

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**HERPESVÍRUS E PESTIVÍRUS EM REBANHOS BUBALINOS DO RIO
GRANDE DO SUL**

Mestranda: Camila Mengue Scheffer

Porto Alegre

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**HERPESVÍRUS E PESTIVÍRUS EM REBANHOS BUBALINOS DO RIO
GRANDE DO SUL**

Mestranda: Camila Mengue Scheffer

Dissertação de mestrado apresentada como requisito ao grau de Mestre em Ciências Veterinárias, área de Microbiologia Veterinária – Virologia.

Orientador: Paulo Michel Roehe

Porto Alegre

2013

CIP - Catalogação na Publicação

Mengue Scheffer, Camila
HERPESVÍRUS E PESTIVÍRUS EM REBANHOS BUBALINOS DO
RIO GRANDE DO SUL / Camila Mengue Scheffer. -- 2013.
96 f.

Orientador: Paulo Michel Roehs.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias,
Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. Herpesvírus. 2. Pestivírus. 3. Bubalinos. 4.
Soroneutralização. 5. qPCR. I. Michel Roehs, Paulo,
orient. II. Título.

CAMILA MENGUE SCHEFFER
LICENCIADA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos para a obtenção do grau de
MESTRE EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
MICROBIOLOGIA VETERINÁRIA
VIROLOGIA

Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Faculdade de Veterinária
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovada em: 08/03/2013
Pela banca examinadora

ANA CLÁUDIA FRANCO

FABIANA QUOOS MAYER

WILIA MARTA ELSNER DIEDERICHSEN DE BRITO

DEDICATÓRIA

Ao meu tio Mito, que muito se orgulhou das minhas escolhas, mas que infelizmente não mais está entre nós para que eu possa abraçá-lo e dividir essa grande alegria.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a DEUS por ter me permitido sonhar e concedido a graça de tornar meus sonhos realidade.

Aos meus pais José e Odete, que mesmo desconfiados frente as minhas decisões, sempre me apoiaram em tudo, com muito amor.

À minha irmã, que me acolheu sem hesitar quando decidi deixar o conforto da casa dos meus pais no interior para iniciar uma nova etapa da minha vida em busca de um sonho. Carina, você foi fundamental.

À minha sobrinha Amandinha, que tornou minha vida mais bela.

Ao meu noivo Marcelo... impossível descrever aqui tudo que tenho a agradecê-lo, devo resumir tudo em uma palavra: OBRIGADO!

Ao meu querido sogro e minha amada sogrinha, uma segunda mãe, obrigada pelas sábias palavras.

Aos meus cunhados Luciana e Willian, pela amizade, parceria, bom humor e incentivo!

Ao Dr. Paulo M. Roehe, pela oportunidade, ensinamentos, paciência e chocolates sem glúten. Você é um exemplo de pessoa e profissional. Muito Obrigada!

À Dra Ana Claudia Franco, por ter me recebido de forma amiga e acolhedora, jamais esqueerei.

Aos componentes da banca Ana Cláudia, Fabiana e Willia por aceitarem o convite e participarem deste importante processo.

Aos meus colegas do IPVDF que se tornaram grandes amigos: Ana, Candice, Samuel, Helton, Thais, Raíssa, Nadine, Diane, Vacaria, Esmaille e Hiran.

Aos colegas do Laboratório de Virologia do ICBS: Fabrício, Martha, Juliana, Thalita, Marcus, Jose, Fernando, Fernanda.

Aos produtores rurais pelas amostras concedidas e pela recepção em suas propriedades.

Às instituições: UFRGS, IPVDF/FEPAGRO, CNPq e FINEP.

Ao Laboratório de Virologia e Imunologia da Faculdade de Veterinária da UFPel, em especial, ao Prof. Dr. Geferson Fischer e a mestranda Daiana Medeiros.

Por fim, um agradecimento especial à minha super equipe de coleta: Vacaria, Helton, Ana, Luiz Josemar, Thais, Diane, Phelipe, Marcelo e Willian sem vocês eu não teria conseguido!!!!

Muito obrigada a todos!

HERPESVÍRUS E PESTIVÍRUS EM REBANHOS BUBALINOS NO RIO GRANDE DO SUL

RESUMO

Os herpesvírus bovinos tipo 1 (BoHV-1) e tipo 5 (BoHV-5) e o vírus da diarreia viral bovina (BVDV), são causas importantes de prejuízos sanitários e econômicos na bovinocultura. Estes agentes têm sido eventualmente detectados em búfalos (*Bubalus bubalis*) embora o papel desses vírus na biologia dessa espécie seja ainda desconhecido. A produção de búfalos vem se desenvolvendo expressivamente no Brasil, onde esses animais são mantidos frequentemente próximos ou associados à criação de bovinos. Como parte inicial de um projeto mais amplo sobre infecções por BoHV-1, BoHV-5, BuHV-1 e BVDV em búfalos, o presente estudo objetivou analisar a presença de anticorpos neutralizantes e genomas virais em amostras de soros bubalinos coletados em rebanhos do Estado do Rio Grande do Sul. Foram examinados 339 soros de animais maiores de 12 meses, de ambos os sexos, de diferentes raças e tipo de exploração. Os animais não eram vacinados para quaisquer vírus de interesse na pesquisa e se apresentavam sem alterações clinicamente aparentes na ocasião da coleta. Para a detecção de anticorpos neutralizantes, as amostras de soro foram examinadas através do teste de soroneutralização (SN) frente a diferentes amostras de herpesvírus: BoHV-1.1 (amostra LA), BoHV-5b (amostra A663) e BuHV-1 (amostra b6). Cento e oito destas amostras foram examinadas adicionalmente frente ao BoHV-1.1 (amostra EVI123/98) e BoHV-1.2a (amostra SV265/96), para permitir uma avaliação da sensibilidade da SN utilizando como vírus de desafio todas as variantes disponíveis de BoHV-1 e BoHV-5. A sensibilidade da SN foi menor quando considerados os resultados obtidos com cada um dos vírus separadamente. Quando os resultados positivos frente a amostra LA, SV265/96 e A663 foram somados, a prova se apresentou mais sensível. Apesar disso, a SN não permitiu a identificação dos vírus que efetivamente haviam infectado os animais, devido ao elevado grau de reatividade cruzada. Para a verificação da circulação de pestivírus, foram realizados testes de SN utilizando a amostra "Oregon C24V" de BVDV-1 como vírus de desafio. Das 176 amostras analisadas, 19 (10,8 %) apresentaram anticorpos neutralizantes reagentes com o vírus utilizado. Paralelamente, para a detecção de genomas de pestivírus, foi desenvolvida uma reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR) capaz de detectar os três tipos conhecidos de BVDV (1, 2 e 3) e otimizada para o exame das amostras de soros bubalinos. Cinco amostras (2,8 %) continham genomas virais, sugerindo a ocorrência de prováveis infecções persistentes nos animais, semelhante ao que ocorre em bovinos. Os resultados obtidos evidenciam a circulação de herpesvírus e pestivírus nas populações bubalinas analisadas. Mais estudos são necessários para definir quais os agentes efetivamente causadores de infecções nesta espécie animal.

Palavras-chaves: herpesvírus, pestivírus, bubalinos, soroneutralização, qPCR.

HERPESVIRUS AND PESTIVIRUSES IN BUFFALO HERDS IN THE RIO GRANDE DO SUL

ABSTRACT

Bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1), 5 (BoHV-5) and bovine viral diarrhoea virus (BVDV) are major causes of sanitary and economic losses in cattle. These agents have been eventually detected in water buffaloes (Bubalus bubalis), although their role in host species biology is unknown. Buffalo production has had significant increase in Brazil, where these animals are often kept close to or in association with cattle. As part of a wider project on infections with BoHV-1, BoHV-5, BuHV-1 and BVDV in buffaloes, the present study aimed to examine the occurrence of neutralizing antibodies in buffaloes serum samples collected in farms from Rio Grande do Sul State. Three hundred and thirty nine serum samples were collected from animals with ages above 12 months, of both genders, of different races and under different management practices. The animals were not vaccinated for any virus studied in the present study and were all clinically healthy at the time of sample collection. For neutralizing antibodies detection, serum samples were tested in serum neutralization (SN) tests against different herpesviruses: BoHV-1.1 (strain LA), BoHV-5b (strain A663) e BuHV-1 (strain b6). One hundred and eight of these samples were additionally examined with BoHV-1.1 (strain EVI123/98) and BoHV-1.2 (strain SV265/96), to compare SN sensitivity using all available variants of BoHV-1 and BoHV-5 as challenge viruses. The SN sensitivity was lower when results obtained with each virus were considered separately. Sensitivity was maximum when the positive results against strain LA, SV265/96 and A663 were added. Despite this, the SN did not allow the identification of the virus which had actually infected animals, in view of the high degree of antibody cross-reactivity. In order to assess the circulation of pestiviruses, SN tests were carried out using the sample "Oregon C24V" of BVDV-1 as challenge virus. Out of the 176 analyzed samples, 19 (10.8 %) presented neutralizing antibodies to pestivirus. At the same time, for the detection of genomes of pestiviruses, was developed a quantitative polymerase chain reaction (qPCR) able to detect the three known types of BVDV (1, 2 and 3) and optimized for examining bubaline sera. Five samples (2.8 %) contained viral genomes, suggesting the occurrence of persistent infections in animals, analogous to what occurs in cattle. The results obtained confirm circulation of herpesvirus and pestiviruses in examined buffalo populations. Further studies are needed to define which of these viruses effectively infect this animal species.

