

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA  
METODOLOGIA APLICADA À CONCLUSÃO DE CURSO**

**PESQUISA SOROLÓGICA DO VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA (BVDV) EM  
CAMELÍDEOS DOMÉSTICOS CATIVOS EM DOIS ESTABELECIMENTOS NO  
RIO GRANDE DO SUL**

Elaborado por Míuriel de Aquino Goulart  
Acadêmica em Medicina Veterinária

**Porto Alegre  
2011/2**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA  
METODOLOGIA APLICADA À CONCLUSÃO DE CURSO**

**Pesquisa sorológica do vírus da diarreia viral bovina (BVDV) em camelídeos domésticos  
cativos em dois estabelecimentos no Rio Grande do Sul**

**Autora: Miúriel de Aquino Goulart**

**Matrícula: 00144905**

**Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado à Faculdade de Medicina  
Veterinária da Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul como requisito parcial para  
obtenção do grau de Médica Veterinária**

**Orientador: Cláudio Estêvão Farias da  
Cruz**

**Co-orientador: Elisandro Oliveira dos  
Santos**

**Porto Alegre**

**2011/2**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo consentimento das escolhas que fiz para essa vida, ao meu Guardião Espiritual e aos Bons Espíritos que me cercam por me protegerem, iluminarem e guiarem sempre.

Meu eterno agradecimento aos meus pais, Toni e Janete, por terem me educado, me ensinado valores fundamentais e por serem meus exemplos de caráter, força, dedicação e amor. Obrigada por sempre terem acreditado na minha escolha e, mais do que isso, incentivado e acreditado nos meus potenciais mesmo quando eu duvidava. Obrigada por terem dado todas as condições de me tornar a pessoa que sou e por nunca terem medido esforços e investimentos para que eu alcançasse esse objetivo tão importante na minha vida: ser uma Médica Veterinária. AMO VOCÊS!

Agradeço também aos meus irmãos, Marcel e Mariél, por terem me ajudado inúmeras vezes durante a graduação. Foram horas repassando matérias pra provas, treinando apresentações, lendo e corrigindo trabalhos ou apenas aguentando meu mau humor característico de final de semestre. Vocês são muito importantes! E a distância só deixou isso mais claro ainda.

Agradeço a toda minha ENOOORME família, pelo apoio, pelas risadas e por terem compreendido minhas frequentes ausências. Só uma família recheada de amor se mantém como um porto seguro sempre.

Um agradecimento especial ao meu avô Antonio Goulart que infelizmente nos deixou sem antes ver a conclusão dessa etapa. Faltou pouco, vô! Mas eu sei o quanto estavas ansioso por esse momento e que, de outra maneira, estará lá para ver e acompanhar esse momento único. Fique em paz! Te amo!

Não posso deixar de agradecer também aos meus avós maternos, Alcides e Nair, que sempre foram os maiores entusiastas da minha escolha profissional. Todos “Muito obrigados” do mundo jamais serão suficientes pra expressar a minha gratidão por todo amor, apoio e alegria que vocês sempre me transmitiram. Muito obrigada por todo esforço para acompanhar esse momento de finalização também. Amo muito vocês!

Agradeço aos meus amigos do Santo Antônio, do CTG, da Zona Sul, enfim, todos que de alguma forma passaram pela minha vida e trocaram momentos inesquecíveis! Obrigada pelos momentos de descontração – essenciais pra qualquer vida de qualidade! Obrigada pelo apoio e pela compreensão dos momentos em que tive que me ausentar... Vocês foram fundamentais pra essa vitória!

Agradeço aos meus amigos (futuros) Médicos (as) Veterinários (as): Arthur Hameister Neto, Clarisse Meira, Derek Amorim, Eduardo Costa, Fernando Chapon, Gustavo Brambatti, Hugo Ferreira, Igor Miranda, Jamil Faccin, Jardel Tessari, Karine Takeuti, Kauê Reis, Matheus Bianchi, Priscila Medina, Renan Stadler, Tatiane Watanabe, Thayane Mikhailenko e Vanessa Ribeiro por todo companheirismo, risadas, angustias compartilhadas, palavras e momentos inesquecíveis. Que bom que eu tenho vocês na minha vida!

Agradeço à minha grande e querida amiga (além de Médica Veterinária) Michelli Westphal de Ataíde por todo companheirismo e conhecimentos transmitidos. Obrigada pelas risadas e momentos que ficarão pra sempre na memória!

Agradeço infinitamente ao professor Cláudio Cruz e ao Médico Veterinário Elisandro dos Santos pelo apoio e auxílio em todos os momentos da realização deste trabalho. Obrigada pela paciência e por todo conhecimento transmitido!

Agradeço ao Laboratório de Virologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) e ao Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF) bem como ao professor Dr. Paulo Roehle, ao doutorando Helton dos Santos e todos demais funcionários e estagiários que tornaram essa pesquisa possível, dedicando horas de trabalho para a conclusão desta etapa. Meu eterno obrigada por tudo!

Agradeço aos professores Dr. David Driemeier e Dr. Marcelo Meller Alievi por terem acreditado no meu trabalho e proporcionado incríveis experiências das quais me lembrarei para sempre. Obrigada por todos os ensinamentos compartilhados!

Agradeço também a todos os colegas do CECLIVET/PRESERVAS e do Setor de Patologia Veterinária (SPV) pelos momentos de trabalho, estudo e descontração compartilhados durante o período de graduação.

Agradeço aos colegas da ATMV 2011/2, turma da qual me lembrarei pra sempre! Ótimos Médicos Veterinários chegando!

Agradeço também à Universidade Federal do Rio Grande do Sul e a todos os professores da Faculdade de Veterinária por terem proporcionado um ensino de qualidade e gratuito e toda a estrutura necessária para minha formação profissional.

*"Jamais creia que os animais sofrem menos do que os humanos. A dor é a mesma para eles e para nós. Talvez pior, pois eles não podem ajudar a si mesmos."*

(Dr. Louis J. Camuti)

*"A compaixão pelos animais está intimamente ligada à bondade de caráter, e pode ser seguramente afirmado que quem é cruel com os animais não pode ser um bom homem."*

(Arthur Schopenhauer)

## RESUMO

O vírus da diarreia viral bovina (“Bovine Viral Diarrhea Virus” - BVDV) é um *Pestivirus* da família *Flaviviridae* com ampla distribuição mundial e características importantes como possibilidade de gerar infecção persistente, reação cruzada com os demais *Pestivirus* e inespecificidade de hospedeiros. As pesquisas sobre a doença em camelídeos são mais comuns em países onde há exploração comercial e produtiva desses, porém o risco que essas espécies podem representar à cadeia epidemiológica desta e de outras enfermidades, bem como aos programas de erradicação justifica a importância da investigação e o monitoramento. Existem evidências da infecção por BVDV em camelídeos, nos quais a doença é semelhante à observada em bovinos. A maioria dos casos são subclínicos, porém os animais podem manifestar aborto, diarreia, doenças pulmonares e crescimento deficiente. As soroprevalências encontradas na literatura variam de zero a 85% e estão relacionadas também ao número de animais amostrados e exposição desses aos fatores de risco para a doença. Neste estudo, todas as amostras foram negativas para anticorpos anti-BVDV, resultado compatível com a baixa prevalência esperada.

Palavras-chave: pestivirus, BVDV, camelídeos, lhama, alpaca, camelo.

## ABSTRACT

The Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) is a *Pestivirus* in the *Flaviviridae* family that possesses wide distribution and is characterized by the ability of producing persistent infection, immune cross reaction with other *Pestivirus* and host inespecificity. BVDV in camelids has most commonly been studied in countries, where these animals are commercially bred; however, the risk that these species might represent to the epidemiology of BVDV infection and other diseases justify this investigation. There is evidence of BVDV infection in camelids, in which the disease is similar to that seen in cattle. Most cases are subclinical, but animals may show abortion, diarrhea, lung disease and undergrowth. Seroprevalence of anti-BVDV antibodies in camelids has ranged widely, from zero to 85% and records depend on the number of animals sampled apart of levels of exposure from these animals. In this study, all the samples were negative, result that is consistent with the expected low prevalence of the BVDV in camelids.

Key-words: pestivirus, BVDV, camelids, lhama, alpaca, camel.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Taxonomia dos camelídeos.....	27
<b>Figura 2</b> - Coleta de sangue da veia jugular em camelo bactriano ( <i>C.bactrianus</i> ).....	31
<b>Figura 3</b> - Coleta de sangue da veia jugular de uma alpaca ( <i>Lama pacos</i> ).....	31

## LISTA DE ABREVIATURAS

%:	Porcentagem
<:	Menor que
BD:	<i>Border Disease</i>
BVDV:	<i>Bovine Viral Diarrhea Virus</i>
BVDV-1:	<i>Bovine Viral Diarrhea Virus</i> tipo 1
BVDV-2:	<i>Bovine Viral Diarrhea Virus</i> tipo 2
CP:	Efeito citopático
CSA:	Camelídeos Sul-americanos
CSFV:	<i>Classical Swine Fever Virus</i>
CVM	Camelídeos do Velho Mundo
h:	Hora
kb:	Kilobase
kGy:	<i>Kilogray</i>
log:	Logarítimo
MD:	<i>Mucosal Disease</i>
mg/ml:	Miligramas por mililitro
min:	Minuto
MLV:	<i>Modified Live Virus</i>
NCP:	Efeito não-citopático
nm:	Nanômetro
°C:	Graus Celsius
pH:	Potencial hidrogeniônico
PI:	Persistentemente Infectado
RNA:	Ácido Ribonucléico
SN:	Soroneutralização
TCID <sub>50</sub> :	<i>50% Tissue Culture Infective Dose</i>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Tabela 1-</b> Proteínas estruturais dos pestivírus.....	13
<b>Tabela 2-</b> Manifestações clínicas do BVDV em CSA.....	22
<b>Tabela 3-</b> Diferenças entre a manifestação de BVDV em CSA e Bovinos.....	23
<b>Tabela 4-</b> Relatos de pesquisas de BVDV em lhamas, alpacas e/ou camelos.....	32

