiores títulos de anticorpos contra este vírus atribuídos aos animais vacinados com a vacina VI (mediana 128) e o menor, aos vacinados com as vacinas I e II (mediana 8). Todos os grupos apresentaram um aumento no título de anticorpos produzidos a partir da segunda vacinação. Os animais vacinados com a vacina VI, apresentaram uma mediana de título de anticorpos no dia 42 cinco vezes maior que a apresentada no dia 28. Em relação ao vírus da RIB, quando analisadas todas as vacinas, a partir da análise estatística, não foi observada diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os grupos testados no que diz respeito à produção de anticorpos. Foram observados pela mediana dos resultados de cada grupo, títulos de anticorpos de 64 (vacinas III, II e I), 32 (vacinas VI e IV) e 16 (vacina V). Em relação aos coelhos vacinados com a vacina V, não foi observado aumento no título de anticorpos até 14 dias após a segunda vacinação. Entre as vacinas que utilizaram adjuvantes oleosos foi observada diferença estatística ($p \leq 0,05$) entre os animais

vacinados com as vacinas V e II, sendo que os vacinados com a vacina II apresentaram títulos de anticorpos mais elevados. Os coelhos vacinados com a vacina V foram os únicos que não responderam rapidamente ao segundo estímulo vacinal.

Quando a resposta às vacinas monovalentes e polivalentes contra o vírus da RIB foi analisada separadamente no dia 42, não foi observada diferença estatística significativa na produção de anticorpos.

No dia 56, em relação ao vírus da DBV, observou-se, novamente, diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) entre os grupos, sendo os maiores títulos de anticorpos contra DBV atribuídos aos animais vacinados com a vacina VI e o menor, aos vacinados com a vacina I. Como foi dito anteriormente, no dia 42 os animais vacinados com a vacina VI, apresentaram uma mediana de título de anticorpos cinco vezes maior que a apresentada no dia 28. Entretanto, no dia 56 observou-se uma redução na mediana de título de anticorpos, de 128 para 64.

Com relação ao vírus da RIB no dia 56, a partir da análise estatística, não foi observada diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os grupos testados quando comparadas todas as vacinas. Os coelhos

vacinados com a vacina I apresentaram o maior título de anticorpos (mediana de 128), seguidos dos vacinados com a vacina II (mediana de 64) e dos vacinados com as vacinas VI, V, IV e III (mediana de 32).

Quando as respostas às vacinas monovalentes contra o vírus da RIB foram analisadas separadamente, não foi observada diferença estatística significativa na produção de anticorpos em nenhum dos dias estudados. Todos os grupos vacinados com estas vacinas apresentaram a mesma mediana de produção de anticorpos. Em relação a resposta às vacinas polivalentes contra o vírus da RIB no dia 56, analisando-a separadamente, foi observada diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) na produção de anticorpos entre os grupos observando-se uma maior mediana nos coelhos vacinados com a vacina I e a menor nos animais vacinados com a vacina VI, no dia 56.

Entre as vacinas que utilizaram o $Al(OH)_3$ como adjuvante não foi observada diferença estatística no dia 56 em relação à produção de anticorpos contra o vírus da RIB, apesar de os animais vacinados com a vacina I, apresentarem um título de anticorpos mais elevado que os animais vacinados com as outras vacinas com $Al(OH)_3$. Neste dia não foi observada diferença estatística ($p \leq 0,05$) significativa entre os grupos vacinados com vacinas com adjuvantes oleosos.

Após a revacinação, foi observada diferença estatística ($p \leq 0,05$) entre o título de anticorpos dos coelhos vacinados com as vacinas I e VI em relação a resposta ao vírus da DBV, sendo o melhor resultado observado nos coelhos vacinados com a vacina VI e o pior nos coelhos vacinados com a vacina I. Esta observação foi contrária ao que aconteceu em relação à mediana de produção de anticorpos contra o vírus da RIB, sendo a maior mediana encontrada nos coelhos vacinados com a vacina I e a menor nos coelhos vacinados com a vacina VI. A diferença entre as respostas dos coelhos aos vírus da RIB e DBV pode dever-se, além das diferenças

encontradas na composição antigênica de cada vacina, ao título da suspensão inativada de DBV e RIB na vacina e à concentração do adjuvante empregado, no caso o $Al(OH)_3$. A vacina VI era uma vacina comercial com concentração de $Al(OH)_3$ e título viral desconhecidos. Sabe-se que a eficiência do $Al(OH)_3$ como adjuvante depende da concentração e da adsorção dos antígenos ao gel, que no caso da vacina I foi satisfatório, de acordo com a OMS. Concentrações muito altas ou muito baixas de $Al(OH)_3$ podem levar a uma redução na estimulação da resposta imunológica (Bomford, 1997). Visto que este mesmo autor afirma que a concentração ótima de $Al(OH)_3$ não varia de acordo com a quantidade de cada antígeno na vacina, e sim de acordo com o antígeno, a diferença encontrada entre as respostas dos coelhos vacinados com as vacinas I e VI em relação à produção de anticorpos contra o vírus da DBV e RIB ocorreu, provavelmente, devido à concentração de adjuvante empregada na produção de cada uma delas.

Dentre as vacinas que apresentaram adjuvantes oleosos em sua composição, os melhores resultados em relação ao título de anticorpos contra a RIB produzidos nos coelhos, nos dias 42 e 56, foi observado nos animais vacinados com a vacina II.

Em relação a resposta dos coelhos ao vírus da RIB entre as vacinas monovalentes, o perfil de ascendência da curva de crescimento de anticorpos foi o mesmo para todas as vacinas e, no dia 56, a mediana de resposta às três vacinas foi a mesma. Levando-se em consideração que cada uma delas apresentava em sua composição adjuvantes distintos, pode-se inferir que estes achados não concordam com alguns dados da literatura que dizem que cada classe de adjuvantes induz a um perfil de resposta distinto (Figura 9). Este perfil caracteriza-se por uma resposta imediata e forte nas vacinas que utilizaram o $Al(OH)_3$ como adjuvante, sendo a revacinação pouco eficaz e, no caso dos adjuvantes oleosos, uma resposta forte e mais tardia (Abbas et al, 1994; Gupta et al, 1995; Cox & Counter, 1997).