Keywords: herpesvirus, pestivirus, bubaline, serum neutralization, qPCR.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 9 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA..... | 11 |
| 2.1 Bovinocultura e bubalinocultura no Brasil..... | 11 |
| 2.2 Herpesvírus..... | 12 |
| 2.2.1 Estrutura dos vírions..... | 12 |
| 2.2.2 Replicação..... | 14 |
| 2.2.2.1 <i>Latência</i> | 16 |
| 2.2.3 Herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1)..... | 16 |
| 2.2.4 Herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5)..... | 17 |
| 2.2.5 Herpesvírus bubalino tipo 1 (BuHV-1)..... | 18 |
| 2.2.6 Epidemiologia..... | 19 |
| 2.2.7. Diagnóstico virológico..... | 23 |
| 2.2.7.1 <i>Isolamento viral</i> | 23 |
| 2.2.8 Diagnóstico sorológico..... | 24 |
| 2.2.8.1 <i>Soroneutralização (SN)</i> | 24 |
| 2.2.8.2 <i>Ensaio imunoenzimático (ELISA)</i> | 25 |
| 2.2.9 Diagnóstico molecular..... | 26 |
| 2.2.9.1 <i>Reação em cadeia da polimerase (PCR)</i> | 26 |
| 2.2.9.2 <i>Análise genômica com restrição enzimática (REA)</i> | 27 |
| 2.2.10 Controle e prevenção..... | 27 |
| 2.3 Pestivírus..... | 28 |
| 2.3.1 Estrutura dos vírions..... | 28 |
| 2.3.2 Replicação..... | 29 |
| 2.3.3 Vírus da diarreia viral bovina (BVDV)..... | 30 |
| 2.3.3.1 <i>Manifestações clínicas</i> | 31 |

| | |
|--|-----------|
| 2.3.4 Epidemiologia..... | 33 |
| 2.3.5 Diagnóstico virológico..... | 35 |
| 2.3.5.1 <i>isolamento viral</i> | 35 |
| 2.3.6 Diagnóstico sorológico..... | 35 |
| 2.3.7 Diagnóstico molecular..... | 36 |
| 2.3.8 Controle e prevenção..... | 36 |
| 3 OBJETIVOS..... | 37 |
| 3.1 Objetivo geral..... | 37 |
| 3.2 Objetivos específicos..... | 37 |
| CAPÍTULO 1..... | 38 |
| Anticorpos neutralizantes contra herpesvírus bovino tipo 1, herpesvírus bovino tipo 5 e herpesvírus bubalino tipo 1 em búfalos..... | 38 |
| CAPÍTULO 2..... | 51 |
| Detecção do vírus da diarreia viral bovina (BVDV) em búfalos..... | 51 |
| 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 71 |
| 5 REFERÊNCIAS..... | 73 |

1 INTRODUÇÃO

Os herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1), tipo 5 (BoHV-5) e o herpesvírus bubalino tipo 1 (BuHV-1) são membros da ordem *Herpesvirales*, família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*, gênero *Varicellovirus* (DAVISON, 2010). Embora a maioria das infecções com herpesvírus sejam assintomáticas ou induzam sinais leves, estes agentes podem estar associados a Tabelas patogênicos importantes. O BoHV-1 e o BoHV-5 têm sido associados a vários Tabelas clínicos em bovinos, incluindo rinotraqueíte, vulvovaginite, balanopostite, encefalite e falhas reprodutivas (JONES & CHOWDHURY, 2008; ZAJAC et al., 2010). Por outro lado, não existem relatos associando o BuHV-1 com enfermidades em bubalinos, já que os animais dos quais este agente foi isolado apresentavam infecções subclínicas (ST GEORGE & PHILPOTT, 1972; DE CARLO et al., 2004).

Os herpesvírus bovinos apresentam-se amplamente distribuídos em praticamente todo o mundo, diferindo nas taxas de incidência de acordo com cada região (FRANCO et al., 2012). Há historicamente, uma imprecisão na prevalência de BoHV-1 e BoHV-5, em virtude da classificação prévia destes dois agentes como pertencentes ao mesmo tipo e, principalmente, devido à extensa reatividade sorológica cruzada entre eles (ROEHE et al., 1997; ZAJAC et al., 2006). Mundialmente, pouco se conhece sobre a soroprevalência do BuHV-1 em rebanhos bubalinos (DE CARLO et al., 2004; SCICLUNA et al., 2007). No entanto, o aumento do rebanho bubalino nos últimos anos (IBGE, 2012) tem despertado o interesse em investigar esse agente e avaliar seu potencial patogênico.

Assim como os herpesvírus, os pestivírus também são patógenos de grande importância em medicina veterinária. O vírus da diarreia viral bovina (BVDV) é um membro do gênero *Pestivirus*, da família *Flaviviridae*, responsável por prejuízos relevantes na bovinocultura, principalmente pelas perdas reprodutivas associadas a este agente. O BVDV pode eventualmente atravessar a barreira entre espécies e infectar uma ampla variedade de hospedeiros, tornando-se interessante investigar o papel destes na cadeia epidemiológica (HAMBLIN & HEDGER, 1979; BECHER et al., 1997; STALDER et al., 2005). Essas infecções naturalmente transmitidas podem fazer parte da biologia dos agentes, talvez como um processo adaptativo ou seletivo natural,

visando à sobrevivência do próprio vírus como espécie, levando em conta a disponibilidade eventual de hospedeiros.

O desenvolvimento da bubalinocultura, frequentemente próxima ou associada à criação de bovinos, tornou relevante a análise da circulação do BoHV-1, BoHV-5, BuHV-1 e BVDV nos rebanhos bubalinos. Tal análise pode contribuir com a ampliação do conhecimento da biologia dos vírus relacionados a essa espécie. Para tanto, amostras de soro de búfalos foram coletadas de animais com mais de 12 meses, de ambos os sexos, de diferentes raças e tipo de exploração, oriundos de propriedades comerciais do Rio Grande do Sul. Os animais não eram vacinados para quaisquer vírus de interesse na pesquisa e se apresentavam clinicamente saudáveis na ocasião da coleta. A detecção de anticorpos neutralizantes foi realizada utilizando o teste de soroneutralização (SN) frente a diferentes amostras de vírus. Além disso, uma reação quantitativa em tempo real (qPCR) foi desenvolvida na busca por genoma de pestivírus.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Bovinocultura e bubalinocultura no Brasil

O Brasil tem na bovinocultura uma de suas atividades de maior importância econômica. O país ocupa a primeira posição mundial em termos de rebanho bovino comercial do mundo. Em 2011, a criação de bovino apresentou um aumento de 1,6 % em relação a 2010 (209,5 milhões), totalizando um efetivo com aproximadamente 212,8 milhões de cabeças (IBGE, 2012).

A produção de búfalos tem sido desenvolvida no país como uma alternativa rentável e saudável. A grande adaptabilidade desses animais aos mais variados ambientes, assim como sua elevada fertilidade e longevidade produtiva, despertou o interesse dos produtores permitindo que o rebanho bubalino brasileiro progredisse consideravelmente (MAPA, 2011). No ano de 2011, o Brasil registrou um aumento de 7,8 % (1,300 milhão) do rebanho bubalino em relação ao ano de 2010 (1,185 milhão). Os maiores efetivos são registrados no norte e nordeste do país (Pará - 38,0 %; Amapá - 18,4 % e Maranhão - 6,5 %). No entanto, comparando-se os efetivos nos anos de 2009 e 2010, observa-se um aumento significativo nas Regiões Sul (2,4 %) e Sudeste (15,8 %) do Brasil (IBGE, 2012).