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>12</b>
<b>2.1</b>	<b>Família <i>Flaviviridae</i>.....</b>	<b>12</b>
2.1.1	Gênero <i>Pestivirus</i> .....	12
2.1.2	Vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV).....	14
2.1.2.1	Genótipos, subgenótipos e biotipos.....	14
2.1.2.2	Doença das Mucosas.....	15
2.1.2.3	Transmissão.....	16
2.1.2.4	Hospedeiros.....	20
2.1.3	BVD em Camelídeos.....	20
2.1.3.1	Sinais clínicos.....	21
2.1.3.2	Patogênese.....	21
2.1.3.3	Patologia.....	23
2.1.3.4	Diagnóstico.....	24
2.1.3.5	Controle.....	25
<b>3</b>	<b>CAMELÍDEOS DOMÉSTICOS.....</b>	<b>26</b>
<b>3.1</b>	<b>Taxonomia.....</b>	<b>26</b>
3.1.1	Lhama ( <i>Lama glama</i> ).....	28
3.1.2	Alpaca ( <i>Lama pacos</i> ).....	28
3.1.3	Camelo bactriano ( <i>Camelus bactrianus</i> ).....	29
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>30</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>32</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>35</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>36</b>
	<b>ANEXO A – Protocolo de soroneutralização em microplaca aplicado pelo Laboratório de Virologia do ICBS/UFRGS.....</b>	<b>41</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O vírus da diarreia viral bovina (“Bovine Viral Diarrhea Virus” - BVDV) é um *Pestivirus* da família *Flaviviridae*, ao qual, estima-se que a maioria dos rebanhos do mundo já tenha sido exposta. Há dois genótipos virais distintos, vírus da diarreia viral bovina tipo 1 (BVDV-1) e tipo 2 (BVDV-2). Há também os dois biotipos, citopático (CP) e não-citopático (NCP); este capaz de atravessar a barreira placentária e, dependendo do período da gestação, gerar infecção persistente.

Sabe-se que os vírus desse gênero podem infectar diversas espécies de artiodáctilos domésticos e selvagens. Embora estudos sobre essas infecções em camelídeos sejam escassos no Brasil, a criação de espécies exóticas e silvestres em cativeiro para fins de exposição, conservação ou produção pode representar riscos consideráveis na cadeia epidemiológica de inúmeras doenças. Ainda não existem evidências quanto à transmissão de BVDV entre espécies domésticas e selvagens, porém a ausência de comprovação não elimina a necessidade da continuidade da pesquisa.

Esse trabalho apresenta uma pesquisa sorológica sobre a doença em lhamas, alpacas e camelos bactrianos mantidos em dois estabelecimentos particulares no Rio Grande do Sul.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Família Flaviviridae

Essa família compreende três gêneros: *Flavivirus*, *Pestivirus* e *Hepacivirus*, todos com organização genômica e propriedades físico-químicas semelhantes, mas geneticamente distintos. *Flavivirus* inclui os vírus do Oeste do Nilo, da Dengue, da Febre Amarela, da Encefalite Japonesa, entre outros. Os *Hepacivirus* são patógenos humanos como a Hepatite C e os *Pestivirus* incluem vírus da diarreia viral bovina, da doença da fronteira (“*Border Disease Virus*” – BDV) e peste suína clássica (“*Classical Swine Fever Virus*” – CSFV) (MacLACHLAN e DUBOVI, 2011). Além disso, recentes estudos indicam a existência de novas espécies, ainda em fase de reconhecimento, denominadas vírus Giraffe, Bungowannah (MacLACHLAN e DUBOVI, 2011), HoBi e Pronghorn ou Antelope (CHIAPPETTA, 2011).

#### 2.1.1 Gênero Pestivirus

Esses se distribuem mundialmente e são patógenos de grande importância econômica em Medicina Veterinária. O primeiro *Pestivirus* reconhecido foi o da peste suína clássica, em 1833, nos Estados Unidos. O vírus da diarreia viral bovina foi descrito por Olafson, em Nova York, em 1946. Em 1953, a doença das mucosas também foi associada com BVDV. O vírus da doença da fronteira foi relatado, pela primeira vez, em 1959, em ovelhas (MacLACHLAN e DUBOVI, 2011). Os *Pestivirus* demonstram reação cruzada e não são espécie-específicos.

Os *Pestivirus* são os únicos da família *Flaviviridae* resistentes à inativação por baixo pH (RIDPATH, 2005). Os virions são estáveis em pH de 5,7 a 9,3 e sua infectividade não é afetada por congelamento, porém diminui em temperaturas acima de 40°C. Como nos demais vírus envelopados, há inativação do vírus com a aplicação de solventes orgânicos e detergentes. Segundo Ridpath (2005), outros métodos de inativação incluem tratamento com tripsina (0,5 mg/ml, 37°C, 60 min), etilenoimina (redução de 5 log<sub>10</sub> unidades usando 10 mM a 37°C por 2 h), irradiação com feixes de elétrons (4.9 e 2.5 kGy são necessários para reduzir a infectividade do vírus em 1 log<sub>10</sub> para amostras congeladas ou líquidas, respectivamente) e irradiação gama (20–30 kGy).

Morfologicamente, os virions desse gênero se apresentam esféricos, com simetria icosaédrica, envelope lipoprotéico derivado das membranas da célula do hospedeiro e 40 a 60 nm de diâmetro. O genoma consiste em uma fita simples de RNA com orientação positiva e mede, aproximadamente, 12,3 kb. A fase aberta de leitura (Open Reading Frame – ORF) é única e codifica para uma poliproteína de cerca de 4000 aminoácidos (CHIAPPETTA, 2011).

Segundo MacLachlan e Dubovi (2011), estes vírions apresentam quatro proteínas estruturais e algumas proteínas não estruturais. As quatro proteínas estruturais dos pestivírus são apresentadas na **Tabela 1**.

Tabela 1 – Proteínas estruturais dos pestivírus

Proteína	Localização	Função
C	Nucleocapsídeo	Forma o nucleocapsídeo que se liga ao RNA e está envolvida na constituição viral.
Erns	Glicoproteína do envelope	Ação ribonucleásica sem função conhecida.
E1 e E2	Glicoproteínas do envelope	E2 presente na superfície de vírions maduros, forma homodímeros ou heterodímeros com E1. Acredita-se que E2 seja responsável pela variabilidade na neutralização antigênica dos <i>Pestivirus</i> .

As proteínas não estruturais por ordem de codificação no ORF são: Npro, p7, NS2/3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B. A proteína Npro é exclusiva do gênero *Pestivirus* e é uma autoprotease, cuja única função conhecida é autocataliticamente liberar-se da poliproteína. (RIDPATH, 2005). Esta proteína não é essencial para a replicação do vírus em cultivo celular, mas modula a resposta do interferon em células infectadas (MacLACHLAN e DUBOVI, 2011). A p7 está muito próxima espacialmente da E2 na poliproteína e a presença de uma proteína fusionada denominada E2p7 indica que p7 possa atuar na maturação glicoproteica e/ou na morfologia do vírus (CHIAPPETTA, 2011). Em seguida, na ORF se codifica a NS2/3 que, em cepas citopáticas, é clivada em NS2 e NS3. Tanto a proteína NS2/3 não clivada quanto a NS3 apresentam atividade da serina protease, cuja função é clivar os sítios seis, sete, oito, nove e dez e gerar, assim, as proteínas não estruturais. (CHIAPPETTA, 2011). Além disso, a NS3 também possui diferentes funções, RNA helicase que atua no RNA na replicação do genoma (RIDPATH, 2005; CHIAPPETTA, 2011) e nucleosídeo trifosfatase (CHIAPPETTA, 2011).

Anticorpos para NS2/3 e NS3 não produzem neutralização da infectividade. A NS4A atua como cofator para a proteína NS2/3. A NS4B e NS5A provavelmente são componentes

do complexo de replicação e a NS5B apresenta atividade de RNA polimerase (RIDPATH, 2005).

Membros dos *Pestivirus* geralmente se replicam bem em culturas celulares primárias e em células derivadas da espécie do hospedeiro principal, vírus da diarreia viral bovina, em fibroblastos de embriões bovinos, ou de células renais; vírus da doença da fronteira, em células isoladas de ovinos e vírus da peste suína clássica, em células linfóides ou renais de suínos (MacLACHLAN e DUBOVI, 2011).

As cepas isoladas de animais naturalmente infectados são, predominantemente, não-citopáticas em culturas celulares. Os vírus entram nas células através de endocitose mediada por receptor e há replicação no citoplasma. A infecção geralmente é acompanhada por proliferação característica das membranas perinucleares (MacLACHLAN e DUBOVI, 2011).

A replicação do RNA viral ocorre através do complexo de replicação composto pelo RNA viral e proteínas não estruturais em associação com membranas intracitoplasmáticas. A replicação é similar a de outros *Flavivirus*, após a translação, criam-se fitas complementares negativas do RNA e a partir desta é sintetizada uma fita positiva, através de um mecanismo semiconservativo. Como as proteínas virais não são detectadas na superfície de células infectadas sugere-se que os vírions amadureçam em vesículas intracelulares e sejam liberados por exocitose (RIDPATH, 2005).

## 2.1.2 Vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV)

### 2.1.2.1 Genótipos, subgenótipos e biotipos

Além da divisão em genótipos, também existe uma variação de subgenótipos em cepas virais. Já foram descritos BVDV-1a e BVDV-1b em cepas isoladas na América do Norte, enquanto cepas isoladas na Europa demonstraram, pelo menos, onze diferentes subgenótipos. Em relação ao BVDV-2, este foi dividido apenas em BVDV-2a e BVDV-2b (RIDPATH, 2005). Ridpath (2005) ainda cita que estudos epidemiológicos indicam maior predominância de BVDV-1b em casos de problemas respiratórios e BVDV-1a em infecções fetais que ocorrem em gestações de mais de 100 dias.