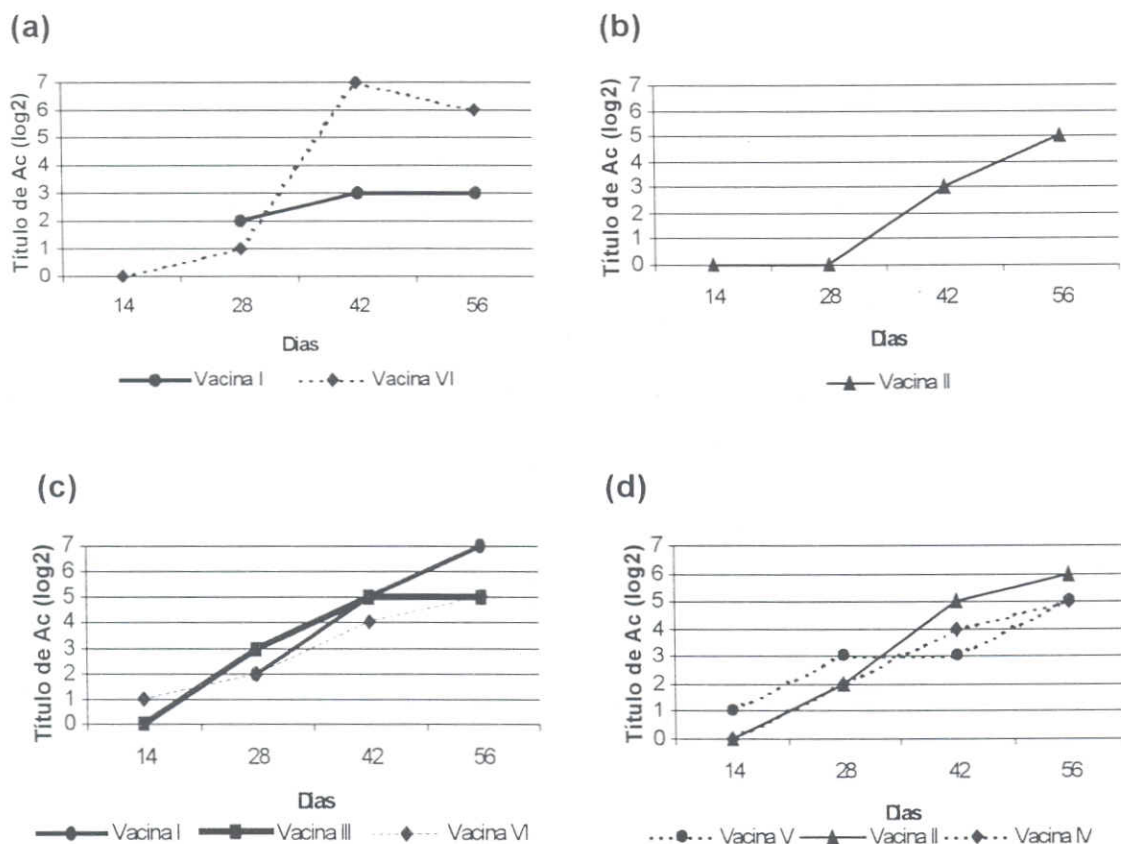


Figura 9: Perfil de produção de anticorpos contra a Diarréia Bovina a Vírus e a Rinotraqueíte Infecciosa Bovina em coelhos vacinados com as vacinas testadas. (a) anticorpos contra DBV produzidos em coelhos pela inoculação de vacinas que utilizam o $Al(OH)_3$ como adjuvante; (b) anticorpos contra DBV produzidos em coelhos pela inoculação de vacinas que utilizam adjuvantes oleosos; (c) anticorpos contra a RIB produzidos em coelhos pela inoculação de vacinas que utilizam o $Al(OH)_3$ como adjuvante; (d) anticorpos produzidos em coelhos pela inoculação de vacinas que utilizam o adjuvantes oleosos.

A partir da análise da resposta dos coelhos às vacinas, pode-se observar que as medianas de títulos de anticorpos contra a RIB foi sempre superior quando as vacinas continham os vírus da RIB e da DBV (vacinas polivalentes) em relação às vacinas que continham apenas os vírus da RIB (vacinas monovalentes), independente do adjuvante utilizado no preparo das mesmas.

A partir da análise destes dados pode-se constatar que, dentre as vacinas experimentais, mesmo sem levar em consideração a existência ou não de diferenças estatísticas em relação à eficiência dessas em estimular a produção de anticorpos contra os vírus da DBV e RIB em coelhos, que o melhor resultado, no

último dia do experimento (dia 56), foi observado nos animais vacinados com a vacina II (DBV, RIB e Emulsigen® como adjuvante) em relação ao vírus da DBV e, nos animais vacinados com a vacina I (DBV, RIB e $Al(OH)_3$ como adjuvante) em relação ao vírus da RIB.

4.4.2. Teste de potência em bovinos

Apesar de não ter sido observada uma melhor produção de anticorpos contra a DBV e a RIB a partir da administração de uma das vacinas experimentais em coelhos, o teste de potência em bovinos foi feito através da vacinação de bovinos com a vacina II. Esta vacina foi selecionada pelo fato de já existirem diversos trabalhos na

literatura que descrevem a eficiência de vacinas contra estes agentes utilizando o $Al(OH)_3$ como adjuvante em bovinos (Tabelas 1 e 2).

Sabe-se que os adjuvantes oleosos promovem uma resposta imunológica mais forte que o $Al(OH)_3$. Entretanto, são de difícil administração e, muitas vezes, causam abscessos no local da injeção (Cox & Counter, 1997). O Emulsigen® segundo o fabricante, induz níveis significantes de IL-12, IL-14 e $IFN-\gamma$ no baço de camundongos e não são observados os efeitos colaterais associados aos adjuvantes oleosos, enquanto continua promovendo uma resposta imunológica forte. A ausência de efeitos colaterais deve-se à redução na quantidade de óleo no produto final. Devido

as características deste adjuvante e de não existirem trabalhos na literatura que relatem a eficiência deste em vacinas contra estes agentes, os testes foram realizados em bovinos utilizando esta vacina.