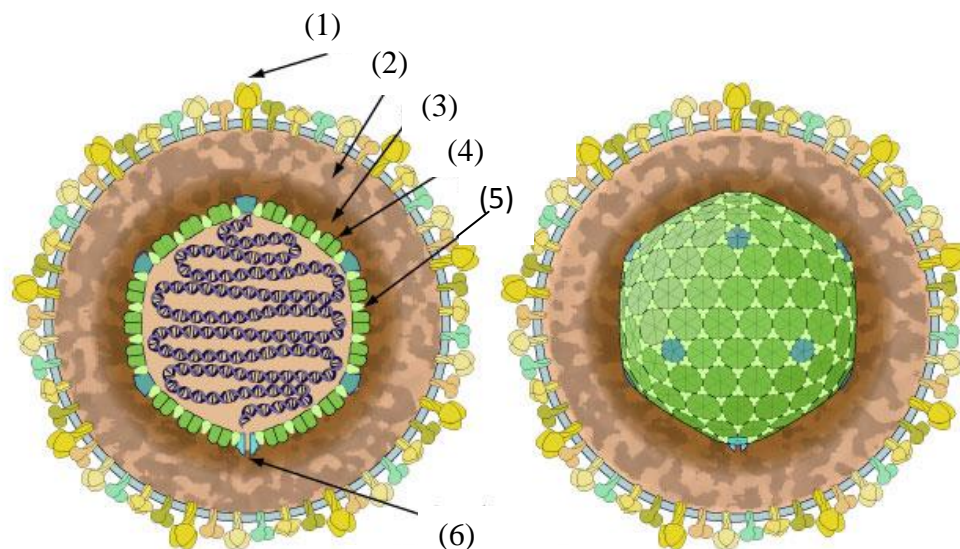
No Rio Grande do Sul, muitas propriedades aderiram à criação de búfalos, porém, algumas continuam mantendo a produção de bovinos. Sendo assim, é importante estabelecer o controle sanitário desses animais, permitindo o domínio de situações que possam resultar em perdas econômicas. Uma falsa ideia de resistência às doenças foi atribuída à espécie bubalina, devido à sua rusticidade. Doenças crônicas, como a tuberculose e a brucelose, assumem caráter de importância frente à grande longevidade dos bubalinos, que pode ser de até 20 anos de vida produtiva, proporcionando maior chance de desenvolvimento e transmissão dessas doenças (ROXO & PAULIN, 2012). Da mesma forma, os bubalinos são suscetíveis a infecções virais, frequentemente associadas a patogenias de importância na bovinocultura (PITUCO et al., 1997; MARTINS et al., 2012; DE CARLO et al., 2004; NANDI et al., 2010; FRANCO et al., 2012). Sendo assim, o conhecimento sobre a patologia, a patogenia e a epidemiologia de agentes causadores ou não de enfermidades, pode contribuir no avanço destas importantes atividades que possuem um relevante papel no desenvolvimento social e econômico de vários países.

2.2 Herpesvírus

2.2.1 Estrutura dos vírions

A partícula viral dos herpesvírus é formada basicamente por quatro estruturas: núcleo, capsídeo, tegumento e envelope (Figura 1). O diâmetro varia de 120 a 300 nm, sem forma definida. O núcleo abriga uma molécula de DNA de fita dupla linear, protegido por um capsídeo icosaédrico de aproximadamente 100 a 110 nm de diâmetro, formado por 162 capsômeros (FENNER et al., 1993; WIRTH, 1993; ROIZMAN & PELLET, 2001).

Figura 1 – Representação esquemática da estrutura viral de um alfa herpesvírus.

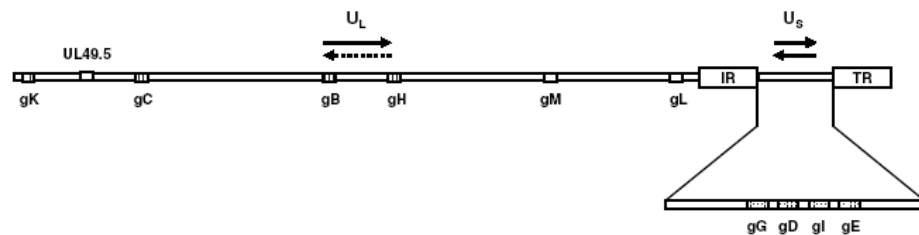


Estrutura viral: (1) Envelope com glicoproteínas, (2) Tegumento externo, (3) Tegumento interno, (4) Capsídeo, (5) Capsômeros do capsídeo, (6) Núcleo contendo o material genético do vírus, com o poro nuclear aparente (adaptado de Viralzone Swiss Institute of Bioinformatics, 2012).

O genoma dos herpesvírus possui entre 125 e 235 mil pares de bases (Kb), dependendo da espécie viral, podendo variar com relação à extensão, composição (conteúdo de GC-AT) e presença de sequências repetidas. A composição de bases do DNA dos herpesvírus varia de 31 a 75 % de G-C em relação ao total de nucleotídeos (ROIZMAN & PELLET, 2001). O genoma possui dois segmentos: uma sequência única longa (L ou UL) e uma sequência única curta denominada segmento S (S ou US). O segmento S é flanqueado por sequências repetidas e invertidas (*repeats*) e por elementos

terminais (TR, *terminal repeats*) com 12.109 pares de bases (pb) cada (Figura 2) (SCHWYZER & ACKERMANN, 1996; DELHON et al., 2003).

Figura 2 - Organização genômica de um alfaherpesvírus de ruminante.



O genoma se constitui de uma fita dupla linear de DNA, dividida em uma região longa (UL) e uma região curta (US) flanqueada por duas sequências repetidas invertidas, denominadas repetição interna (IR) e terminal (TR). O genoma inclui dez genes que codificam diferentes glicoproteínas: seis estão localizados no segmento UL e quatro no segmento US. O segmento US pode apresentar duas possíveis orientações (demonstrado pelas flechas) e o segmento UL apresenta-se predominantemente em uma única orientação. Calcula-se que apenas 5 % dos genomas apresentam-se com o segmento UL na orientação invertida (adaptado de THIRY et al., 2006).

Externamente ao capsídeo está o tegumento, composto por um material amorfo e assimétrico. O tegumento possui pelo menos oito tipos de proteínas codificadas pelo genoma viral, envolvidas na replicação e ativação da transcrição de genes virais (ROIZMAN & PELLET, 2001).

O nucleocapsídeo encontra-se circundado por uma camada lipídica, denominada envelope, o qual possui cerca de 10 glicoproteínas com papel fundamental nas interações entre os vírions e as células hospedeiras (SCHWYZER & ACKERMANN, 1996). Algumas destas glicoproteínas são essenciais à multiplicação viral (gB, gD, gH, gK e gL), enquanto que outras são dispensáveis (gC, gG, gM, gI e gE), apesar de exercerem importantes funções de interação com a célula hospedeira (SCHWYZER & ACKERMANN, 1996; REBORDOSA et al., 1996). As glicoproteínas B (gB), H (gH) e L (gL) são estruturalmente conservadas entre todos os herpesvírus (SCHWYZER & ACKERMANN, 1996). Diferentemente, a glicoproteína C (gC), por ser menos conservada, tem sido utilizada no desenvolvimento de técnicas voltadas ao diagnóstico diferencial, assim como na análise filogenética de novos isolados de herpesvírus (RIJSEWIJK et al., 1999; SPILKI et al., 2005; SILVA et al., 2007; ESTEVES et al., 2008; CAMPOS et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2011).

2.2.2 Replicação

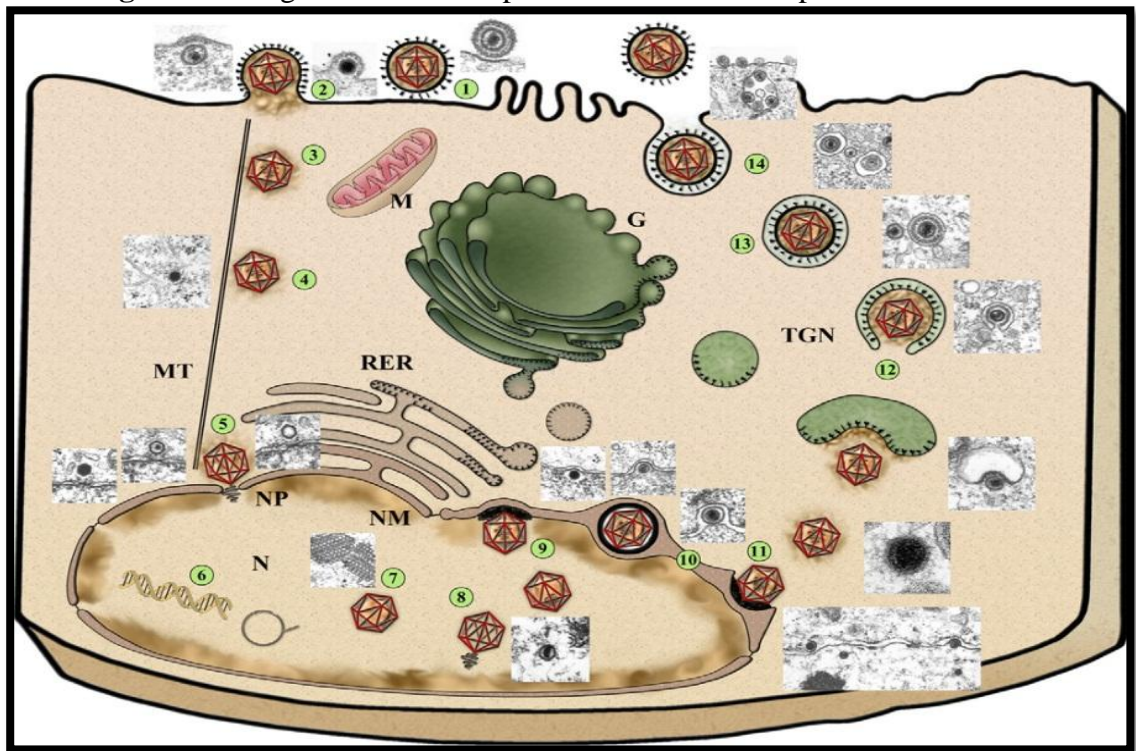
Os alfa herpesvírus possuem um ciclo replicativo relativamente curto, com rápida disseminação em cultivo celular e eficiente destruição das células infectadas (ROIZMAN & PELLET, 2001). Dois ciclos replicativos com características distintas são reconhecidos na biologia dos alfa herpesvírus: a infecção aguda ou produtiva e a infecção latente. A infecção produtiva ocorre nos locais de penetração do vírus no hospedeiro e, provavelmente, também em neurônios, antes do estabelecimento e durante a reativação da infecção latente. Esta etapa do ciclo replicativo caracteriza-se pela expressão de todos os genes virais, replicação do genoma e produção de progênie viral infecciosa (FRANCO et al., 2012).