A divisão em biotipos é baseada na capacidade da cepa em propagar-se em culturas de células epiteliais. Sabe-se que em cepas citopáticas há uma alteração na proteína NS2/3 que é clivada em NS2 e NS3 e, conforme Ridpath (2005) esse processo pode estar relacionado a diferentes estratégias dependentes da cepa viral. Geralmente a geração de NS3 está associada à inserção de sequências de aminoácidos no genoma viral.

Em função de o biotipo NCP ser o único capaz de gerar infecção persistente, geralmente utiliza-se cepas citopáticas para produção de vacinas vivas atenuadas. Uma superinfecção por uma cepa citopática em um animal PI com uma cepa NCP pode desenvolver uma forma fatal do BVD, a doença das mucosas. O biotipo não-citopático é mais predominante que o citopático na natureza, uma vez que cepas CP são isoladas apenas de casos de doença das mucosas.

#### 2.1.2.2 Doença das mucosas

A doença das mucosas é uma forma, comparativamente, rara de BVD que não está associada a grandes perdas, as quais estão mais relacionadas à infecção aguda por BVDV NCP.

Em surtos, é comum que vários animais da mesma idade estejam afetados porque a infecção é iniciada nos fetos de vacas que estão em um estágio similar de gestação. Segundo Evermann e Barrington (2005), durante tais epizootias, até 25% de um rebanho pode ser infectado. Tem sido sugerido um período de incubação de 7-14 dias para MD e a doença se desenvolve em casos experimentais em que se inocula um BVDV-CP homólogo em animais com BVDV-NCP PI, em casos de vacinação com uma vacina viva modificada, de animais PI que entram em contato com uma cepa CP homóloga ou de mutação do vírus NCP presente em animais PI. Em relação ao tempo de incubação, não é possível afirmar um dado certo, pois, uma vez que se acredita que a mutação a partir de animais PI seja a principal causa de casos de MD espontânea, não se pode afirmar um tempo de incubação exato (EVERMANN e BARRINGTON, 2005).

Os sinais clínicos de MD aguda incluem febre, anorexia, taquicardia, polipnea, diminuição da produção de leite e diarreia profusa aquosa. A diarreia, muitas vezes apresenta pedaços de mucosa, sangue e odor fétido. Outra característica é que os sinais semelhantes aos da infecção aguda por BVDV podem estar presentes, porém são mais pronunciados. Erosões e úlceras podem estar presentes na língua, palato e gengiva. A papila oral pode se apresentar hemorrágica e erosões epiteliais podem também estar pronunciadas nas regiões interdigitais, bandas coronárias, úbere, vulva e prepúcio. Os sinais clínicos muitas vezes incluem corrimento nasal e ocular, edema de córnea, hipersalivação, diminuição das contrações ruminais e timpanismo. Inflamação do espaço interdigital e bandas coronárias podem estar presentes, além de laminite e claudicação.

Descobertas clinicopatológicas, muitas vezes, incluem neutropenia sem desvio para a esquerda e trombocitopenia. Infecções bacterianas secundárias podem se manifestar como

mastite, pneumonia e metrite. Bovinos acometidos pela forma aguda da MD geralmente apresentam uma taxa de letalidade de quase 100%. Contudo, uma minoria de animais pode sobreviver à fase aguda e desenvolver sinais de MD crônica.

Achados de necropsia de bovinos acometidos por MD aguda incluem úlceras necrosantes e erosões em todo o trato gastrointestinal (esôfago, rúmen, abomaso, duodeno, jejuno, íleo, ceco e cólon). Erosões podem também estar presentes nas narinas e trato respiratório superior. As placas de Peyer, muitas vezes, apresentam-se necróticas e hemorrágicas e o conteúdo intestinal, tipicamente, apresenta-se aquoso e fétido.

Em comparação com a síndrome hemorrágica causada pelo BVDV-2, os sinais clínicos da MD são semelhantes, porém os animais que recebem terapia de suporte podem recuperar-se da síndrome; já na MD, terapias de suporte raramente têm algum efeito na prevenção da morte dos animais.

Dentre os poucos que sobrevivem à MD aguda e desenvolvem a doença crônica, os sinais clínicos perceptíveis são diarreia intermitente, anorexia leve a moderada, timpanismo crônico recorrente, erosões interdigitais e lesões erosivas da pele, além de secreção ocular e nasal. Alopecia e áreas de hiperqueratinização podem se desenvolver especialmente em torno da cabeça e pescoço. Pode haver claudicação por laminite crônica e crescimento anormal da parede do casco. Achados clínico-patológicos, muitas vezes, incluem anemia, neutropenia e trombocitopenia.

#### 2.1.2.3 Transmissão

A transmissão de BVDV pode ocorrer verticalmente, resultando na infecção congênita do feto ou horizontalmente, após o nascimento, por vezes referido como transmissão pós-natal. A transmissão de BVDV para o feto antes de 120-150 dias de gestação pode resultar em aborto, reabsorção, ou natimortalidade. Os fetos que sobrevivem, nascem como bezerros infectados.

A infecção por BVDV persiste para a vida do animal e resulta na eliminação contínua do vírus no meio ambiente. Assim, acredita-se que os animais PI servem como reservatórios de BVDV. A transmissão uterina após 120-150 dias de gestação, quando o feto se torna imunocompetente, resulta em uma infecção congênita caracterizada por aborto, natimortos, defeitos congênitos ou o nascimento de um filhote aparentemente normal. A transmissão pós-natal horizontal resulta em uma infecção aguda por vezes referida como infecção transitória, de gravidade variável entre inaparente, sinais leves e até risco de morte. Embora os animais que tenham adquirido uma infecção aguda por BVDV possam permanecer infectados por

algum tempo, como indicado pela duração prolongada da soroneutralização de anticorpos por um ano ou mais, acredita-se que eliminam o vírus apenas transitoriamente por uma semana ou menos.

Há duas maneiras pelas quais um feto pode adquirir uma infecção persistente: transmissão do vírus de uma vaca PI para o feto (que muito provavelmente se torna um bezerro PI) e infecção aguda da fêmea nos primeiros 120-150 dias de gestação, quando pode haver transmissão da infecção para o feto. A capacidade de BVDV em infectar embriões antes da competência imunológica pode ser limitada, mas há pouca informação sobre as taxas de transmissão congênita em fetos após se tornarem imunocompetentes.

A transmissão congênita do BVDV após 120-150 dias de gestação é indicado pela presença pré-colostral de anticorpos neutralizantes anti-BVDV nos bezerros ao nascimento. A infecção aguda resulta da transmissão horizontal do vírus para um animal suscetível após o contato com um animal com infecção aguda na fase infecciosa da doença ou com um animal PI que continuamente elimina o vírus.

A infecção aguda pode ser adquirida através de contato direto, fômites contaminados e a vacinação com vírus vivo modificado (DUFFELL e HARKNESS, 1985; HARKNESS, 1987; BROWNLIE, 1990; HOUE, 1995; RADOSTITS e LITTLEJOHNS, 1988; RADOSTITS *et al.*, 1999). Geralmente o vírus está presente na maioria das excreções e secreções, incluindo lágrimas, leite, saliva, urina, fezes, secreção nasal e sêmen de animais com infecção aguda durante a fase infecciosa transitória da doença, bem como da maioria dos animais PI (HOUE, 1995). O sêmen de animais PI apresenta grande quantidade do vírus, assim como o de animais com infecção aguda, nestes, porém, em menor quantidade (BROCK *et al.*, 1991; VOGES *et al.*, 1998).

A transmissão de BVDV através do sêmen pode resultar em uma infecção aguda, no desenvolvimento de PI, ou em ambos. Touros que adquirem uma infecção aguda por BVDV podem apresentar o vírus no sêmen por vários dias após a viremia cessar, embora a qualidade do sêmen possa permanecer normal (KIRKLAND *et al.*, 1991; KIRKLAND *et al.*, 1994).

A transferência de embriões pode se constituir em um importante meio de transmissão de BVDV. O vírus pode ser transmitido para o feto se a doadora tem infecção aguda ou persistente e o embrião não é adequadamente lavado, se o destinatário tem infecção aguda ou persistente, ou se o soro fetal bovino usado para lavar o embrião contiver BVDV. A replicação e a persistência do BVDV em produção *in vitro* de embriões parece ser cepa-específicos (GIVENS *et al.*, 2000). Grandes quantidades de vírus foram encontradas no soro (106

TCID<sub>50</sub>/ml), muco vaginal (106 TCID<sub>50</sub>/ml), urina (104 TCID<sub>50</sub>/ml), flush de útero (102 TCID<sub>50</sub>/ml) e fezes (104 TCID<sub>50</sub>/ml) de uma novilha PI doadora (BROCK *et al.*, 1991).

A transmissão retal de BVDV foi demonstrada através da utilização da mesma luva para palpar novilhas PI e novilhas soronegativas, representando mais um importante meio de transmissão e, conseqüentemente, do estabelecimento de PI (LANG-REE *et al.*, 1994). O vírus BVD pode sobreviver em ambientes frescos e protegidos por vários dias, ou mesmo semanas (HOUE, 1995). Conseqüentemente, a transmissão por fomite ou iatrogênica pode ocorrer se os animais suscetíveis são expostos à alimentação ou equipamentos usados anteriormente em animais com infecção aguda ou PI (RADOSTITS e LITTLEJOHNS, 1988; GUNN, 1993; HOUE 1995; RADOSTITS *et al.*, 1999). A transmissão para animais soronegativos também é possível através da reutilização de agulhas poucos minutos após uso prévio em animais PI, mas o vírus pode permanecer viável na agulha por pelo menos 3 dias (GUNN, 1993). As condições ambientais que favorecem a aglomeração de animais e transmissão por aerossol aumentam a probabilidade de transmissão da infecção aguda. A transmissão mecânica por vetores biológicos como moscas também foi demonstrada (TARRY *et al.*, 1991).

A transmissão iatrogênica do BVDV para o feto com desenvolvimento de lesões no sistema nervoso central, defeitos teratogênicos e morte pode ocorrer se as fêmeas suscetíveis são vacinadas com vacinas vivas modificadas (“modified live vírus” – MLV) durante a gravidez (ORBAN *et al.*, 1983; LIESS *et al.*, 1984).