O teste foi realizado de acordo com as normas internacionais descritas no "Code of Federal Regulations" (2001) pelo fato de que, até o presente momento, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) não ter nenhum protocolo para o controle oficial de vacinas contra a RIB e DBV.

Os resultados obtidos a partir das vacinações dos bovinos com a vacina II estão ilustrados nas Tabelas 10 e 11 e na Figura 10.

Tabela 10: Títulos individuais e medianas de anticorpos contra a Rinotraqueíte Infecciosa Bovina, obtidos na primeira, segunda e terceira sorologias, em bovinos vacinados e revacinados com a vacina II.

Animal	↓ Dia 0	Dia 14	Mediana	↓ Dia 28	Mediana	Dia 42	Mediana
30	0	4		8		16	
34	0	4		8		128	
17	0	0	4	4	8	64	64
27	0	2	(2 log2)	2	(3 log2)	32	(6 log2)
15	0	4		8		64	
20*	0	0		0		0	
13*	0	0		0		0	
48*	0	0	0	0	0	0	0
23*	0	0		0		0	

* Animais não vacinados; ↓ Vacinação.

Tabela 11: Títulos individuais e medianas de anticorpos contra a Diarréia Bovina a Vírus, obtidos na primeira, segunda e terceira sorologias, em bovinos vacinados e revacinados com a vacina II.

Animal	↓ Dia 0	Dia 14	Mediana	↓ Dia 28	Mediana	Dia 42	Mediana
30	0	2		8		64	
34	0	2		8		128	
17	0	0	2	8	8	16	64
27	0	2	(2 log2)	8	(3 log2)	64	(6 log2)
15	0	0		4		8	
20*	0	0		0		0	
13*	0	0		0		0	
48*	0	0	0	0	0	0	0
23*	0	0		0		0	

* Animais não vacinados; ↓ Vacinação.

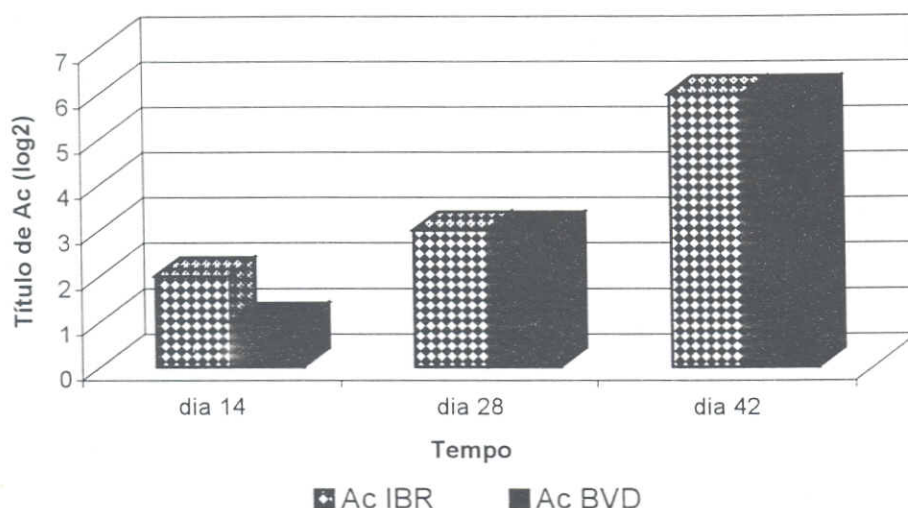


Figura 10: Medianas dos títulos de anticorpos contra a Rinotraqueíte Infecciosa Bovina e a Diarréia Bovina a Vírus, obtidos na primeira, segunda e terceira sorologias em bovinos vacinados com a vacina II.

A partir da análise das Tabelas 10 e 11, observou-se que apenas o animal 17 não respondeu a nenhum dos vírus na primeira vacinação e o animal 15 não respondeu ao vírus da DBV na primeira vacinação o que, provavelmente aconteceu, devido a variações individuais, tais como o status imunológico, resistência ao stress, resistência genética natural de cada animal, entre outros.

Os títulos de anticorpos obtidos pela vacinação de bovinos com a vacina II são superiores aos encontrados em coelhos após a administração da segunda dose da vacina (dia 42) principalmente quando observa-se a mediana de produção de anticorpos contra o vírus da DBV.

Os títulos de anticorpos produzidos pelos bovinos 14 dias após a segunda vacinação foram considerados protetores, segundo o "Code of Federal Regulations" (2001) que recomenda que, para que os testes e a vacina sejam validados, quatro dos cinco bovinos testados devem ter títulos de anticorpos maiores ou iguais a 8 pelo menos 14 dias após a segunda vacinação. Esta condição foi alcançada 28 dias após a primeira vacinação para o vírus da DBV. Quatorze dias após a segunda vacinação, os títulos de anticorpos variaram de 16 a

128 e 8 a 128 para a RIB e DBV, respectivamente. Dentre os bovinos não vacinados (20, 13, 48, 23), não foram observados anticorpos contra os dois vírus no decorrer do experimento, condição também necessária para que o teste de potência seja validado.

A partir da administração da segunda dose da vacina, foi observado um aumento de oito vezes na mediana de anticorpos dos bovinos em relação aos vírus da DBV e RIB quando comparada a mediana observada no dia da revacinação. Estes achados concordam com o fato de que faz-se necessária a aplicação de uma segunda dose de vacinas inativadas contra estes vírus para aumentar a sua eficiência (Fernelius et al, 1972; Howard et al, 1984; Zuffa et al, 1984; Kelemen et al, 1987; Fulton et al, 1995; Islas et al, 1995; Popsil, et al; 1996; Odendaal, et al, 1997; Castrucci et al, 2002). Fulton et al (1995) e Castrucci et al (2000) demonstraram que a eficiência de vacinas vivas contra a DBV e RIB também melhora a partir da administração da segunda dose. Straub & Mawhinney (1988), Frankena, et al (1994) e Barrera et al (1996) observaram que duas doses das vacinas são suficientes para conferir proteção duradoura aos bovinos contra a infecção por estes vírus, mediante a

vacinação de bovinos com vacinas inativadas trivalentes (RIB, DBV e BRSV) e monovalentes (RIB) utilizando dois esquemas de vacinação, sendo um deles com três vacinações e o outro com duas.