O início da infecção depende da interação do vírion com receptores de superfície da célula (processo chamado adsorção) e da entrada do nucleocapsídeo no citoplasma (penetração) (SPEAR, 1993; METTENLEITER, 1994; WILD et al., 1998). A adsorção do vírus à célula hospedeira se dá através do reconhecimento e ligação das glicoproteínas do envelope viral a receptores específicos da membrana celular. As principais glicoproteínas envolvidas neste processo são a gB e/ou gC, que reconhecem e ligam-se a receptores celulares. Os alfa herpesvírus utilizam moléculas de glicosaminoglicanos, como o sulfato de heparan ou o sulfato de condroitina, como receptores celulares (FRANCO et al., 2012). Após a interação entre as glicoproteínas do envelope viral e receptores celulares, ocorre a interação entre a gD com a nectina-1, uma proteína da superfamília das imunoglobulinas (SPEAR, 2004). A penetração requer a fusão entre o envelope viral e a membrana plasmática (Figura 3). Uma vez dentro da célula, o vírus é transportado, através de microtúbulos, ao núcleo, onde ocorre a liberação do material genético (WILD et al., 1998). A expressão dos genes α inicia logo após a entrada do genoma no núcleo e tem como função principal sintetizar proteínas que estimulam a transcrição dos genes β . Estes codificam proteínas responsáveis pelo metabolismo de nucleotídeos e pela replicação do DNA. Somente após a replicação do genoma, ocorre a expressão dos genes γ . Os produtos desses genes são principalmente proteínas estruturais do núcleo, capsídeo e envelope (MISRA et al., 1994; CANN, 2005).

A montagem do nucleocapsídeo ocorre no núcleo das células infectadas (RIXON, 1993; STEVEN & SPEAR, 1997). A primeira etapa da maturação dos herpesvírus ocorre por meio de brotamento do nucleocapsídeo com a membrana nuclear interna (envelope primário) (METTENLEITER, 2002). O envelope primário é perdido

por fusão com a membrana nuclear externa (Figura 3). Assim, os capsídeos são translocados para o citoplasma, local onde irão receber o tegumento e o envelope final por um processo de envelopamento secundário. Evidências morfológicas indicam que as vesículas onde ocorre o brotamento são derivadas do retículo endoplasmático e aparelho de Golgi (GERSHON et al, 1994; GRANZOW et al, 2001; McMILLAN & JOHNSON, 2001; METTENLEITER, 2004). O resultado dos processos de envelopamento e de brotamento resume-se na obtenção do vírion dentro de uma vesícula secretória (Figura 3). A vesícula é então transportada para a membrana plasmática, onde sofre fusão, liberando os vírions que poderão infectar células vizinhas (METTENLEITER, 2004). A produção de progênie viral infecciosa resulta em destruição da célula infectada, devido a graves alterações estruturais e bioquímicas que ocorrem em consequência da replicação viral (ROIZMAN & PELLET, 2001; THIRY et al., 2006; FRANCO et al., 2012).

Figura 3 - Diagrama do ciclo replicativo de um alfa herpesvírus.



Após a fixação (1) e penetração (2), os capsídeos são transportados para o núcleo (N) (3) através da interação com microtúbulos (MT) (4), encaixam no poro nuclear (NP) (5), onde o genoma viral é liberado. Neste local ocorre a transcrição de genes virais e a replicação do genoma (6). Os concatêmeros, formados na replicação do genoma, são clivados durante o processo de montagem dentro dos capsídeos pré-formados (7, 8) que, em seguida, deixarão o núcleo por brotamento do nucleocapsídeo com a membrana nuclear interna (MNI) (9), seguido pela fusão do envelope destes vírions primários localizados no espaço perinuclear (10) com a membrana exterior nuclear (11). A maturação final ocorre no citoplasma por envelopamento secundário do capsídeo via brotamento em vesículas do aparelho de Golgi (TGN) (12) contendo as glicoproteínas virais (pontos negros), resultando em um vírion envelopado dentro de uma vesícula celular que será transportado à superfície da célula (13), onde ocorre a fusão da vesícula com a membrana plasmática (14), levando a liberação de um vírion maduro. (RER) Retículo endoplasmático rugoso; (M) Mitocôndria; (G) Aparelho de Golgi (adaptado de Mettenleiter et al., 2009).

2.2.2.1 Latência

Uma característica marcante dos herpesvírus é o estabelecimento de infecções latentes no hospedeiro. A latência pode ser definida como uma persistência do vírus no organismo animal, sem multiplicar-se, não resultando em progênie viral infecciosa (FRANCO et al., 2012). A infecção latente pode ser estabelecida em vários tecidos e tipos celulares. Os alfa herpesvírus possuem a capacidade de estabelecer latência em gânglios nervosos sensoriais, mais especificamente nos gânglios trigêmeos (quando a infecção ocorre por via respiratória) e gânglios sacrais (quando a infecção ocorre por via genital) (ROIZMAN & PELLET, 2001). O estabelecimento da latência acontece com a entrada do genoma viral no neurônio sensorial, durante a infecção aguda. A expressão dos genes virais é quase que totalmente extinta, mantendo-se restrita somente à produção de pequenos transcritos, denominados “transcritos relacionados à latência”, ou LRT (“latency-related transcripts”) (WORKMAN et al., 2011). Esta fase permanece por toda vida do hospedeiro, podendo ser eventualmente intercalada por episódios de reativação (MUYLKENS et al., 2007; JONES & CHOWDHURY, 2008). Isso pode acontecer em resposta a estímulos naturais (estresse, parto, desmame, transporte) ou induzidos (tratamento com corticosteróides). A reativação é um dos fatores responsáveis pela perpetuação e transmissão do vírus a hospedeiros suscetíveis (PASTORET & THIRY, 1985; TIKOO et al., 1995; MEYER et al., 2001; CARON et al., 2002).

Na fase de reativação, há uma redução da expressão de LRT e consequente aumento da expressão de outros genes virais (MUYLKENS et al., 2007; JONES & CHOWDHURY, 2008). Os vírions produzidos pela replicação produtiva nos sítios de latência (gânglio trigêmio ou sacral) durante a reativação são transportados pelas mesmas vias de volta aos sítios de infecção primária (via respiratória ou genital). Assim, o hospedeiro volta a disseminar e transmitir o vírus, o que pode ocasionalmente ser acompanhado de sinais clínicos e lesões nos locais de replicação (THOMISHIMA & ENQUIST, 2001). A ocorrência de sinais clínicos associada à reativação é denominada recorrência ou recrudescência, geralmente caracterizada por sinais clínicos mais brandos do que aqueles resultantes da infecção aguda (FRANCO et al., 2012).

2.2.3 Herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1)

O genoma viral do BoHV-1 é de DNA dupla fita linear com aproximadamente 137 mil pares de bases (Kb) (FIELDS & KNIPE, 1992; ROIZMAN, 1992; FRANCO et al., 2012). A sequência completa do genoma foi obtida a partir da composição de cinco

genomas de diferentes isolados, sequenciados parcialmente (Jura, K22, Cooper, P8-2, 34) (GenBank, acesso AJ004801-1). Recentemente, foi sequenciado o genoma completo da cepa Cooper (D’OFFAY et al., 2012).

Com base em análises genômicas, o BoHV-1 pode ser subdividido nos subtipos BoHV-1.1, BoHV-1.2a e BoHV-1.2b. As amostras classificadas como BoHV-1.1 representam as amostras clássicas do vírus associadas com doença respiratória (Rinotraqueíte infecciosa bovina - IBR) e também, ocasionalmente, abortos. O BoHV-1.2a é associado a uma ampla variedade de manifestações clínicas, incluindo doença do trato genital (Vulvovaginite/balanopostite pustular infecciosa - IPV/IPB), abortos e infecções do trato respiratório. Já o BoHV-1.2b é frequentemente associado com doença respiratória leve e IPV/IPB, não sendo ainda associado a aborto. Por isso, amostras do subtipo 2b são consideradas menos patogênicas do que as amostras do subtipo 1 (ENGELS et al., 1981; METZLER et al., 1985; SCHUDEL et al., 1986; EDWARDS et al., 1990; 1991; MILLER et al., 1991; SOUZA et al., 2002; D’ARCE et al., 2002; JONES & CHOWDHURY, 2008; FRANCO et al., 2012).

Amostras de BoHV-1 associadas a casos de encefalite eram denominadas BoHV-1.3 (METZLER et al., 1986; STUDDERT, 1989). Em 1992, o BoHV-1.3 foi reclassificado como BoHV-5 pelo *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV, 1992), baseado em mapas de sítios de restrição enzimática do DNA viral (D’OFFAY et al., 1993; WHETSTONE et al., 1993), testes de neutralização cruzada e reatividade com anticorpos monoclonais (ROIZMAN 1992; COLLINS et al., 1993). Não obstante, algumas amostras de BoHV-1 são claramente neuropatogênicas (BARENFUS et al., 1963; FURUOKA et al., 1995; ROELS et al., 2000; PENNY et al., 2002; SILVA et al., 2007).