Animais PI podem excretar grandes quantidades de BVDV. Vacas PI grávidas invariavelmente transmitem os vírus para o feto nos primeiros 120-150 dias de gestação, resultando em infecção persistente do feto. Touros com infecção persistente eliminam grande quantidade do vírus no sêmen, no entanto com qualidade do sêmen aceitável. A existência de alguns animais PI que poderiam permanecer indetectáveis devido à eliminação intermitente ou baixa de vírus seria uma explicação lógica para a inesperada transmissão prolongada e contínua em rebanhos considerados livres de animais PI (BARBER *et al.*, 1985; MOERMAN *et al.*, 1993). A quantidade eliminada de vírus e a duração da eliminação por animais com infecção aguda provavelmente depende da virulência das cepas e de sua propensão para replicar (BOLIN e RIDPATH, 1992), bem como da presença de anticorpos soroneutralizantes (BOLIN *et al.*, 1991).

Acredita-se que animais com infecção aguda eliminam o vírus brevemente, talvez por apenas alguns dias, ou semanas, dependendo da cepa do vírus (DUFFELL e HARKNESS, 1985; NISKANEN *et al.*, 2000). Em condições de campo, onde a grande maioria das infecções agudas em um rebanho é leve e subclínica, a duração da eliminação pode ser de

apenas 1-2 dias, ou menos. Assim, o potencial para eliminação e transmissão de animais com infecção aguda pode variar consideravelmente, dependendo da proteção cruzada adquirida de outras exposições, inclusive vacinais (BOLIN *et al.*, 1991), e da virulência do vírus.

Em relação à latência da infecção, a persistência de títulos soroneutralizantes persistentes após a viremia indica que o vírus ainda é capaz de replicar e de ser apresentado ao tecido linfóide. Embora, aparentemente improvável, dado o efeito de anticorpos soroneutralizantes na supressão viral, a eliminação exacerbada de uma infecção aguda poderia explicar os ciclos de transmissão e o tempo anormalmente longo (2-3 anos) para todos os animais em alguns pequenos rebanhos (BARBER *et al.*, 1985; MOERMAN *et al.*, 1993). A recorrência da eliminação em animais com infecção aguda também pode depender do biotipo do vírus. A imunidade passiva ou adquirida para BVDV pode afetar a transmissão reduzindo potencialmente a quantidade ou a duração da eliminação em animais com uma infecção aguda ou PI, ou diminuindo a quantidade e a duração da infecciosidade, além do número de animais suscetíveis à infecção. O período de transmissão máxima varia de rebanho para rebanho, dependendo da prevalência de bezerros PI e das taxas de lotação. Em condições que promovem risco elevado de infecção, existe uma janela estreita para a vacinação entre a idade da decadência de anticorpos colostrais a  $< 1:16$  e quando o risco de infecção começa a acelerar.

Alguns estudos de campo encontraram evidências após a titulação de anticorpos soroneutralizantes de animais com infecções naturais com genótipo duplo em que os animais tinham evidência de infecção com cepas tipo 1 e tipo 2 (RUSH *et al.*, 2001; MUÑOZ-ZANZIBAR *et al.*, 2002; MUÑOZ-ZANZIBAR *et al.*, 2003), indicando que a infecção natural com um genótipo não necessariamente protege contra a infecção natural com outro genótipo. O risco de transmissão e infecção aumenta 10 vezes na presença de animais PI e a introdução de novos animais em um rebanho pode ser o principal fator significativamente associado com soroprevalência elevada em rebanhos (MAINAR-JAIME *et al.*, 2001).

Outros meios de transmissão inter-rebanhos incluem contato com animais através de cercas, suas secreções, excreções ou, transferência de embriões além do uso de vacinas MLV e da alimentação de bezerros com leite de vacas PI.

A estratégia mais citada para redução da transmissão do vírus é a eliminação de animais PI. Uma vez que a transmissão não pode prosseguir sem animais suscetíveis se usam ferramentas para maximizar a imunidade de um rebanho através da alta qualidade do manejo do colostro e vacinação estratégica.

#### 2.1.2.4 Hospedeiros

Inicialmente os *pestivirus* eram relacionados apenas com suas espécies de origem, mas atualmente se sabe que eles não são espécie-específicos e podem infectar numerosas espécies diferentes. Em situações de campo, sabe-se que é possível o contato de espécies silvestres com espécies domésticas e que o compartilhamento de pastagens e fontes de água podem ser fatores de risco para a doença. Assim como a transmissão de doenças de animais selvagens para animais domésticos pode atrapalhar os programas de controle e acarretar perdas produtivas e econômicas, a situação inversa também causa perdas, uma vez que a doença pode ser importante fator de risco para conservação de espécies silvestres e que rebanhos infectados criados em regiões contíguas a de animais selvagens, podem colocar em risco estas populações.

O BVDV pode infectar, além de bovinos, ovelhas, cabras, porcos, diversos ruminantes das famílias *Camelidae*, *Cervidae* e *Antilocapridae*.

Os ruminantes selvagens são conhecidos por serem suscetíveis à infecção aguda por BVDV e algumas evidências sugerem que cervídeos também podem sofrer infecções congênitas e infecção persistente (GRONDAHL *et al.*, 2003). A partir da eliminação intermitente do vírus, os ruminantes selvagens poderiam ser fontes de infecção para os bovinos. Além disso, pouca informação tem sido divulgada sobre a prevalência dessas infecções em animais silvestres.

#### 2.1.3 BVDV em Camelídeos

Existem evidências de isolamento viral e presença de anticorpos para o vírus em Camelídeos Sul-americanos (CSA) e Camelídeos do Velho Mundo (CVM), porém embora suscetíveis à infecção, sabe-se que esses animais manifestam a doença de forma variável, apresentando certa resistência ao desenvolvimento de sinais clínicos. (van AMSTEL e KENNEDY, 2010)

Ambos genótipos 1a e 1b foram isolados de CSA (WENTZ *et al.*, 2003) e não existem evidências da manifestação da síndrome hemorrágica - causada por BVDV-2 em bovinos – em CSA (CARMAN *et al.*, 2005). No entanto, BVDV-2 CP foi isolado de dromedários com sinais de doença reprodutiva e congênita (YOUSIF *et al.*, 2003).

A alta concentração viral usualmente presente nas secreções e excreções de bovinos os torna uma espécie de grande importância na transmissão da doença, porém como os mecanismos de patogenia ainda não são suficientemente esclarecidos nos camelídeos, não se

pode afirmar a importância destes animais na propagação viral (van AMSTEL e KENNEDY, 2010).

Em um estudo no Canadá, a introdução de um filhote em um rebanho de alpacas resultou em sinais de letargia e anorexia em alguns animais após 2 meses e meio e ocorreram dois abortos (aos 5,5 e aos 7 meses de gestação). BVDV-1b NCP foi isolado de um dos fetos e um filhote que nasceu vivo foi positivo para BVDV NCP e permaneceu negativo para anticorpos anti-BVDV-1 e BVDV-2 aos 46 dias. Este achado confirmou a possibilidade de infecções persistentes em alpacas. (CARMAN, *et al.*, 2005)

#### 2.1.3.1 Sinais clínicos

O aborto é o primeiro sinal clínico identificado em camelídeos e, além disso, filhotes vivos, neonatos fracos, falha no desenvolvimento, deformidades congênitas, distúrbios respiratórios com descarga nasal mucopurulenta crônica e gastroenterite com diarreia são relatados (FOWLER, 2010)

#### 2.1.3.2 Patogênese

Em bovinos o BVDV replica-se na mucosa nasal e através das tonsilas o vírus se distribui pelos linfonodos regionais seguido pela disseminação pelo corpo, associada aos leucócitos. (POTGIETER, 2004) Em camelídeos o vírus foi detectado somente em poucas amostras de leucócitos após infecção experimental, o que sustenta a idéia de que o BVDV se replica de forma limitada nas células brancas de camelídeos sul-americanos. (WENTZ *et al.*, 2003)

Com relação à infecção transplacentária o mecanismo parece ser semelhante em camelídeos, porém como o tempo de gestação é diferente entre estes e os bovinos (345 dias e 284 dias, respectivamente) (van AMSTEL; KENNEDY, 2010), não existe uma definição exata de qual o período de reconhecimento fetal onde o filhote fica suscetível ao desenvolvimento da infecção persistente embora, se o desenvolvimento do sistema imune nos camelídeos for proporcionalmente similar aos bovinos, este período seria até os 145 dias de gestação (MATTSON *et al.*, 2006). Segundo Fowler (2010), se uma fêmea prenhe for exposta ao vírus no primeiro trimestre de gestação, o feto pode se tornar infectado. Não foi possível produzir infecção persistente em camelídeos (van AMSTEL; KENNEDY, 2010), porém infecção pré-natal natural resultou em animais PI (BELKNAP *et al.*, 2000; CARMAN *et al.*, 2005; MATTSON *et al.*, 2006) e foi demonstrada presença de BVDV no soro, sangue, pulmão, fígado e cérebro (BELKNAP *et al.*, 2000), rim, pele (FOSTER *et al.*, 2007), coração,

placenta, timo, linfonodo mesentérico, tireóide, baço (CARMAN *et al.*, 2005), glândula salivar, esôfago, testículos e próstata (BYERS *et al.*, 2009). Segundo Mattson *et al.* (2006), filhotes PI podem apresentar anemia, baixos níveis de hemoglobina no sangue e leucopenia.

As manifestações clínicas por categoria de CSA estão descritas na **Tabela 2**.

Tabela 2 – Manifestações clínicas do BVDV em CSA.