A mediana de produção de anticorpos contra o vírus da DBV observada 14 dias após a segunda vacinação com a vacina II foi de 64, similar à média observada por Mascoschey et al (2001) que após revacinarem quatro bovinos com uma vacina inativada comercial contra a DBV, encontraram títulos de anticorpos que variavam entre 32 e 128 e desafiá-los com uma amostra virulenta do vírus pertencente a outro subtipo e compará-los com animais não vacinados, constataram que os sinais clínicos observados nos animais vacinados não apareciam ou apareciam com um grau de severidade muito menor que nos animais não vacinados. Brownlie et al (1995), testando uma vacina inativada contra a DBV em animais gestantes, demonstraram que a vacina protegeu os animais contra viremia e, aparentemente, 100% dos fetos estavam protegidos da DBV após a administração da vacina por duas ou três vezes e desafio destes animais com uma amostra virulenta do vírus.

A mediana de produção de anticorpos contra o vírus da RIB 14 dias após a segunda vacinação com a vacina II foi de 64, superior a encontrada por Odendaal et al (1997) que observaram uma média de produção de anticorpos de 16 após a segunda vacinação com uma vacina monovalente contra a RIB. A média de título de anticorpos observada por Zuffa et al (1994) após a revacinação de bovinos com uma vacina inativada oleosa contra o vírus da RIB variou entre 128 e 256, superior a encontrada após a revacinação com a vacina II. Zuffa et al (1994) observaram, após o teste de desafio direto, que os bovinos estavam tanto protegidos clinicamente quanto observaram que as membranas mucosas do trato respiratório superior destes animais apresentavam-se resistentes a infecção.

A média de título de anticorpos contra o vírus da RIB observada por Pospisil et al

(1996) foi similar à observada nos bovinos vacinados com a vacina II. Eles observaram uma média de produção de anticorpos que variou entre 32 e 128 após a segunda vacinação de animais gestantes com uma vacina oleosa monovalente contra a RIB e, após o teste de desafio direto dos bovinos vacinados, observaram que todos os animais estavam protegidos da infecção e que os animais nascidos destas vacas eram soronegativos.

Alguns autores relatam a eficiência de vacinas inativadas contra a RIB em animais com infecções latentes (Meyer et al, 1985; Pastoret & Thiry, 1985) e em animais soropositivos (Zuffa et al, 1984; Barrera et al, 1996).

Sabe-se que as vacinas vivas, especialmente as virais, agem como antígenos endógenos e tendem a induzir respostas apropriadas às infecções por vírus, especialmente respostas celulares mediadas por linfócitos T citotóxicos. As vacinas inativadas, geralmente, agem como antígenos exógenos e disparam respostas imunes mediadas por anticorpos (Abbas et al, 2000; Tizard, 1996). A partir das observações dos autores citados anteriormente em relação à proteção conferida a bovinos vacinados com vacinas inativadas contra a DBV e a RIB e do título de anticorpos produzidos após a vacinação de bovinos com a vacina II em relação aos vírus da DBV e RIB, pode-se inferir que, de alguma forma, as vacinas inativadas protegem os animais da infecção por estes vírus, provavelmente nos estágios da infecção em que a imunidade mediada por anticorpos é importante como, por exemplo na infectividade do vírus e na disseminação do vírus célula a célula (Babuik et al 1996). Os mecanismos pelas quais as vacinas inativadas podem proteger animais vacinados com vacinas inativadas de infecções virais podem ser: títulos altos de anticorpos neutralizando partículas virais extracelulares, citotoxicidade dependente de anticorpos, ativação do complemento pela via clássica, entre outros.

Fulton et al (1995) e Castrucci et al (2002), constataram, analisando a eficiência de

vacinas vivas e inativadas contra a DBV e RIB e RIB, respectivamente, que, na maioria das vezes, as vacinas vivas induzem a um nível maior de anticorpos, com imunidade mais duradoura. Entretanto, deve-se levar em consideração que as vacinas inativadas são muito mais seguras que as vivas e podem induzir, também, a imunidade celular inespecífica visto que, após o teste de desafio direto, vários autores observaram que os animais vacinados com vacinas inativadas contra a RIB e a DBV estavam protegidos da infecção por esse vírus (Tabelas 1 e 2). No caso da DBV, a vacina deve ser segura para animais gestantes, em diferentes estágios de gestação, e as vacinas vivas atenuadas têm a capacidade de cruzar a barreira transplacentária e infectar o feto (Kamstrup et al, 1999). Além disto, após a administração de vacinas vivas, podem ocorrer doença pós vacinal, DM em animais PI, falhas reprodutivas, imunossupressão e recombinações genéticas causados pelo vírus vacinal. Este tipo de reação não é observado após a administração de vacinas inativadas (Bolin, 1995). As vacinas vivas contra a RIB têm a capacidade de estabelecer ou reativar vírus que estão em estado de latência. Além disto, algumas linhagens podem ser patogênicas para animais jovens ou induzir abortos em animais gestantes (Thiry, et al, 1985; Jones et al, 2000). Frerichs et al (1982), a partir de um estudo comparativo entre três vacinas contra o vírus da RIB (duas vivas modificadas e uma inativada), observaram um aumento na temperatura retal, leve descarga ocular e isolaram o vírus de amostras de swabs nasais dos animais vacinados com as vacinas vivas e nenhum dos animais vacinados com a vacina inativada apresentou estes sinais. Os bovinos vacinados com a vacina II não apresentaram nenhum dos sinais descritos por Frerichs et al (1982), Bolin (1995) e kamstrup et al (1999).