2.2.4 Herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5)

A única amostra de BoHV-5 (SV- 507/99) completamente sequenciada tem um genoma constituído por 138.890 pb, 2.518 pb a mais que o BoHV-1 (DELHON et al., 2003). De acordo com análises de restrição enzimática, o BoHV-5 pode ser classificado em três subtipos: “a”, “b” e “não a - não b” (D’ARCE et al., 2002). Por sugestão de um dos revisores do artigo de D’Arce e colaboradores (2002), as amostras para as quais os autores haviam proposto a designação de subtipo “c” foram denominadas “não a - não b”. No entanto, a denominação “c” deve ser adotada por ser mais conveniente e simples (ROEHE, P.M., comunicação pessoal).

Não há informações a respeito de associações entre subtipos de BoHV-5 e diferentes Tabelas clínicas (METZLER et al., 1986; D'OFFAY et al., 1995; PIDONE et al., 1999; D'ARCE et al., 2002; COLODEL et al., 2002). Entretanto, à medida que mais amostras forem subtipificadas, é provável que detalhes de sua patogenia venham a ser esclarecidos e que novas associações sejam identificadas entre determinados subtipos e certas patologias. Um exemplo disso pode ser o subtipo “c” que tem sido mais frequentemente detectado no Rio de Janeiro e sul de Minas Gerais; estas amostras têm na maioria sido identificadas durante o diagnóstico diferencial de raiva (PINTO et al., 2003). Por outro lado, na região Sul, onde o subtipo “c” não foi até o momento identificado, raramente o BoHV-5 do subtipo “a”, mais prevalente naquele Estado, se encontra envolvido em casos com suspeita de raiva. Igualmente, em Minas Gerais, a maioria das amostras de BoHV-5 tem sido isoladas de animais mais velhos, enquanto que na região Sul o BoHV-5 causa doença em animais mais jovens. Como poucas amostras de Minas Gerais foram subtipificadas até o momento, não é possível fazer afirmações a respeito dessas diferenças, mas é possível que tais diferenças tenham associações com determinados subtipos de vírus.

A diferenciação tipo e subtipo-específica são importantes para que possamos aprofundar o conhecimento sobre a biologia dos herpesvírus. Se tais variantes foram geradas e conservadas nas populações virais, isso se deu porque, certamente, tais variantes devem ter obtido algum tipo de vantagem evolutiva ao longo do processo adaptativo em seus hospedeiros, caso contrário, se perderiam ao longo do tempo. Consequentemente, enquanto tal diferenciação não for possível, será muito difícil examinar e estudar características as nuances associadas à biologia de cada uma dessas variantes. Isso pode ter reflexos importantes inclusive no controle ou erradicação dessas enfermidades, pois determinadas variantes podem ser mais ou menos adaptadas a determinado tipo de transmissão, podendo requerer atitudes preventivas diversas (ROEHE P.M, comunicação pessoal).

2.2.5 Herpesvírus bubalino tipo 1 (BuHV-1)

Somente alguns genes do BuHV-1 foram parcialmente sequenciados. O gene *UL27* que codifica a glicoproteína B (gB) e o gene *US8*, que codifica a glicoproteína E (gE) foram comparados aos mesmos genes de outros alfa herpesvírus de ruminantes. A similaridade dos nucleotídeos entre o gene *gB* de BuHV-1 e *gB* de BoHV-1.1 e BoHV-1.2 é de 97,2 %, e com BoHV-5, 99,3 %. Já o gene *gE* de BuHV-1, apresentou 78,8 %

de similaridade quando comparado ao BoHV-1.1, 79,8 % ao BoHV-1.2 e 92,7 % ao BoHV-5 (THIRY et al., 2007). Outro estudo, utilizando a *gB*, indicou 97,9 % de similaridade do BuHV-1 quando comparado ao BoHV-5 e 87,7 % quando comparado ao BoHV-1, indicando que a *gB* do BuHV-1 e BoHV-5 possuem alta identidade. Além disso, este mesmo estudo mostrou que assim como o BoHV-5 e o BoHV-1, os herpesvírus de cervídeos e caprinos (CerHV, CapHV) também são herpesvírus relacionados ao BuHV-1 (ROS & BÉLAK, 2002). Previamente, Bulach e Studdert haviam demonstrado semelhanças existentes entre o BuHV-1, BoHV-5 e BoHV-1 através de um estudo comparativo entre mapas genômicos desses vírus (BULACH & STUDDERT, 1990).

2.2.6 Epidemiologia

O BoHV-1 e o BoHV-5 já foram descritos em várias regiões do mundo (Tabela 1). Alguns países da Europa como Áustria, Dinamarca e Finlândia, conseguiram erradicar a infecção pelo BoHV-1, tendo obtido essa condição por meio da identificação e eliminação de animais soropositivos. Outros países, como a Austrália, Bélgica, Canadá, Índia, Turquia, Estados Unidos, Alemanha e Suíça, tem implementado programas de erradicação por meio da vacinação compulsória dos rebanhos, identificação e eliminação gradual dos animais portadores (EDWARDS et al., 1991; NOORDEGRAAF et al., 2000; SALWA et al., 2000; GALIERO et al., 2001; MADINELLI et al., 2001; TURIN & RUSSO, 2003; BOELAERT et al., 2005; FRANCO et al., 2012). Relatos de surtos relacionados ao BoHV-5 são mais comuns em países do Hemisfério Sul, como o Brasil, a Argentina e o Uruguai (Tabela 1). A baixa ocorrência da infecção por este agente em países do Hemisfério Norte pode ser explicada devido ao uso de vacinação contra BoHV-1 em larga escala. Tem sido relatado que vacinas contra o BoHV-1 podem conferir proteção cruzada contra o BoHV-5 (ELY et al., 1996; CASCIO et al., 1999; FRANCO et al., 2012).

A incapacidade dos testes sorológicos em diferenciar as respostas imunológicas induzidas pelo BoHV-1 e BoHV-5 impossibilita inferir a real prevalência das infecções por estes vírus. Além disso, somente há alguns anos atrás o tipo 5 foi diferenciado do tipo 1 (ROIZMAN et al., 1992). A maioria dos estudos sorológicos eram - e ainda o são - realizados com amostras de BoHV-1 como vírus de desafio ou como fonte de antígenos para ensaios imunoenzimáticos. O uso de apenas uma amostra de BoHV-1 em testes de soroneutralização pode influenciar no resultado devido à existência de

uma variabilidade de reação das amostras de herpesvírus (HOLZ et al., 2010; VARELA et al., 2010). Deste modo, as prevalências investigadas tornam-se apenas meras estimativas que, de qualquer forma, refletem a ampla distribuição de BoHV-1 e BoHV-5 nos rebanhos brasileiros.

Com base em estudos realizados tomando o BoHV-1 como modelo experimental, as principais fontes de infecção dos herpesvírus bovino são o contato direto com secreções oronasais e genitais contaminadas, incluindo fluídos fetais, tecidos e sêmen (tanto por monta natural como por inseminação artificial). O vírus também pode estar presente no fluído folicular, associado às células epiteliais de oviduto e nos oócitos (BIELANSKI et al., 1993; ROCHA et al., 1998; VANROOSE et al., 1999; SILVA-FRADE et al., 2010).

Os fatores que favorecem a disseminação viral nos rebanhos incluem principalmente a grande concentração de animais, a introdução de bovinos de outros locais e o desmame de animais em idade que coincide com o decréscimo da imunidade passiva (GEORGE, 1991). Todos os animais de um rebanho podem tornar-se infectados dentro de um curto período de tempo através de aerossóis (GIBBS & RWEYEMAMU, 1977; EDWARDS et al., 1991; VAN OIRSCHOT, 1995). Nas condições de manejo adotadas em grande número de propriedades rurais no Rio Grande do Sul, a maior probabilidade de contaminação com BoHV-1 se dá por ocasião da entrada de serviço reprodutivo, ao qual permite indicar soroprevalência de 12,7 % de animais até um ano, 38,8 % entre um e dois anos e 48,5 % dos animais com mais de dois anos de idade (DIAS, 2006). Quanto ao BoHV-5, ainda não se sabe em que momento os animais são mais frequentemente infectados em condições criatórias usuais em nosso meio, já que estudos desse tipo ainda não foram realizados.

Os herpesvírus bovinos possuem a habilidade de infectar outras espécies de ruminantes tais como caprinos, ovinos, bubalinos, entre outros (TOLARI et al., 1990; HAGE et al., 1997; SILVA et al., 1999; PESHEV & CHRISTOVA, 2000; SIX et al., 2001; MOLLEMA et al., 2005; SCICLUNA et al., 2006). Essa informação gera especulações sobre o papel destas espécies na biologia e evolução desses agentes. Estima-se que esses animais possam atuar como uma espécie de reservatório desses vírus (THIRY et al., 2006).