Categoria	Manifestação
Camelídeos Sul-americanos	
Infecção Transitória Natural	Anorexia parcial e letargia. Quase imperceptível (CARMAN <i>et al.</i> , 2005).
Infecção Aguda	Pode acontecer após a introdução de um animal PI no rebanho. Letargia e anorexia e diarreia (embora não seja um achado constante) (CARMAN <i>et al.</i> , 2005).
Doença embrionária/fetal	Perda gestacional prematura, aborto e nascimento prematuro (CARMAN <i>et al.</i> , 2005; GOYAL <i>et al.</i> , 2002; MATTSON <i>et al.</i> , 2006; WENTZ <i>et al.</i> , 2003)
PI	Mais comumente relatada. Baixo ganho de peso ou peso abaixo do esperado, diarreia crônica, descarga nasal e pneumonia, artrite (Carman <i>et al.</i> , 2005; Foster <i>et al.</i> , 2007; Goyal <i>et al.</i> , 2002; Mattson <i>et al.</i> , 2006; Wentz <i>et al.</i> , 2003).

Sabe-se também que a forma da doença se manifestar em camelídeos é diferente do que em bovinos; essas diferenças estão descritas na **Tabela 3**.

Tabela 3 – Diferenças entre a manifestação de BVDV em CSA e Bovinos

	Bovinos	Camelídeos Sul-americanos
Doença aguda transitória / Presença do vírus	Até 60 dias	Incerto. Talvez mais do que 60 dias
Transmissão	Rápida distribuição na população suscetível	Distribuição lenta
Animais PI	Desenvolvimento da doença das mucosas Genotipo citopático	Doença crônica Não foi isolado genótipo citopático
Soroprevalência	Geralmente alta	Geralmente baixa
Soroconversão	Alto título soro-neutralizante	Baixo título soro- neutralizante
Genotipos	Todos genótipos	Primariamente o genótipo 1b
Síndromes	Genotipo 2 – Síndrome hemorrágica	Não descrito
Defeitos congênitos	Hipoplasia cerebelar	Não reportado
Testes	ELISA é comumente utilizado	Não validado
Alterações patológicas	Sempre presente	Podem estar ausentes

Adaptado de van Amstel e Kennedy (2010)

### 2.1.3.3 Patologia

Segundo van Amstel (2010), os achados macroscópicos de necropsia em camelídeos sul-americanos positivos para BVDV incluem emagrecimento, opacidade da córnea, edema pulmonar, efusões nas cavidades corporais, linfadenopatia mesentérica, conteúdo intestinal aquoso e filamentos de fibrina no saco pericárdico. (Foster *et al.*, 2007; Mattson *et al.*, 2006; Belknap *et al.*, 2000). A microscopia de tecidos de um animal PI demonstrou necrose de células ganglionares da retina e possível lise neuronal em secções do cérebro (CARMAN, *et al.*, 2005). O exame de imunohistoquímica revelou o antígeno em diferentes tecidos incluindo estômago, rim, tireóide, epitélio da boca e pele (CARMAN *et al.*, 2005).

#### 2.1.3.4 Diagnóstico

##### PCR

O RT-PCR é o método mais eficaz de diagnosticar e genotipar BVDV devido a sua excelente sensibilidade e por não ser inibido pela presença de anticorpos pré-existentes como no ELISA ou no teste de isolamento viral e pode ser utilizados no soro, leucócitos, sangue inteiro ou tecidos (van AMSTEL, 2010). Em grandes rebanhos é possível realizar PCR em agrupados de amostra de sangue de mais de dez animais e, se um *pool* de amostras resulta positivo, cada um dos animais deste *pool* são re-testados a fim de identificar o animal infectado (van AMSTEL, 2010).

##### ELISA

O ELISA pode ser utilizado para avaliar rebanhos bovinos ou de camelídeos para determinar uma infecção ativa por BVDV (FOWLER, 2010).

##### Imunohistoquímica (IHQ)

A detecção do antígeno pode ser feita através do exame de IHQ em amostras de pele ou de tecidos fixados em formalina. Na utilização de anticorpos monoclonais no teste, é possível a ocorrência de falsos positivos uma vez que esses anticorpos tipicamente não reconhecem todas as cepas de BVDV (GOYAL *et al.*, 2002). O isolamento viral é considerado o padrão ouro de diagnóstico. (POTGIETER, 2004).

##### Soroneutralização (SN)

Os exames de soroneutralização para detecção de anticorpos indicam a exposição, mas não necessariamente uma infecção ativa no animal (van AMSTEL, 2010). Segundo Foster *et al.* (2007), os títulos de anticorpos de uma infecção natural são reportados como 1:20 – 1:480.

##### Diagnóstico diferencial

BVDV em camelídeos geralmente está associado com doença crônica incluindo perda de peso ou diminuição no ganho de peso e sinais de infecções bacterianas como pneumonia. Algumas situações podem requerer especial atenção incluindo falha na transferência de imunidade passiva e complicações associadas com imunodeficiência, parasitismo por *Haemonchus contortis* e coccidiose, especialmente por *Eimeria macusiensis*, também má nutrição e pneumonia (van AMSTEL, 2010).

#### 2.1.3.5 Controle

Tanto no caso de bovino quanto o de camelídeos, a identificação e eliminação de animais PI e a proteção contra infecção fetal são os principais caminhos que se segue na busca pelo controle da enfermidade. Em função das trocas e vendas de animais, situação de possível transferência de patógenos, sempre é aconselhável testar todos animais para a doença, impedindo assim que o vírus seja carregado para outros rebanhos eventualmente livres da doença. Sistemas eficientes de biossegurança e quarentena também são ferramentas úteis nos programas de controle.

As triagens sorológicas são utilizadas para determinar infecções ativas por BVDV em rebanhos. É recomendado que pelo menos 10% do rebanho seja testado ou um mínimo de 15 animais (CALLAN, 2006). Animais de menos de 12 semanas de idade podem ter títulos positivos devido à presença de anticorpos maternos. A utilização de colostro bovino na alimentação de filhotes é uma prática comum e pode confundir a interpretação dos casos soropositivos de um rebanho (TOPLIFF *et al.*, 2009).

Vacinas mortas para bovinos tem sido utilizadas em estudos experimentais em alpacas (KAPIL *et al.*, 2009). Neste estudo a vacinação resultou em soroconversão em todos os animais e proteção contra uma infecção com a cepa de campo de BVDV-1b de alpacas. Vacinas vivas não são recomendadas em camelídeos, mas vacinas inativadas tem sido utilizadas. (FOWLER, 2010)

### 3 CAMELÍDEOS DOMÉSTICOS

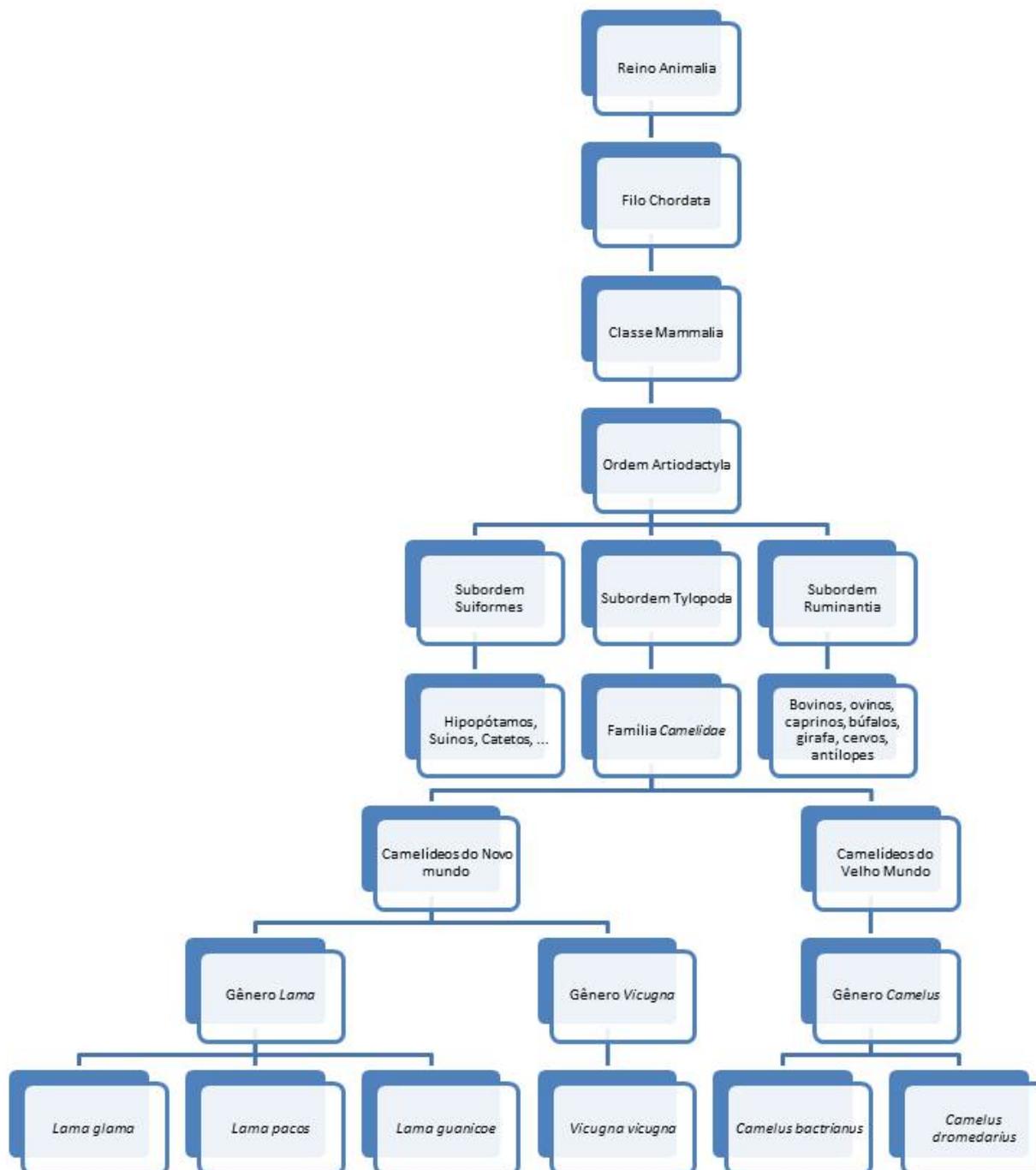
A família Camelidae está dividida em dois grandes grupos: Camelídeos do Velho Mundo (CVM) e Camelídeos Sul-Americanos (CSA). Aqueles são representados por duas espécies distintas: o camelo bacteriano (*Camelus bactrianus*) e o camelo dromedário (*Camelus dromedarius*). Por outro lado, os integrantes do grupo dos CVM são as lhamas (*Lama glama*), os guanacos (*Lama guanicoe*), as alpacas (*Lama pacos*) e as vicunhas (*Lama vicugna*). Ainda é possível dividir estas espécies em domésticos ou selvagens. As espécies domésticas são as lhamas e as alpacas e o guanaco e a vicunha são seus correspondentes silvestres, respectivamente.