A partir da observação de que os níveis de anticorpos encontrados após a vacinação dos bovinos com a vacina II foram considerados satisfatórios, das observações das características do Emulsigen® e dos adjuvantes oleosos de uma forma geral, como descrito anteriormente, e das

comparações com dados da literatura, pode-se constatar que a vacina II (DBV, RIB e Emulsigen® como adjuvante) ofereceria proteção à bovinos vacinados com relação a infecção natural pelos vírus da RIB e DBV e ao teste de desafio direto destes bovinos.

Um estudo comparativo sobre a interferência imunológica entre respostas por anticorpos a vacinas monovalentes e polivalentes, incluindo os vírus da RIB e DBV, demonstrou não haver diferença entre as respostas a estes antígenos associados ou individualmente inoculados em bovinos (Laboratórios Pfizer, MT, 1997). Tendo em vista serem estes vírus causadores de doenças respiratórias e reprodutivas, a ausência de interferência imunológica entre eles e o fato de os esquemas de vacinação recomendados serem praticamente os mesmos para as duas doenças, o ideal é utilizar vacinas que contenham os vírus da DBV e RIB. Devido à alta prevalência da RIB e da DBV no Brasil e aos prejuízos reprodutivos a elas associados, o ideal é vacinar novilhas após os seis meses de idade e revaciná-las antes da cobertura ou aos 18 meses. Essa vacinação não confere imunidade total e duradoura, mas minimiza a sintomatologia clínica, evitando prejuízos (Leite, 1999).

Segundo o Manual de Produtos Veterinários (2001–2002), no Brasil, atualmente, são comercializadas uma vacina inativada oleosa contra a RIB e dez vacinas combinadas contra a DBV e a RIB e outros agentes, geralmente PI-3 e VSB. Dentre as dez vacinas combinadas, nove apresentam todos os antígenos inativados e uma apresenta os vírus da RIB vivos, quimicamente alterados (amostra RLB 106), e os vírus da DBV inativados. Em todas essas vacinas utilizam-se diferentes tipos de adjuvantes e inativantes. Dentre os adjuvantes, o mais comumente utilizado é o $Al(OH)_3$. Apenas uma destas dez vacinas utiliza adjuvante oleoso em sua composição. A amostra vacinal termossensível (RLB 106) do vírus da RIB replica-se apenas ao nível da mucosa do trato respiratório superior de bovinos, que apresenta temperatura mais baixa que a temperatura corporal (Melo et al, 1996). Estes autores fizeram uma revisão

dos trabalhos de eficácia e segurança dessa amostra em vacinas comerciais e constataram não haver, em campo ou em condições experimentais, reversão de virulência, perda de peso, aborto, diminuição da produção de leite ou isolamento do vírus de órgãos de animais mortos ou abortados. Além disso, foi constatado que esta amostra induz a respostas celulares, não suprime o sistema imune e dispara respostas por anticorpos superiores à provocada por vacinas inativadas.

Os resultados observados a partir da vacinação dos coelhos com a vacina V (vacina comercial) (item 4.4.1.2), o grande número de vacinas disponíveis no mercado brasileiro contra estes agentes e a alta prevalência destas doenças no Brasil (Galvão et al, 1963; Wiziemann et al, 1972; Mueller et al, 1979; Mueller et al, 1981; Lovato et al, 1985; Ravazollo et al, 1989; Vidor et al, 1995; Lage et al, 1996; Lemos, 1998; Melo, 1998), sugerem que o MAPA brasileiro estabeleça protocolos para o controle oficial destas vacinas.

Sabe-se que a forma não citopatogênica do vírus da DBV é a predominante na natureza e é a mais observada em isolamentos de bovinos infectados (Bolin & Ridpath, 1992). Entretanto, apenas duas das vacinas comercialmente disponíveis no Brasil apresentam, em sua composição, a forma não citopatogênica e a citopatogênica do vírus da DBV. Sabe-se que a maioria das proteínas antigênicas encontradas na forma não citopatogênica estão presentes na forma citopatogênica e que, observa-se reação sorológica cruzada entre as dois biótipos (Radostis & Littlejohns, 1988). Entretanto, analisando-se painéis de anticorpos monoclonais, observa-se que existem diferenças entre partes de algumas proteínas destes dois biótipos (Carman et al, 1996). Sugere-se portanto, a partir dessa observação que a vacina seja composta pelos dois biótipos do vírus da DBV.

5. CONCLUSÕES

- 1) O adjuvante de EM, nestas formulações, não é estável quando suspensões complexas são incorporadas à fase interna.
- 2) A vacina II é eficiente para proteger bovinos contra a Diarréia Bovina a Vírus e a Rinotraqueíte Infecciosa Bovina quando observadas as normas do "Code of Federal Regulations" (2001) e quando comparados a dados da literatura.
- 3) São necessárias duas doses da vacina II para induzir títulos de anticorpos em níveis protetores de acordo com o "Code of Federal Regulations" (2001).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. *Cellular and molecular immunology*. 4.ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 2000.
- ACCKERMAN, M.; PETERHANS, E.; WYLER, R. DNA of bovine herpesvirus type I and trigeminal ganglia of latency infected calves. *Am. J. Vet. Res*, v. 43, p. 36-40, 1982.
- ALFIERI, A.A. Rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR): epidemiologia, imunologia e imunoprofilaxia: *Laboratórios Pfizer - Divisão Saúde Animal* (Atualização Técnica - nº 46).
- ALICE, F.J. Isolamento do vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) no Brasil (nota prévia). *Rev Bras Biol*, v. 38, n. 4, p. 919-920, 1978.
- ANDRADE, G.I. *Padronização da metodologia utilizada nas técnicas de imunoperoxidase em monocamadas de células e imunohistoquímica para diagnóstico da DBV*. 2001. nf. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária).- Escola de Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