Tabela 1 – Ocorrências de BoHV-1 e BoHV-5 descritas em diferentes países.

| Continentes | BoHV-1 | | BoHV-5 | |
|-------------|------------|-----------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | País | Referências | País | Referências |
| América | México | SOLIS-CALDERON et al., 2003 | Estados Unidos | BARENFUS et al., 1963 |
| | Costa Rica | RAIZMAN et al., 2011 | Estados Unidos | REED et al., 1973 |
| | Equador | CARBONERO et al., 2011 | Canadá | GOUGH & JAMES, 1975 |
| | Uruguai | GUARINO et al., 2008 | Argentina | DIAS, 1982 |
| | Peru | STAHL et al., 2002 | Argentina | CARRILLO et al., 1983a |
| | Brasil | OKUDA et al., 2006 | Argentina | CARRILLO et al., 1983b |
| | Brasil | CERQUEIRA et al., 2000 | Argentina | SCHUDEL et al., 1986 |
| | Brasil | TOMICH et al., 2009 | Argentina | PÉREZ et al., 2003 |
| | Brasil | VIEIRA et al., 2003 | Uruguai | GUARINO et al., 2008 |
| | Brasil | BARBOSA et al., 2005 | Brasil | RIET-CORREA et al., 1983 |
| | Brasil | SILVA, 2011 | Brasil | MÉNDEZ et al., 1987 |
| | Brasil | GRÉGIO et al., 2000 | Brasil | RIET-CORREA et al., 1989 |
| | Brasil | ROCHA et al., 2001 | Brasil | WEIBLEN et al., 1989 |
| | Brasil | MÉDICI et al., 2000a | Brasil | SCHILD et al., 1994 |
| | Brasil | DIAS et al., 2013 | Brasil | SALVADOR et al., 1998 |
| | Brasil | HOLZ et al., 2009 | Brasil | COLODEL et al., 2002 |
| | | | Brasil | ELIAS et al., 2004 |
| | | | Brasil | DE PAULA et al., 2005 |
| | | | Brasil | RIET-CORREA et al., 2006 |
| | | Brasil | RISSI et al., 2006 | |
| | | Brasil | VASCONCELOS et al., 1993 | |
| | | Brasil | SCHILD et al., 1994 | |
| | | Brasil | ROEHE et al., 1997 | |
| Europa | Lithuania | JACEVIČIUS et al., 2010 | Hungria | BARTHA et al., 1969 |
| Ásia | China | YAN et al., 2008 | Índia | MEHROTRA et al., 1976 |
| | Irã | BADIEI et al., 2010 | Índia | SURESH et al., 1999 |
| | Irã | SHIRVANI et al., 2012 | Índia | CHINCHKAR et al., 2002 |
| | Índia | NANDI et al., 2010 | Índia | SHARMA et al., 2004 |
| | | | Índia | KIRAN et al., 2005 |
| | | Índia | JAIN et al., 2006 | |
| Oceania | | | Austrália | GARDINER et al., 1964 |
| | | | Austrália | JOHNSTON et al., 1962 |
| | | | Austrália | FRENCH, 1962 |

Em várias situações, bubalinos são criados próximos a bovinos. Essa questão pode definir o sucesso ou falha de programas de controle ou erradicação do BoHV-1, já que somente os bovinos são inclusos nesses processos. Mundialmente, as informações sobre a sanidade dos rebanhos bubalinos ainda são escassas, contudo, a bubalinocultura vem expandindo consideravelmente, tornando-se de interesse investigar também a soroprevalência de BoHV-1 nesses animais (Tabela 2).

Tabela 2 - Soroprevalência de BoHV-1 em bubalinos.

| Continentes | País | Casos estudados | Teste aplicado | Prevalência % | Referências |
|-------------|-----------|-----------------|----------------|---------------|---------------------------|
| Ásia | Índia | 80 | SN | 31,3 | NANDI et al., 2010 |
| | Índia | - | ELISA | 6,5 | PHARANDE et al., 2004 |
| | Índia | - | ELISA | 52,5 | RENUKARADHYA et al., 1996 |
| | Índia | - | - | 21,1 | COSTA, 2002 |
| | Paquistão | 36 | SN | 16,7 | AKHTAR & ASIF, 1996 |
| América | Brasil | 133 | SN | 52,6 | CORTEZ et al., 2001 |
| | Brasil | - | - | 62,9 | MOLNÁR et al., 2001 |
| | Brasil | - | ELISA | 59,0 | MUNCHOW & PISARZ, 1994 |
| | Itália | 465 | ELISA | 25,0 | RONCORONI et al., 2007 |
| Europa | Itália | 1756 | ELISA | 30,5 | SCICLUNA et al., 2007 |
| | Itália | 72 | ELISA | 32,0 | DE CARLO et al., 2004 |
| | Itália | 36 | ELISA | 86,0 | AMOROSO et al., 2013 |
| | Itália | 1021 | SN | 51,1 | CAVIRANI et al., 1997 |
| | Itália | - | - | 59,0 | FAGIOLO et al., 2001 |
| | Itália | - | - | 30,0 a 80,0 | FAGIOLO & RONCORONI, 2003 |
| | Itália | - | - | 66,1 | GALIERO, 1998 |

(-) : Não informado

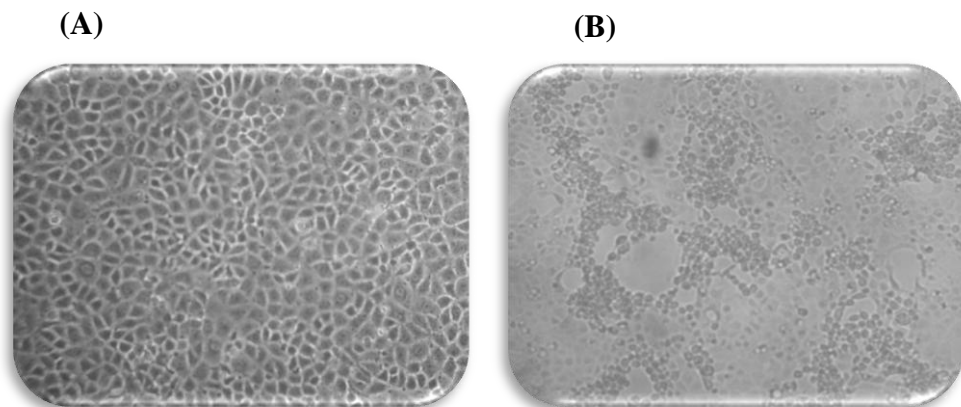
A soropositividade de búfalos em relação ao BuHV-1 tem sido pouco relatada (SCICLUNA et al., 2007). Os testes sorológicos não são capazes de diferenciar as respostas induzidas pelos herpesvírus. Como alguns estudos foram realizados frente ao BoHV-1 em búfalos, não se pode descartar a possibilidade de que essa soropositividade encontrada nesses animais possa estar relacionada ao BuHV-1. A reatividade cruzada entre os herpesvírus bovino é evidente, já com relação ao BuHV-1 apenas pode-se dizer que provavelmente isso também ocorra. É de interesse a investigação sobre possíveis testes de diferenciação para que esse dado possa ser enriquecido, colaborando também para que as técnicas sorológicas clássicas tornem-se mais específicas.

2.2.7 Diagnóstico Viroológico

2.2.7.1 Isolamento viral

O isolamento viral em cultivos celulares é um método tradicional de diagnóstico de infecções por herpesvírus bovinos (HALFEN & VIDOR, 1998). Os cultivos primários são mais sensíveis para o isolamento, entretanto, em razão de uma maior praticidade, utiliza-se com mais frequência células de linhagens de origem bovina, como as células Madin Darby Bovine Kidney (MDBK) (Figura 4) (FRANCO et al., 2012).

Figura 4 – Cultivo de células MDBK com e sem efeito citopático.



(A) Cultivo de células MDBK livre de infecção viral; (B) Efeito citopático causado pelo BoHV-1 em células MDBK.

O material a ser submetido ao isolamento viral pode incluir secreções nasais, oculares e vaginais, lavados prepuciais, tecidos lesados, tonsilas, linfonodos, fetos abortados e fragmentos de órgãos fetais como fígado, encéfalo, baço, rins e pulmão (HOMAN & EASTERDAY, 1980). Sêmen fresco ou devidamente preservado também pode ser utilizado para o isolamento viral (SNOWDON, 1965; DEKA et al., 2005).

A inoculação nos cultivos celulares é realizada após preparação destas secreções e tecidos (HOMAN & EASTERDAY, 1980). Usualmente, entre 24 e 72 horas após a inoculação, a presença do vírus pode ser observada em microscópio óptico invertido através do efeito citopático (ECP) característico dos herpesvírus (Figura 4 B) (MADIN et al., 1956; STRAUB, 1990; TURIN & RUSSO, 2003). Para a confirmação da identidade do agente, podem ser aplicadas as técnicas de imunofluorescência (IF) ou imunoperoxidase (IPX), utilizando-se conjugados ou anticorpos monoclonais apropriados (PASTORET & THIRY, 1985; WEIBLEN et al., 1992; ROEHE et al.,

1997; SOUZA et al., 2002; FRANCO et al., 2012). Não havendo ocorrência de ECP na primeira passagem, são realizadas até três passagens. Se ao final da terceira passagem não há evidência de ECP (Figura 4 A), o material é considerado negativo para o vírus (FRANCO et al., 2012).