A criação de alpacas e lhamas é uma atividade de grande importância econômica para as populações andinas da Bolívia e do Peru, no entanto também é consideravelmente explorada na Argentina, Chile e Equador. (Fernández-Baca, 1991) Diversos produtos são derivados destas espécies domésticas de CSA, como a fibra do pelo, carne, pele, couro e esterco. Além disso, também são espécies utilizadas como força de trabalho, tendo – principalmente a lhama – papel importante no transporte em áreas rurais carentes destes países sul-americanos.

#### 3.1 Taxonomia

Todos os dados sobre a taxonomia dos camelídeos domésticos e selvagens estão demonstradas na **Figura 1**.

Figura 1 - Taxonomia dos Camelídeos



Fonte: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Artiodactyla>

Todos camelídeos exibem processos básicos de ruminação, mas se diferem da subordem Pecora, pela morfologia do estômago. As demais características que os diferenciam são: ausência de cornos ou aspas, presença de caninos verdadeiros separados dos pré-molares pelo diastema, anatomia dos membros pélvicos os permite descansar sobre o ventre com os

joelhos dobrados e os calcanhares atrás e apresentam uma almofada digital ao invés dos cascos.

A origem dos representantes da subordem Tylopoda está na América do Norte há cerca de 50 milhões de anos e, cerca de cinco milhões de anos atrás os ancestrais dos CVM migraram para o nordeste da Ásia através do estreito de Bering e os antecessores dos CSA migraram para a América do Sul. Os camelídeos do velho mundo se adaptaram a viver em ambientes extremos de calor e frio e os camelídeos do novo mundo às regiões frias de grande altitude.

### 3.1.1 Lhama (*Lama glama*)

As lhamas foram domesticadas no Peru, há aproximadamente 6.000 anos e daí foi levada pelo homem aos vales andinos do Peru e norte do Chile. A partir disso a criação se seguiu e foram se distribuindo ao longo dos Andes, desde o sul da Colômbia até a zona central do Chile. A distribuição geográfica da lhama é resultado de fatos históricos: Com a colonização espanhola e a introdução do gado no século XVI, os rebanhos nativos foram rapidamente dizimados e deslocados da costa e dos vales interandinos para os locais de maior altitude onde o gado não se adaptava.

Fenotipicamente estes animais se caracterizam principalmente como “kara pelada”, com pouco desenvolvimento de fibra no corpo, principalmente no rosto e pernas e “lanuda”, que é menos comum, porém com mais fibras no corpo e que se estende na frente e sai pelas orelhas, porém nunca nas pernas. A coloração varia de branco a preto e marrom, podendo alcançar qualquer cor intermediária e tem tendência a manchas de várias cores em um animal. A classificação fenotípica dos camelídeos sul-americanos pode ser complicada uma vez que todos representantes desse grupo possuem o mesmo cariótipo e podem, conseqüentemente, cruzar-se entre si e produzir híbridos férteis.

### 3.1.2 Alpaca (*Lama pacos*)

A história da domesticação e a distribuição das alpacas é bastante semelhante à da lhama, sempre em áreas de grandes altitudes onde outros animais de produção e trabalho não se adaptam.

Fenotipicamente existem duas classificações: Huacaya e Suri. A primeira é caracterizada por abundante crescimento de fibra que cobre o corpo, pernas, pescoço além da face e chegam a cobrir os olhos. A segunda tem fibra ligeiramente ondulada, mais sedosa, fina e de maior crescimento longitudinal e a distribuição corporal é a mesma que a Huacaya. A

coloração de pelagem das alpacas é mais uniforme que da lhama e também varia nas mesmas cores.

### 3.1.3 Camelo bactriano (*Camelus bactrianus*)

O camelo bactriano é bem adaptado ao frio e aos climas áridos da Mongólia, sul da área da antiga União Soviética, China e sul da Ásia. Segundo Fowler (2010), dados exatos sobre a domesticação deste camelo são desconhecidos, porém acredita-se que tenha ocorrido algum tempo antes de 2500 a.C. na fronteira do Turcomenistão e Irã, no lado oeste do Mar Cáspio. O nome “bactriano” é derivado da “Baktria”, norte do Afeganistão, embora não seja o lugar de origem dos camelos e tampouco a espécie se encontre neste.

#### 4 MATERIAL E MÉTODOS

Esse estudo incluiu coletas de sangue em três espécies de camelídeos domésticos: lhama (*L. glama*), alpaca (*L. pacos*) e camelo bactriano (*C. bactrianus*). Os animais foram provenientes de duas propriedades, Parque Zoológico Pampas Safari e um criadouro particular localizado na cidade de Canela, Rio Grande do Sul.

As coletas de sangue foram realizadas com um coletor Vacutainer® e o sangue foi obtido através de venipunção da veia jugular ou da safena externa, em casos em que a coleta na jugular não foi possível. Foram coletados 16 lhamas (53% - 16/30), sendo dez fêmeas e seis machos (71% - 10/14 e 37,5% - 6/16, respectivamente), seis camelos (50% - 6/12), sendo três fêmeas e três machos (50% de ambas populações) e 19 alpacas (73% - 19/26 – 9 machos e 17 fêmeas), porém nesta espécie não foram diferenciados os gêneros, totalizando 41 animais. As idades variaram de um a 18 anos. Nenhum deles apresentava sinais clínicos indicadores da doença no momento da coleta.

O material coletado foi encaminhado ao Laboratório de Virologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICBS/UFRGS) em parceria com o Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF) para realização dos testes de soroneutralização em microplacas para diagnóstico de diarreia viral bovina.

No laboratório as amostras de sangue foram centrifugadas por dez minutos a 1600 x g, o soro foi coletado, inativado por 30 minutos a 56°C e armazenado a -20°C até ser testado. O protocolo aplicado está descrito no **Anexo A**.

Figura 2 – Coleta de sangue da veia jugular em camelo bactriano (*Camelus bactrianus*)



Figura 3 – Coleta de sangue da veia jugular de uma alpaca (*Lama pacos*)



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as amostras de soro avaliadas foram negativas para BVDV. Diversos estudos diagnósticos de diarreia viral bovina em camelídeos têm sido registrados, conforme está demonstrado na **Tabela 4**.

Tabela 4 – Relatos de pesquisas de BVDV em lhamas, alpacas e/ou camelos.

Espécie	Isol. viral	Prevalência	Ac.	Prevalência	Autor	Ano	País
Camelo			+	1 % (2/190) 1,7 % (3/175)	EISA, M. I.	1998	Egito
Camelo			+	52,5%	ZAGHAWA, A.	1998	Egito
Lhama			+	2,05 % (8/390)	PUNTEL <i>et al.</i>	1999	Argentina
Lhama	+	66,6% (2/3)	+	0 %	BELKNAP <i>et al.</i>	2000	EUA
Alpacas e lhamas			+	10,8% (8/74) em alpacas 14% (6/43) em lhamas	CELEDÓN <i>et al.</i>	2001	Chile
Alpaca	+	100% (1/1)			GOYAL <i>et al.</i>	2002	EUA
Alpacas e lhamas			+	0,9%	WENTZ <i>et al.</i>	2003	EUA
Alpaca	+	100% (2/2)	+	85% (17/20) - apresentaram anticorpos	CARMAN <i>et al.</i>	2005	Canadá
Alpacas e lhamas	+	BVDV-1 – 14,2% (6/42) alpacas BVDV-2 – 9,5% (4/42) alpacas e 23% (8/35) lhamas			CELEDÓN <i>et al.</i>	2006	Chile
Alpacas e lhamas			+	0% (0/109 animais) (1/109 – BDV-1 e 4/109 – pestivirus)	DANUSER <i>et al.</i>	2009	Suíça
Alpacas			+	25,4 % dos rebanhos apresentavam soropositividade (16/63) 6,3 % dos rebanhos apresentavam animais PI (4/63)	TOPLIFF <i>et al.</i>	2009	EUA

Camelo dromedário			+	19,7% (27/137)	RAOOFI <i>et al.</i>	2010	Irã
Camelo			+	84,6% (220/260)	INTISAR <i>et al.</i>	2010	Sudão
Lhamas			+	18% (3/17)	MARCOPPIDO <i>et al.</i>	2010	Argentina
Alpaca e lhama			+	Em 2008 – 0% Em 2000 –0,4%	MUDRY <i>et al.</i>	2011	Suíça

Dentre os estudos de sorologia realizados em camelídeos, as prevalências encontradas variam de zero a 85% (EISA, 1998; ZAGHAWA, 1998; PUNTEL, 1999; BELKNAP, 2000; CELEDÓN, 2001, WENTZ, 2003; CARMAN, 2005; DANUSER, 2009; TOPLIFF, 2009; RAOOFI, 2010; INTISAR, 2010; MARCOPPIDO, 2010; MUDRY, 2011).

O resultado negativo de todos os animais coletados no presente estudo, em realidade, condiz com as informações da literatura quanto à baixa taxa de soroprevalência esperada para populações de camelídeos. As altas prevalências encontradas em alguns estudos, os quais destoam do que tem sido considerado mais comum, têm sido associadas com amostragens pequenas de animais. Tais números resultam porcentagens altas, mesmo com um número pequeno de soroconversões (MARCOPPIDO, 2010; CARMAN, 2005). Devido às coletas serem realizadas em animais que vivem em contato com outras espécies de ruminantes (CELEDÓN, 2001), pode haver chance de contato com outros infectados e/ou com sinais clínicos (CARMAN, 2005). Pode haver também o risco em regiões de exploração produtiva e econômica desses animais e a utilização de mesmas pastagens e fontes de água por camelídeos e bovinos (INTISAR, 2010).