- BABIUK, L. A.; VAN DRUDEN LITTEL-VAN DEN HURK, S.; TIKOO, S. K. Immunology of bovine herpesvirus 1 infection. *Vet. Microbiol.*, v. 53, p.31-42, 1996.
- BAKER, J.C; HOUE, H. Bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Clin. North Am*, v.11, n.3, 1995.
- BARBOSA, E.F. Diagnóstico da Diarréia Bovina a Vírus. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.23, n.4, p.508-515, 1999.
- BARRERA, M.; NODA, J.; NÚÑEZ, A.; et. Al. Evaluacion de una vacuna inactivada contra el virus IBR/IPV. II Vacunacion de sementales. *Rev. Salud Anim*, v. 18, n.3, p.145-150, 1996.
- BIELEFEIDT-OHMANN, H. The pathogenesis of bovine viral diarrhoea virus infection: a window on the pathogenesis. *Vet Clin North Am*, v. 11, n. 3, p. 447-476, 1995.
- BITSCH, V.; HANSEN, K.E.L.; RONSHOLT, L. Experience from the denish program for eradication of bovine virus diarrhoea (BVD) 1994-1998 with especial reference to legislation and causes of infection. *Vet. Mic*, v.77 ,p. 137-143, 2000.
- BITSCH, V.; RONSHOLT, L. Control of bovine viral diarrhoea infection without application of vaccines. *Vet. Clin. North Am*, v.11, n.3, p.627-640, 1995.
- BOLIN, S.R. Control of bovine virus diarrhoea virus by use of vaccination. *Vet. Clin. North Am.*, v. 11, n. 3, p. 615-625, 1995.
- BOLIN, S.R.; RIDPATH, J.F. Differences in virulence between two noncytotoxic bovine viral diarrhoea viruses in calves. *Am. J. Vet. Res.* v. 53, p. 2157-2163, 1992.
- BOMFORD, R. Adjuvants in veterinary vaccines. In: MOWAT, N.; RWEYEMAMU, M. *Vaccine manual: the production and quality control of veterinary vaccines for use in developing countries*. Roma: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1997, p.277-284 (n.35).
- BRODERSON, J.R. A retrospective review of lesions associated with the use of Freund's adjuvant. *Laboratory Animal Science*, v. 39, n. 5, p. 400-405, 1989.
- BROWNLIE, J; CLARKE, M. C.; HOOPER, L. B.; et al. Protection of the bovine fetus from bovine viral diarrhoea virus by means of a new inactivated vaccine. *Vet. Rec.*, v. 137, p. 58-62, 1995.
- BROWNLIE, J.; EDWARDS, S. Bovine viral diarrhoea. In: *Manual of standards for diagnostic test and vaccines*. 4. ed.: OIE, 2000. cap. X.5.
- CARMAN, S.; VAN DRUEMEL, T.; HAZLETT, M. et al. A diagnostic laboratory in the middle of an acute outbreak of BVDV. In: *International Symposium Bovine Viral Diarrhoea Virus: a 50 year review*. Cornell University, 1, 1996. p.79-88.
- CASTRUCCI, G.; FRIGERI, F.; SALVATORI, D.; et al. Vaccination of calves against bovine herpesvirus-1: assessment of the protective value of eight vaccines. *Comp. Immun., Mic. Inf. disease*, v. 25, p.29-41, 2002.
- CHAPEK, M.L.; McCLAUGHRY, L.E.; WILKINS, L.M. Evaluation of a bovine virus diarrhoea vaccine. *Modern Veterinary Practice*. p. 755-757, 1978
- CODE of Federal Regulations. Animals and Animal products Disponível em: <<http://squid.law.cornell.edu/get-cfr.cgi>>. em: 29/12/2001.
- COX, J.X.; COUTER, A.R. Adjuvants – a classification and review of their modes of action. *Vaccine*, v. 15, n. 3, p. 248-256, 1997.
- CUNHA, A.S.; GONTIJO, M.M. Emulsões múltiplas: potenciais adjuvantes no desenvolvimento de medicamentos, vacinas e cosméticos. *Pharmaceutical Technology Brasil*, v. 5, n. 5, p. 62-65, 2000 ...

- CUNHA, A.S.; GROSSIORD, J.L.; SEILLER, M. The formulation and industrial applications of multiple emulsions: an area of fast development. In: KARSA, D. R. (Ed). *New Products and applications in surfactants technology*. Inglaterra: Sheffield Academic, 1998. Cap.9, p.205-225.
- DEREGT, D.; LOEWEN, K.G. Bovine viral diarrhea virus: biotypes and disease. *Can. Vet. J.* v.36, p. 371-378, 1995.
- DUBOVI, E.J. Impact of bovine viral diarrhea on reproductive performance in cattle. *Vet. Clin. North Am.*, v.10, n.3, p. 503-513, nov. 1994.
- FENNER, F.; et al. *Veterinary virology*, New York: Academic, 1987. 659p.
- FERNELIUS, A.L.; CLASSICK, L.G.; SMITH, R.L. Evolution of β -propiolactone-inactivated and chloroform-treated-virus vaccines against bovine viral diarrhea-mucosal disease. *Am. J. Vet. Res.*, v. 33, n. 7, p. 1421-1431, 1972.
- FRANÇA, J.L.; BORGES, S.M.; VASCONCELLOS, A.C.; et al. *Manual para normalização de publicações técnico científicas*. 4 ed. Belo Horizonte: UFMG, 1998. 213p.
- FRANKENA, K.; KLAASSEN, C.H.L.; BOSCH, J.C.; et al. Double blind field evaluation of a trivalent vaccine against respiratory disease in veal calves. *Vet. Quart.*, v. 16, n. 3, p. 148-152, 1994.
- FULTON, R.W.; CONFER, A. W.; BURGE, L. J.; et al. Antibody responses by cattle after vaccination with comercial viral vaccines containing bovine herpesvirus-1, bovine viral diarrhea virus, parainfluenza-3 virus, and bovine respiratory syncytial virus immunogens and subsequent revaccination at day 140. *Vaccine*, v. 13, n. 8, p.725-733, 1995.
- GALVÃO, C.L.; DÓRIA, J.D.; ALICE, F.J. Anticorpos neutralizantes para o vírus da rinotraqueíte infecciosa dos bovinos em bovinos do Brasil. *Instituto Biológico da Bahia*, v.6, p.15-25, 1963.
- GUPTA, R.K.; et al. Adjuvant properties of aluminum and calcium compounds. In: POWELL, MF; NEWMAN, MJ (Ed.). *Vaccine design: the subunit and adjuvant approach*. New York: Plenum, 1995 v. 6, cap. 8, p. 229-248.
- HAY, R.J. Cell line presentation and characterization. In: FRESHNEY R. I (Ed.). *Animal cell culture*. New York: Oirl.1992. p. 95-148.
- HEM, S.L.; WHITE, J.L. Structure and properties of aluminum-containing adjuvants. In: POWELL, MF; NEWMAN, MJ (Ed.). *Vaccine design: the subunit and adjuvant approach*. New York: Plenum, 1995. v. 6, cap. 9, p. 249-276.
- HORZINEK, M.C.; SCHIJNS, V.E.C.J.; DENIS, M.; et al. General description of vaccines. In: PASTORET, P. P.; BLANCOU, J.; VANNIER, P.; VERCHUEREN, C. (Eds). *Veterinary vaccinology*. Amsterdam: Elsevier Science, 1997. Cap.6, p. 131-148.
- HOUE, H. Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhea virus (BVD) infections. *Vet. Mic.*, v.64, n.2/3, p.89-108, 1999.
- HOUE, H. Epidemiology of bovine viral diarrhea virus. *Vet. Clin. North Am.* v.11, n.3, p.521-548, nov. 1995.
- HOWARD, C.J.; CLARKE, M.C.; SOPP, P.; et al. Systemic vaccination with inactivated bovine virus diarrhoea virus protects against respiratory challenge. *Vet. Mic.*, v. 42, p. 171-179, 1994.