2.2.8 Diagnóstico sorológico

2.2.8.1 Soroneutralização (SN)

O teste de soroneutralização (SN) é uma técnica amplamente utilizada, considerada padrão para a detecção de anticorpos específicos para BoHV (BITSCH, 1978; DEL FAVA et al., 1998; ROCHA et al., 2001; VIEIRA et al., 2003). No entanto, ela não é capaz de diferenciar os anticorpos induzidos pelo BoHV-1 daqueles induzidos pelo BoHV-5 (ROEHE et al., 1997). Em relação ao BuHV-1, não existem testes de reatividade cruzada com os herpesvírus bovinos. A SN também não permite a diferenciação entre animais infectados e animais vacinados.

A prova é baseada na avaliação da neutralização de uma concentração predeterminada de doses infectantes de vírus frente ao soro do animal suspeito (HOUSE & BAKER, 1971). Caso o soro contenha anticorpos neutralizantes, o vírus é neutralizado, não podendo assim infectar as células em cultivo (TEIXEIRA et al., 1998). O período de incubação adotado como padrão para a execução do teste pode variar de 1 a 24 horas (OIE, 2010). Essa variação no tempo de incubação exibe efeito significativo na sensibilidade do teste (capacidade de detectar o maior número de soros positivos em determinada amostragem). Um período de incubação de 24 horas pode aumentar em 16 vezes a detecção de anticorpos (OIE, 2010). Além disso, a escolha da amostra a ser utilizada como vírus de desafio também pode influenciar nos resultados. Portanto, apesar da ocorrência de reações sorológicas cruzadas em níveis variáveis, existirá uma variação na sensibilidade do teste dependendo da amostra de desafio utilizada (HOLZ et al., 2010; VARELA et al., 2010). O teste de SN, mesmo considerado padrão, apresenta algumas desvantagens como o tempo necessário para sua execução (resultado em 3 a 5 dias) e a produção e manutenção de cultivos celulares e de estoques de vírus (KRAMPS et al., 2004).

2.2.8.2 Ensaio imunoenzimático (ELISA)

Ensaio imunoenzimáticos do tipo “ELISA” (do inglês “enzyme linked immunosorbent assay”) são testes sensíveis, específicos, de relativa facilidade e rapidez de execução (NANDI et al., 2004). No comércio mundial uma variedade de testes de ELISA (indireto, direto, de competição) foram desenvolvidos para a triagem de amostras de soros bovinos (KRAMPS et al., 1994; GRAHAM et al., 1997; NANDI et al., 2004; 2007). No Brasil, o uso de testes comerciais é difícil devido ao custo e aquisição dos mesmos. Em função disso, alguns laboratórios produzem seus próprios testes de ELISA, denominados de “in house” (TEIXEIRA et. al., 2001; SPILKI et. al., 2005).

Assim como o teste de SN, o ELISA não é capaz de diferenciar o tipo de herpesvírus ao qual o animal foi exposto (MEYER et al., 2001; TEIXEIRA et al., 2001). Diferenças na antigenicidade da *gE* entre BoHV-1 e BoHV-5 já foram demonstradas *in vitro* (KAASHOEK et al., 1995) e testadas através do teste de ELISA (WELLENBERG, et al., 2001) que oportunizou a diferenciação sorológica das infecções entre o BoHV-1 e o BoHV-5. No entanto, esse estudo foi realizado com apenas seis animais e inoculados com um isolado (N569). Assim, é necessário analisar um maior número de animais, com diferentes cepas para evidenciar a eficácia do teste para a diferenciação entre os herpesvírus.

Em bovinos, o teste considerado mais sensível é o ELISA gB. A glicoproteína B (gB) é essencial para a infectividade do vírus e está presente em todos os isolados de BoHV-1. Além disso, o epitopo reconhecido na gB é conservado na maioria, senão em todas, amostras de campo do BoHV-1 (SPEAR, 1993; KRAMPS et al., 1994). No entanto, esses testes nunca foram aplicados em amostras de soro de animais infectados com BoHV-5. Para a detecção de BoHV-1 em búfalos, o ELISA indireto empregando conjugado anti-IgG bovina tem sido utilizado (RENUKARADHYA et al., 1996; SURESH et al., 1999; MOLNÁR et al., 2001; CORTEZ et al., 2001). Até o presente, não há um teste específico para detecção de BuHV-1.

2.2.9 Diagnóstico molecular

2.2.9.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Ensaio do tipo PCR foram desenvolvidos em vários países para a detecção de microrganismos, devido à sua especificidade, sensibilidade e a rapidez dos resultados que podem ser obtidos em poucas horas (BELÁK & BALLAGI-PORDÁNY, 1993). Além disso, ela pode ser aplicada em qualquer material clínico que, potencialmente, contenha o agente ou o seu ácido nucleico, oriundas de diferentes fontes (amostras clínicas, soro, sêmen, líquido folicular, isolados virais) (VAN ENGELENBURG et al., 1994; SANTURDE et al., 1996; FUCHS et al., 1999; MOORE et al., 2000; CLAUS et al., 2005; DEKA et al., 2005; GROM et al., 2006; CAMPOS et al., 2009).

O objetivo da técnica se resume na síntese *in vitro* de uma grande quantidade de cópias de um segmento alvo no DNA (FRANCO et al., 2012). Esta metodologia permite a detecção e identificação de quantidades mínimas do material genético do agente suspeito, sendo capaz de detectar a presença do genoma, independente da presença de vírus infeccioso (DEBIASI & TYLER, 2004; FRANCO et al., 2012).

A PCR pode ser adaptada para detectar vários subtipos do mesmo vírus ou vírus diferentes em uma mesma reação, utilizando oligonucleotídeos projetados especificamente para o (s) agente (s) de interesse (PCR multiplex) (ALEGRE et al., 2001; CLAUS et al., 2005; THIRY et al., 2007). Ela também pode ser padronizada para aumentar a sensibilidade e especificidade, utilizando primeiramente, em uma reação, oligonucleotídeos iniciadores (chamados “*primers* externos”) específicos de uma região de interesse do genoma. Logo, em uma segunda etapa, o produto da primeira reação de PCR será utilizado como amostra para a segunda reação. Nesta fase, outro par de iniciadores (chamados “*primers* internos”) será utilizado, a fim de amplificar uma região menor do produto da primeira reação, aumentando assim a sensibilidade e especificidade da técnica (*nested* PCR) (ASHBAUGH et al., 1997; ROCHA et al., 1998; TAKIUCHI et al., 2003; 2005).

Outra variação da técnica de PCR é o PCR em tempo real ou PCR quantitativa (qPCR) que tem se tornado uma ferramenta muito utilizada na detecção de DNA e cDNA (TEMPESTA et al., 2005; WANG et al., 2007; HOFFMANN et al., 2009; SCICLUNA et al., 2010; RANA et al., 2011). Ensaio desse tipo foram desenvolvidos para que as etapas de amplificação pudessem ser monitoradas à medida que vão ocorrendo, pela utilização de sondas marcadas com substâncias indicadoras que são

liberadas a cada ciclo de amplificação (FRANCO et al., 2012). A detecção de sequências alvo ocorre através do monitoramento da fluorescência emitida por corantes intercalantes, “*primers*” marcados com fluoróforos ou sondas específicas (BUSTIN, 2000; 2005). A qPCR permite a quantificação de ácidos nucleicos presentes na amostra, sendo que seu uso pode aumentar a especificidade em relação à PCR convencional, com reduzido risco de contaminação. Além de abreviar o tempo da reação, não é necessário analisar os produtos por eletroforese em géis de agarose, tornando esse tipo de ferramenta essencial para testes de diagnóstico que necessitam de urgência de resultados (NAZARENKO et al., 1997; SCHWEIGER et al., 2000; BLACK et al., 2002; FRANCO et al., 2012).

2.2.9.2 Análise genômica com restrição enzimática (REA)

A análise de isolados virais através do uso de enzimas de restrição (REA) é utilizada para identificação e diferenciação entre amostras de vírus (BRAKE & STUDDERT, 1985; BULACH & STUDDERT, 1990; RIMSTAD et al., 1992; BUONAVOGLIA et al., 1996; WILLIAMS et al., 1997). A REA é dependente de isolamento ou multiplicação do vírus em cultivo celular, para posterior extração e clivagem do DNA viral total com enzima (s) de restrição. A análise dos produtos obtidos é realizada através da observação do perfil de restrição do DNA clivado, em gel de agarose (METZLER et al., 1985; ENGELS et al., 1986; BULACH & STUDDERT, 1990; PIDONE et al., 1999; D’ARCE et al., 2002).