No trabalho de Puntel (1999), os resultados obtidos demonstraram que, dentre as lhamas com soroconversão positiva para BVDV (2,05% - 8/390), todas eram provenientes de rebanhos cujos bovinos também foram positivos (rebanho 1: 10,3% (6/58); rebanho 2: 4% (2/50). Nenhum animal de rebanhos onde se criavam apenas lhamas apresentou soroconversão. Já no trabalho de Eisa (1998), embora pequena diferença (1% e 1,7%), também houve uma porcentagem maior de soroconversão em um rebanho de camelos que vivia em contato com bovinos.

O trabalho de Celedón (2001) demonstrou que, dentre todos guanacos e vicunhas de vida livre coletados, nenhum apresentou anticorpos para pestivirus e este achado permite concluir que esses animais não foram expostos às cepas virais testadas. Sabe-se que existe uma grande preocupação dos produtores em relação à possibilidade dos animais selvagens transmitirem ou serem reservatórios de doenças de impacto econômico significativo como a

diarreia viral bovina, porém achados como o de Celedón (2001), Puntel (1999) e Eisa (1998) sugerem que a exposição dos camelídeos ao BVDV ou a outro vírus dessa família está mais relacionada ao contato com demais ruminantes domésticos do que com a exposição ambiental.

Segundo Mudry (2010), o teste de soroneutralização é considerado padrão-ouro nos métodos diagnósticos para anticorpos específicos para pestivirus; no entanto, a sensibilidade e especificidade são difíceis de avaliar precisamente, embora sejam consideradas muito altas. Apesar de ser um teste de escolha para diagnóstico padrão em bovinos, a soroneutralização ainda não tem validação em camelídeos (MARCOPPIDO, 2010). Em função disso, todas as interpretações acerca de resultados obtidos devem ser realizadas com cautela.

Outro grande problema enfrentado no diagnóstico de BVDV em camelídeos é a reatividade-cruzada e, segundo Belknap (2000), a falha em desenvolver uma resposta no caso de exames de soroneutralização podem indicar que os isolados de camelídeos sul-americanos são mais similares a outras pestivirose de outras espécies além dos bovinos. Nos estudos de Danuser (2009) e Mudry (2011) com CSA, houve soroconversão para BVDV, porém, após a relação de títulos pela reação cruzada entre BDV e BVDV, as amostras foram consideradas estimativamente mais similares ao BDV, ou classificadas como “pestivirus indeterminado” e nenhuma como BVDV. Esta diferença está relacionada à capacidade de reação cruzada entre os pestivirus, que pode confundir resultados, uma vez que os métodos diagnósticos podem buscar, por exemplo, proteínas comuns entre espécies dessa família.

## 6 CONCLUSÃO

Os resultados da pesquisa estão em conformidade com o que tem sido registrado na literatura, porém é necessário manter o monitoramento sorológico dos rebanhos, tanto em função de eventuais contaminações, quanto do transporte de animais livres da doença para regiões onde possam ser expostos ao vírus. Sem a proteção dos anticorpos, estes animais podem desenvolver sinais clínicos e, inclusive, causar perdas e impactos econômicos.

Embora exista a hipótese de transmissão viral entre camelídeos e outros ruminantes domésticos, esta ainda não pode ser confirmada e a interpretação dos resultados deve ser cautelosa.

O diagnóstico do vírus da diarreia viral bovina em camelídeos ainda é um desafio uma vez que, nos exames descritos aqui, os parâmetros de diluição não seguiram o padrão de bovinos, demonstrando que ainda é necessário pesquisar mais e padronizar os métodos diagnósticos para estas espécies.

Esse trabalho foi o projeto piloto de um estudo mais amplo e aprofundado sobre esta e outras enfermidades ainda não exploradas na família *Camelidae* no Brasil e é importante ressaltar a necessidade da continuidade da pesquisa que deve envolver rebanhos adicionais e avaliar fatores de risco para que seja possível obter respostas sobre o papel destes animais nos ciclos epidemiológicos.

## REFERÊNCIAS

- BARBER, D. M. L., NETTLETON, P. F., HERRING, J. A. Disease in a dairy herd associated with the introduction and spread of bovine virus diarrhoea virus. **Veterinary Record**. v. 117, p. 459–464, 1985.
- BELKNAP, E. B., COLLINS, J. K., LARSEN, R. S., CONRAD, K. P. Bovine viral diarrhoea virus in New World camelids. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 12, p. 568–570, 2000.
- BOLIN, S. R., LITLEDIKE, E. T., RIDPATH, J. F. Serologic detection and practical consequences of antigenic diversity among bovine viral diarrhoea viruses in a vaccinated herd. **American Journal of Veterinary Research**. v. 52, p. 1033–1037, 1991.
- BOLIN, S. R., RIDPATH, J. F. Differences in virulence between two noncytopathic bovine viral diarrhoea viruses in calves. **American Journal of Veterinary Research**. v. 53, p. 2157–2163, 1992.
- BROCK, K. V., REDMAN, D. R., VICKERS, M. L., IRVINE, N. E. Quantitation of bovine viral diarrhoea virus in embryo transfer flush fluids collected from a persistently infected heifer. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 3, p. 99–100, 1991.
- BROWNLIE, J. The pathogenesis of bovine virus diarrhoea virus infections. **Office International des Epizooties Scientific and Technical Review**. v. 9, p. 43–59, 1990.
- BYERS, S. R., SNEKVIK, K. R., RIGHTER, D. J., et al. Disseminated Bovine viral diarrhoea virus in a persistently infected alpaca (*Vicugna pacos*) cria. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 21, p. 145–148, 2009.
- CALLAN, R. BVD in alpacas: testing and control practices for alpaca herds. Disponível em: <[http://www.coloradoalpaca.com/getting\\_started.html](http://www.coloradoalpaca.com/getting_started.html)>. Acesso em: 16 out 2011.
- CARMAN, S., CARR, N., DELAY, J., et al. Bovine viral diarrhoea virus in alpaca: abortion and persistent infection. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 17, p. 589–593, 2005.
- CELEDON, M. O., OSORIO, J., PIZARRO, J. Aislamiento e identificación de pestivirus obtenidos de alpacas (*Lama pacos*) y llamas (*Lama glama*) de la Región Metropolitana, Chile. **Archivos de Medicina Veterinaria**. v. 38, n. 3, p. 247–252, 2006.
- CELEDON, M. V., SANDOVAL, A., DROGUETT, J., et al. Survey for antibodies to pestivirus and herpesvirus in sheep, goats, alpacas (*Lama pacos*) guanacos (*Lama guanicoe*) and vicuna (*Vicugna vicugna*) from Chile. **Archivos de Medicina Veterinaria**. v. 33, p. 162–175, 2001.
- CHIAPPETTA, C. M. **Pestivirus em animais silvestres**. 2011. 55f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, UFRGS Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

- DANUSER, R., VOGT, H. R., KAUFMANN, T., et al. Seroprevalence and characterization of pestivirus infections in small ruminants and new world camelids in Switzerland. **Schweiz Arch Tierheilkd.** v. 151, n. 3, p. 109-117, 2009.
- DUFFEL, S. J., HARKNESS, J. W. Bovine virus diarrhea-mucosal disease infection in cattle. **Veterinary Record.** Londres, v. 117, n. 10, p. 240-245, sept 1985.
- EISA, M. I. Serological Survey Against Some Viral Diseases in Camels in Sharkia Governorate, Egypt. **Proceedings of the Third Annual Meeting for Animal Production Under Arid Conditions.** v. 1, p. 167-173, 1998.
- EVERMANN, J. F., BARRINGTON, G. M. Clinical features. In: GOYAL, S. M., RIDPATH, J. F. (Ed.) **Bovine viral diarrhea virus: Diagnosis, management, and control.** Ames: Blackwell, 2005. p. 105-119.
- FOSTER, A. P., HOULIHAN, M. G., HOLMES, J. P., et al. Bovine viral diarrhoea virus infection of alpacas (*Vicugna pacos*) in the UK. **Veterinary Record.** v. 161, p. 94-99, 2007.
- FOWLER, M. E. **Medicine and surgery of camelids.** 3. Ed. Ames: wiley-blackwell, 2010, p. 173-183.
- GIVENS, M. D., GALIK, P. K., RIDDELL, K. P., et al. Replication and persistence of different strains of bovine viral diarrhea virus in an in vitro embryo production system. **Theriogenology.** v. 54, p.1093-1107, 2000.
- GOYAL, S. M., BOULJIHAD, M., HAUGERUD, S., RIDPATH, J. Isolation of bovine viral diarrhea virus from an alpaca. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.** v. 14, p. 523-525, 2002.
- GRONDAHL, C., UTTENTHAL, A., HOUE, H., et al. Characterization of pestivirus isolated from a persistently infected mousedeer (*Tragulus javanicus*). **Archives of Virology.** v. 148, p. 1455-1463, 2003.
- GUNN, H. M. Role of fomites and flies in transmission of bovine viral diarrhoea virus. **Veterinary Record.** v. 132, p. 584-585, 1993.
- HARKNESS, J. W. The control of bovine viral diarrhea virus infection. **Annales de Recherches Veterinaires.** Paris, v. 18, n. 2, p. 167-174, 1987.
- HOUE, H. Epidemiology of bovine viral diarrhea virus. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice.** v.11, p. 521-547, 1995.
- INTISAR, K. S., ALI, Y. H., KHALAFALLA, A. I. et al. The first report on the prevalence of pestivirus infection in camels in Sudan. **Tropical Animal Health and Production.** v. 42, p. 1203-1207, 2010.
- KAPIL, S., YEARY, T., EVERMANN, J. F. Viral diseases of new world camelids. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice.** v. 25, n. 2, p. 323-337, July 2009.

KIRKLAND, P. D., MAKINTOSH, S. G., MOYLE, A. The outcome of widespread use of semen from a bull persistently infected with pestivirus. **Veterinary Record**. v. 135, p. 527-529, 1994.