ICTVdB – A Universal Virus Database
Descriptions of ICTV Approved virus taxa. C.
Buchen-Osmond and M. T. Dallnitz
<<http://life.anu.edu.au/viruses/Ictv/fs/herpe.htm#Genus12>> em 06/11/02.

ISLAS, A.A.; SÁNCHEZ, P. M.; VILLAFÁN, O. P.; et al. Elaboracion e evaluacion en conejos de cuatro tipos de adyuvantes para una vacuna contra rinotraqueitis infecciosa bovina. *Tec. Pecu. Mex*, v.33, n 3, p. 125-134, 1995.

JONES, C.; NEWBY, T. J.; HOLT, T.; et al. Analysis of latency in cattle after inoculation with a temperature sensitive mutant of Bovine Herpesvirus-1 (RBL 106). *Vaccine*, v. 18, p. 3185-3195, 2000.

KAMSTRUP, S.; ROENSHOLT, L.; HOLM JENSEN, M.; et al. Production of a highly immunogenic subunit ISCOM vaccine against Bovine Viral Diarrhea Virus. *Vaccine*, v.17, p. 1057-1064, 1999.

KELEMEN, M.; SZABÓ, G.; SÓOS, E. Production of combined vaccines for control of viral and intestinal diseases of cattle. *Arch. Exper. Vet. Med*, v.6, p. 908-913, 1987.

KELIING, C.L. Planning bovine viral diarrhea virus vaccination programs. *Vet. Med.* p. 873-877, 1996.

KENDRICK, J.W.; et al. Infections pustular vulvovaginitis of cattle. *Cornell Veterinarian* v.48, p. 458-495, 1958.

KWAPINSKI, J.B.J. Methodology of immunochemical and immunological research. Wiley-Interscience, 1972. 599p.

LARSSON, B.; NISKANEN, R.; ALENIOUS, S. Natural infection with bovine virus diarrhoea virus in a dairy herd: a spectrum of symptoms including early reproductive failure and retained placenta. *Anim. Rep. Sci*, v. 36, p. 37-48, 1994.

LEITE, R. C. Controle da diarréia bovina a vírus (DBV) e da rinotraqueite infecciosa bovina (IBR). *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. v.23, n.4, p.531-535, 1999.

LEMOS, R.A.A. Diarréia Viral Bovina. In: LEMOS, R.A.A. (Ed) *Principais enfermidades de bovinos de corte do Mato Grosso do Sul*. Campo Grande: Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, 1998. Cap.III, p. 226-258.

LINDBERG, A.L.E.; ALENIOUS, S. Principles of eradication of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in cattle populations. *Vet Microbiol*. v.64, n.2/3, p.197-222, 1999.

LOBATO, Z.I.P. Avaliação da resposta sorológica de suínos imunizados contra o Parvovírus suíno com uma vacina inativada experimental e pelo método de "feed back" (retroinfecção), 1990. 90p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

LUKAS, G.N.; et al. A bovine fetal viral isolate neutralized by IBR immune serum as a cause of abortion in cattle. In: LIVESTOCK SANIT. ASSOC., [s. 1], 1963. *Proceedings*:... 1963. v. 67, p.108-128.

MAKOSCHEY, B.; JANSSEN, M.G.J.; VRIJENHOEK, M.P.; et al. An inactivated bovine virus diarrhoea virus (BVDV) type 1 vaccine affords clinical protection against BVDV type 2. *Vaccine*, v.19, p.3261-3268, 2001.

McGOWAN, M.R.; KIRKLAND, P.D. Early reproductive loss due to bovine pestivirus infection. *Br. Vet. J*, v. 151, p. 263-270, 1995.