KIRKLAND, P. D., RICHARDS, S. G., ROTHWELL, J. T., STANLEY, D. F. Replication of bovine viral diarrhoea virus in the bovine reproductive tract and excretion of virus in semen during acute and chronic infections. **Veterinary Record**. v. 128, p. 587-590, 1991.

LANG-REE, J. R., VATN, T., KOMMISRUUD, E., LOKEN, T. Transmission of bovine viral diarrhoea virus by rectal examination. **Veterinary Record**. v. 135, p. 412-413, 1994.

LISS, B., ORBAN, S., FREY, H. R., et al. Studies on transplacental transmissibility of a bovine virus diarrhoea (BVD) vaccine virus in cattle. II. Inoculation Pathogenesis 139 of pregnant cows without detectable neutralizing antibodies to BVD virus 90-229 days before parturition (51st to 190th day of gestation). **Zentralbl Veterinarmed B**. v. 31, p. 669-681, 1984.

MacLACHLAN, N. J., DUBOVI, E. J. (Ed.). **Fenner's Veterinary Virology**. 4. ed. Londres: Elsevier, 2011, p. 467-479.

MAINAR-JAIME, R. C., BERZAL-HERRANZ, B., ARIAS, P., ROJO-VÁLZQUEZ, F. A. Epidemiological pattern and risk factors associated with bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection in a non-vaccinated dairy cattle population from the Asturias region of Spain. **Preventive Veterinary Medicine**. v. 52, p. 63-73, 2001.

MARCOPPIDO, G., PARREÑO, V., VILÁ, B. Antibodies to Pathogenic Livestock Viruses in a Wild Vicuña (*Vicugna vicugna*) Population in the Argentinean Andean Altiplano. **Journal of Wildlife Diseases**. v. 46, n.2, p. 608-614, 2010.

MATTSON, D. E., BAKER, R. J., CATANIA, J. E., et al. Persistent infection with bovine viral diarrhoea virus in an alpaca. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 228, p. 1762-1765, 2006.

MOERMAN, A., STRAVER, P. J., De JONG, M. C. M., et al. A long term epidemiological study of bovine viral diarrhoea infections in a large herd of dairy cattle. **Veterinary Record**. v. 132, p. 622-626, 1993.

MUDRY, M., MEYLAN, G., STEINER, R., et al. Epidemiological Study of Pestiviruses in South American Camelids in Switzerland. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v. 24, p. 1218-1223, 2010.

MUÑOZ-ZANZI, C., HIETALA, S., THURMOND, M., JOHNSON, W. Quantification, risk factors, and health impact of natural bovine viral diarrhoea virus congenital infection in dairy calves on two large California dairies. **American Journal of Veterinary Research**. v. 64, p. 358-365, 2003.

MUÑOZ-ZANZI, C., THURMOND, M., JOHNSON, W., HIETALA, S. Predicted ages of dairy calves when colostrum-derived bovine viral diarrhoea virus antibodies would no longer offer protection against disease or interfere with vaccination. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 221, p. 678-685, 2002.

- NISKANEN, R., LINDBERG, A., LARSSON, B., ALENIUS, S. Lack of virus transmission from bovine viral diarrhoea virus infected calves to susceptible peers. **Acta Veterinaria Scandinavica**. v. 41, p. 93–99, 2000.
- ORBAN, S., LIESS, B., HAFEZ, S. M., et al. Studies on transplacental transmissibility of bovine virus diarrhoea (BVD) vaccine virus. I. Inoculation of pregnant cows 15 to 90 days before parturition (190th to 265th day of gestation). **Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B**. v. 30, p. 619–634, 1983.
- POTGIETER, L. N. D. Bovine viral diarrhoea and mucosal disease. In: COETZER, J. A.W., TUSTIN 2nd, R. C. (Eds.). **Infectious Diseases of Livestock**. Oxford University Press, Capetown, South Africa, 2004, p. 946–969.
- PUNTEL, M., FONDEVILLA, N. A., VIERA, J. B., et al. Serological survey of viral antibodies in llamas (*Lama glama*) in Argentina. **Journal of Veterinary Medicine**. v. 157, p. 157–161, 1999.
- RADOSTITS, O. M., GAY C. C., BLOOD, D. C., HINCHCLIFF, K.W. (Ed.) Bovine virus diarrhoea, mucosal disease, bovine pestivirus complex. In: **Veterinary Medicine: a textbook of the disease of cattle, sheep, pigs, goats, horses**. 9. Ed. Nova York: Saunders, 2000. p. 1085–1105.
- RADOSTITS, O. M., LITTLEJOHNS, I. R. New concepts in the pathogenesis, diagnosis, and control of diseases caused by the bovine viral diarrhoea virus. **Canadian Veterinary Journal**. v. 29, p. 513–528, 1988.
- RAOOFI, A., HEMMATZADEH, F., GHANAEI, A. M. Serological survey of antibodies against BVD virus in camels (*Camelus dromedarius*) in Iran. **Tropical Animal Health and Production**. v. 42, p. 411–414, 2010.
- RIDPATH, J. F. Classification and Molecular Biology. In: GOYAL, S. M., RIDPATH, J. F. (Ed.) **Bovine viral diarrhoea virus: Diagnosis, management, and control**. Ames: Blackwell, 2005. p. 65–80.
- RUSH, D. M., THURMOND, M. C., MUÑOZ-ZANZI, C., HIETALA, S. K. Descriptive epidemiology of postnatal bovine viral diarrhoea virus infection in intensively managed dairy heifers. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 219, p. 1426–1431, 2001.
- TARRY, D. W., BERNAL, L., EDWARDS, S. Transmission of bovine virus diarrhoea virus by bloodsucking flies. **Veterinary Record**. v. 128, p. 82–84, 1991.
- TOPLIFF, C. L., SMITH, D. R., CLOWSER, S. L., et al. Prevalence of bovine viral diarrhoea virus infections in alpacas in the United States. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 234, p. 519–529, 2009.
- VAN AMSTEL, S., KENNEDY, M. Bovine Viral Diarrhoea infections in new world camelids – a review. **Small Ruminant Research**. v. 91, p. 121–126, 2010.

VOGES, H., HORNER, G. W., ROWE, S., WELLENBERG, G. J. Persistent bovine pestivirus infection localized in the tests of an immune-competent, non-viremic bull. **Veterinary Microbiology**. v. 61, p. 165-175, 1998.

WENTZ, P. A., BELKNAP, E. B., BROCK, K.V., COLLINS, J.K., PUGH, D. G. Evaluation of bovine viral diarrhea virus in New World camelids. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 223, p. 223–228, 2003.

WHEELER, J. C. Origen, evolucion y status actual. In: FERNANDEZ-BACA, S. (Ed.). **Avances y perspectivas del conocimiento de los camelidos sudamericanos**. Santiago: Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe, 1991. p. 11-48.

YOUSIF, A. A., BRAUN, L. J., SABER, M. S., ABOELLEIL, T., CHASE, C. C. L. Cytopathic genotype 2 bovine viral diarrhea virus in dromedary camels. **Arab Journal Of Biotechnology**. v. 7, p. 123–140, 2003.

ANEXO A – Protocolo de soroneutralização em microplaca aplicado pelo Laboratório de  
Virologia do ICBS/UFRGS

**PROVA DE SORONEUTRALIZAÇÃO EM MICROPLACAS – Incubação soro-vírus**

**24 horas**

**Material:**

- Placa para cultivo celular, estéril (96 orifícios)
- Meio EAGLE-MEM com 10% SFB (soro fetal bovino)
- Calhas para meio e células
- Pipetador multicanal
- Pipetador monocanal
- Soros a testar
- Soros controle
- Ampola de vírus com título conhecido
- Células tripsinizadas

**Método:**

1. No fluxo laminar adicionar 50 ul de meio contendo 10% SFB e antibiótico (em concentração usual) em cada um dos orifícios da placa.
2. Diretamente na placa, preparar diluições do soro a testar. Nesse caso, utilizaremos diluições  $\frac{1}{2}$ ,  $\frac{1}{4}$ . Logo, sobre 50 ul de meio adicionamos 50 ul de soro a testar, em duplicata, nos primeiros dois orifícios da linha “A” da placa.

3. Homogeneizar com pipeta a mistura meio-soro várias vezes e transferir 50 ul do soro diluído  $\frac{1}{2}$  para a linha "B". Misturar novamente e desprezar 50 ul. Reserve 16 orifícios em uma placa para as diluições de controle do vírus.
4. Preparar um volume apropriado da diluição do vírus contendo 100 DICCC<sub>50</sub> por orifício, bem como diluições controle contendo 10, 1 e 0,1 DICCC<sub>50</sub>.
5. Adicionar 50 ul das diluições controle do vírus, quatro orifícios por diluição, nos orifícios reservados a esse fim já contendo 50 ul de meio com SFB.
6. Adicionar 50 ul da diluição do vírus contendo 100 DICCC<sub>50</sub> por orifício contendo soro em teste.
7. Incubar a placa por 24 horas a 37 °C.
8. Faltando cerca de 15 minutos para o final do período de incubação, preparar uma suspensão de células contendo aproximadamente 1.000.000 de células/ml (ou seja, 50 000 células/50 ul).
9. Ao final do período de incubação, colocar 50 ul da suspensão de células por orifício.  
**Atenção: Não agite nem bata nas placas após a adição das células! Se agitadas, células em suspensão tenderão a se acumular nas bordas dos orifícios!**
10. Manter a placa a 37°C durante 72 horas e, após este período, fazer a leitura das placas utilizando microscópio óptico observando a presença ou ausência de efeito citopatogênico (ECP).

**Observação:**

- A diluição dos soros será realizada na própria placa, então a cada homogeneização da mistura meio-soro e passagem para os orifícios posteriores deve ser realizada a troca de ponteiros para homogeneizar.
- Antes de adicionar os controles das DIs do vírus é necessário adicionar 50 ul de meio com SFB, procedimento semelhante a adição das amostras de soro.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.  
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.  
This page will not be added after purchasing Win2PDF.