MELO, C.B. Distribuição de anticorpos neutralizantes contra o Herpesvírus Bovino 1 (HBV-1) em rebanhos de aptidão leiteira e de corte do Estado de Minas Gerais, 1998. 82p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

- MELO, C.B.; LEITE, R.C.; BARBARINI Jr., O. Revisão bibliográfica dos trabalhos eficácia da cepa RLB 106 Termossensível (TS) do Herpes vírus bovino tipo 1 em vacinas comerciais. *A Hora Veterinária*, v. 16, n. 96, p. 8-14, 1996.
- MEHROTRA, M.L.; SHUKLA, D.C. Evaluation of immunogenicity of beta propiolactone inactivated bovine herpesvirus 1 vaccine. *Indian j. Anim. Sci.*, v.61, n.3, p.241-245, 1991.
- MEYER, H.; MAYR, A.; BACHMANN, P.A. Immunization of latently IBR/IPV virus infected bulls using an inactivated vaccine. *Tierärztl. Umsch.* v. 40, p. 974-985, 1985.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO; SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA SAÚDE ANIMAL; *Manual de Produtos Veterinários*. 3 ed. São Paulo: ROBE, 2001/2002. 970p.
- MUELLER, S.B.K.; IKUNO, A.A.; MACHADO, J.S. Prevalência de anticorpos contra o vírus da rinotraqueíte infecciosa dos bovinos / vulvovaginite pustular infecciosa (IBR/IPV) em bovinos do Estado de São Paulo. *Biológico*, v. 47, n. 2, p. 55-59, 1981.
- ODENDDAL, M.W.; MORRIS, S.; DU PREEZ, E.; et al. The humoral immune response in cattle after immunization with a multivalent IBR/PI₃/ *Pasteurella haemolytica* A1 leukotoxin vaccine. *Onderstepoort J. Vet. Res.* v. 64, p. 205-212, 1997.
- OIRSCHOT, J.T. Infectious Bovine Rinotracheitis / Infection Pustular Vulvovaginitis. *Manual of standards for diagnostic test and vaccines*. 4 ed.: OIE, 2000. Cap. 3.2.5.
- OIRSCHOT, J.T.; BRUSCHKE, C.J.M.; RIJN, P.A. Vaccination of cattle against bovine viral diarrhoea. *Vet. Microbiol.* v. 64, p. 169-183, 1999.
- PASTORET, P.P.; THIRY, E. Diagnosis and prophylaxis of infectious bovine rinotracheitis: the role of virus latency. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 8, p. 35, 1985.
- PFIZER. Manual técnico: vacinas para bovinos. *Laboratórios Pfizer – Departamento Técnico*, 1997.
- POSPISIL, Z.; KREJČÍ, J.; MACHATKOVÁ, M.; et al. The efficacy of an inactivated IBR Vaccine in the prevention of intra-uterine infection and its use in a disease-control programme. *J. Vet. Med.* b. 43, p. 15-21, 1996.
- POWELL, M.F.; NEWMAN, M.J. *Vaccine design; The subunit and adjuvant approach*. New York: Plenum, 1995. 783p.
- RADOSTITS, O. M.; LITTLEJOHNS, I. R. New concepts in the pathogenesis, diagnosis and control of diseases caused by the bovine viral diarrhoea virus. *Can. Vet. J.* v.29, p.513-528, 1988.
- RAVAZZOLO, A.P.; PIZZOL, M.P. MOOJEN, V.; Evidência da presença de anticorpos para o vírus da rinotraqueíte infecciosa dos bovinos em bovinos de alguns municípios do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil 1986. *Arq. Fac. Vet. UFRGS*, v.17, p.89-95, 1989.
- REED, LJ; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *The american journal of hygiene*, v. 27, n. 3, p. 493-497, 1938.
- RODAS, J. D.; ZULUAGA, E. N.; OSSA, J. E. El Herpesvírus Bovino-1: Estrutura, replicación y latencia. *Rev Col Cienc Pec, Medellín*, v.9, n.1 e 2, p.14-22, 1996.
- ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. *Imunology*. 4.ed. London: Mosby, 1996.
- RWEYEMAMU, M.M.; FERNANDEZ, A.A.; ESPINOSA, A.M.; et al. Incidencia, epidemiologia y control de la diarrea viral bovina en América de Sur. *Ver Sci. Tech. Int. Epiz.* v.9, n.1, p.215-221, 1990.

- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Commonly used techniques in molecular cloning. In: SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*, v.3, 1989.
- SAMPAIO, I.B.M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 221p.
- SEILER, M.; GROSSIORD, J.L.; SILVA, C.A. Obtaining multiple emulsions. In: GROSSIORD, J. L.; SEILER, M. (Eds); *Multiple Emulsions; Structure, Properties and Applications*. Paris: Editions de Santé, 1998. 443p.
- SILVA, C.A.; GROSSIORD, J.L.; SEILER, M. Multiple emulsions; pharmaceutical potentiality. In: GROSSIORD, J. L.; SEILER, M. (Eds); *Multiple emulsions; Structure, Properties and Applications*, Paris: Editions de Santé, 1998, 443p.
- STRAUB, O.C.; MAWHINNEY, I.C. Vaccination to protect calves against infectious bovine rhinotracheitis. *Vet. Rec*, v. 122, p. 407-411, 1988.
- STUDDERT, M.J.; et al. Infection pustular vulvovaginitis virus infection in bulls. *Am J Vet Res*, v. 25, p. 303-314, 1964:.
- TIZARD, I.R. *Veterinary immunology; an introduction*. 5.ed. Philadelphia: Saunders, 1996.
- VIDOR, T. Isolamento e identificação do vírus da doença das mucosas no Estado do Rio Grande do Sul. *Bol. Inst. Pesq. Vet. Disidério Finamor*, p.51-58, 1974.
- WIZIGMANN, G.; VIDOR, T.; RICCI, Z.M.F. Investigação sorológica sobre a incidência e ocorrência dos vírus PI-3, IBR e da Diarréia a vírus/enfermidades das mucosas dos bovinos no estado do Rio Grande do Sul. *Bol. Inst. Pesq. Vet. Disidério Finamor*, v.1, p.52-58, 1972.
- ZUFFA, A.; ZUFFA, T.; ZAJAC, J. Study of immunity induced by the inactivated oil-adjuvant vaccine after natural infection with the virus of bovine rhinotracheitis (IBR) in cattle. *Zbl. Vet. Med. B.*, v. 32, p. 724-735, 1985.