2.2.10 Controle e prevenção

Diante da inexistência de tratamento para o BoHV-1 e o BoHV-5, as medidas de controle são fundamentais para impedir o avanço dessas infecções nos rebanhos. Dependendo da situação epidemiológica e do histórico clínico do rebanho, medidas de biossegurança podem ser adotadas, como a testagem sorológica periódica, o descarte de eventuais positivos e principalmente, o teste em reprodutores a serem anexados aos rebanhos (FRANCO et al., 2012). Em países ou regiões com elevada prevalência de infecções por BoHV-1, políticas de controle sem vacinação podem tornar-se inviáveis. No entanto, as vacinas disponíveis no comércio são dirigidas a minimizar o desenvolvimento de sinais clínicos e diminuir a disseminação do vírus infeccioso, mas a imunização não impede o estabelecimento de latência e não elimina o vírus já instalado (ACKERMANN et al., 1990; OSÓRIO, 1998). Devido à estreita relação genética e

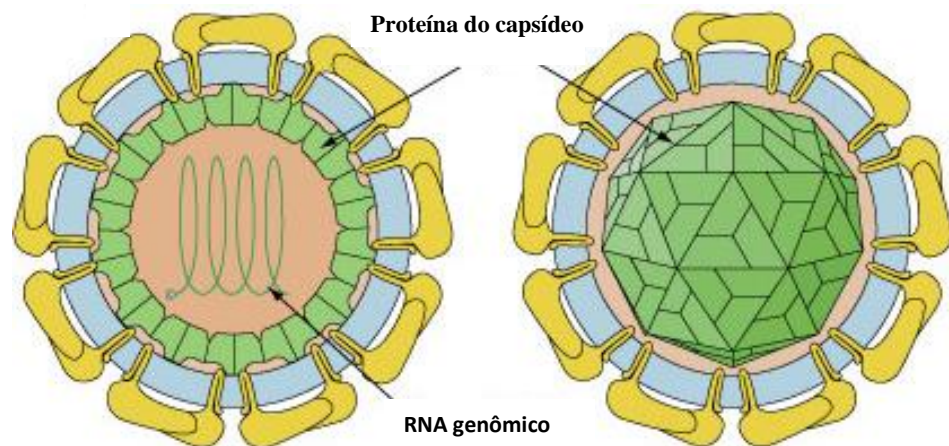
antigênica entre o BoHV-1 e BoHV-5, a vacinação contra BoHV-1 pode induzir proteção contra BoHV-5 (STRAUB, 1991; FENNER et al., 1993; WIEDMANN et al., 1993; LEMAIRE et al., 1994; CASCIO et al., 1999). O nível de proteção cruzada fornecido por vacinas anti-BoHV-1 frente a infecções pelo BoHV-5 pode não ser suficiente para induzir proteção clínica satisfatória (SILVA et al., 2006). Na América do Norte, a vacinação de IBR é amplamente utilizada e casos esporádicos de BoHV-5 só foram relatados em bezerros não ou mal imunizados contra o BoHV-1 (D'OFFAY et al., 1993).

2.3 Pestivírus

2.3.1 Estrutura dos vírions

Os pestivírus possuem vírions esféricos, medindo entre 40 a 60 nm de diâmetro. O nucleocapsídeo possui simetria icosaédrica e é revestido por um envelope lipoproteico derivado das membranas da célula hospedeira (COLLETT et al., 1989; DONIS, 1995; THIEL et al., 1996; LINDENBACH & RICE, 2001) (Figura 5).

Figura 5 – Representação esquemática da estrutura viral de um pestivírus.

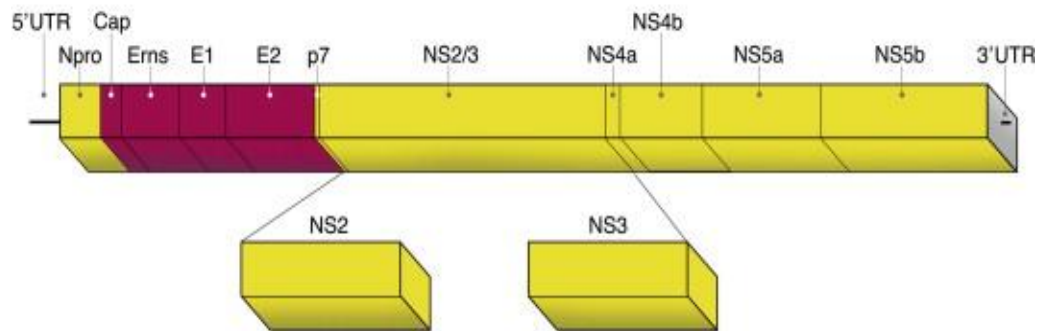


Adaptado de Viralzone Swiss Institute of Bioinformatics, 2010.

O genoma viral é constituído de uma fita simples linear de RNA, de polaridade positiva, com aproximadamente 12,5 Kb, que apresenta duas regiões não traduzidas (“untranslated regions”, UTR) nas extremidades 5’ e 3’ e uma fase de leitura aberta (“open reading frame”, ORF). A ORF codifica uma poliproteína de cerca de 4000 aminoácidos (LACKNER et al., 2004; LINDENBACH et al., 2007). Essa poliproteína sofre clivagem e origina quatro proteínas estruturais (na extremidade N terminal) e oito

não-estruturais (na extremidade C terminal) (GOENS, 2002). As proteínas estruturais (C, E^{ns}, E1 e E2) exercem funções importantes no revestimento do RNA viral e permitem a entrada e a saída das partículas virais das células infectadas. As proteínas não-estruturais (N^{PRO}, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B) estão envolvidas no processo de replicação viral (THIEL et al., 1996; WEILAND et al., 1999; LINDENBACH et al., 2007; KREY et al., 2012) (Figura 6).

Figura 6 – Representação esquemática da organização genômica do gênero Pestivírus.



As proteínas virais são codificadas por uma única ORF. As proteínas estruturais são mostradas em vermelho e as não-estruturais em amarelo. As proteínas E^{ns}, E1 e E2 são as glicoproteínas do envelope. A proteína NS2/3 é clivada para formar as proteínas NS2 e NS3 nos vírus CP e nas amostras NCP ela permanece inalterada. As regiões 5'e 3' UTR são essenciais para a iniciação da replicação e tradução do RNA. **Fonte:** NEILL, 2013.

2.3.2 Replicação

A replicação do genoma e a produção da progênie viral ocorrem inteiramente no citoplasma da célula hospedeira. A penetração dos vírions nas células ocorre por endocitose, após a interação entre proteína(s) do envelope viral e receptores da membrana plasmática (DUBOVI, 2011). Após a penetração, o genoma é liberado no citoplasma e o RNA genômico de polaridade positiva é traduzido em toda a sua extensão. A replicação do genoma envolve a síntese de uma molécula de RNA de sentido antígenômico (polaridade negativa) que serve de molde para a síntese do RNA. Uma poliproteína é gerada e clivada em proteínas individuais por proteases celulares e virais. A clivagem origina as proteínas estruturais e não-estruturais (Figura 6). As partículas recém-formadas permanecem em vacúolos no citoplasma até sua liberação, que ocorre através da fusão dessas vesículas com a membrana plasmática. As consequências da replicação viral para a célula hospedeira variam desde infecções

inaparentes até lise e destruição celular (LINDENBACH & RICE, 2001; RIDPATH et al., 2012).

2.3.3 Vírus da diarreia viral bovina (BVDV)

O BVDV abrange duas espécies virais distintas, BVDV-1 e BVDV-2, anteriormente classificadas como genótipos (RIDPATH et al., 1994). Novas análises filogenéticas do genoma viral suportam que os pestivírus bovinos anteriormente classificados como “atípicos” (SCHIRRMEIER et al., 2004; STALDER et al., 2005) sejam reclassificados como uma nova espécie denominada BVDV-3 (LIU et al., 2009). Os vírus BVDV-1 representam a maioria dos vírus vacinais e das cepas de referência, enquanto os vírus BVDV-2 foram identificados há quase duas décadas em surtos de doença aguda e doença hemorrágica na América do Norte (PELLERIN et al., 1994).

A análise molecular da região 5' UTR do genoma viral possibilitou a classificação dessas cepas virais (HAMERS et al., 2001). Esta região é geralmente utilizada para a diferenciação de genótipos entre os pestivírus, enquanto a região 3' UTR é altamente variável (RIDPATH et al., 1994; MAHONY et al., 2005). Logo após a caracterização do BVDV-2, estudos demonstraram significantes diferenças antigênicas entre cepas do BVDV-1 e o BVDV-2. Isso foi possível através de ensaios de reatividade cruzada, de técnicas sorológicas (RIDPATH et al., 2000), das diferenças na ligação entre as cepas virais, dos painéis de anticorpos monoclonais (RIDPATH et al., 1994; RIDPATH et al., 2000), além da significativa ineficácia da proteção fetal contra cepas de BVDV-2 em animais vacinados com BVDV-1 (RIDPATH et al., 1994; BROCK & CORTESE, 2001). Além disso, a análise filogenética revelou grupos de subgenótipos nas espécies BVDV-1 (BVDV-1a, BVDV-1b, BVDV-1c, BVDV-1d, BVDV-1e, BVDV-1f, BVDV-1g, BVDV-1h, BVDV-1i, BVDV-1j, BVDV-1k, BVDV-1l) (VILCEK et al., 2001) e BVDV-2 (BVDV-2a e BVDV-2b) (FLORES et al., 2002). A divisão em subgenótipos ainda é motivo de discussões e não está oficialmente reconhecida pelo ICTV.

De acordo com a capacidade de produzir citopatologia em cultivos celulares, os isolados de BVDV podem ser classificados em biotipos citopáticos (CP) e não-citopáticos (NCP) (TREMBLAY, 1996; MEYERS & THIEL, 1996). *In vitro*, o BVDV é capaz de replicar em uma variedade de células de várias espécies, inclusive de origem humana (RIDPATH et al., 2012). A maioria dos vírus de campo são NCP; amostras CP

são isoladas quase que exclusivamente de animais acometidos da doença das mucosas (DM), uma forma clínica grave da infecção.

2.3.3.1 Manifestações clínicas

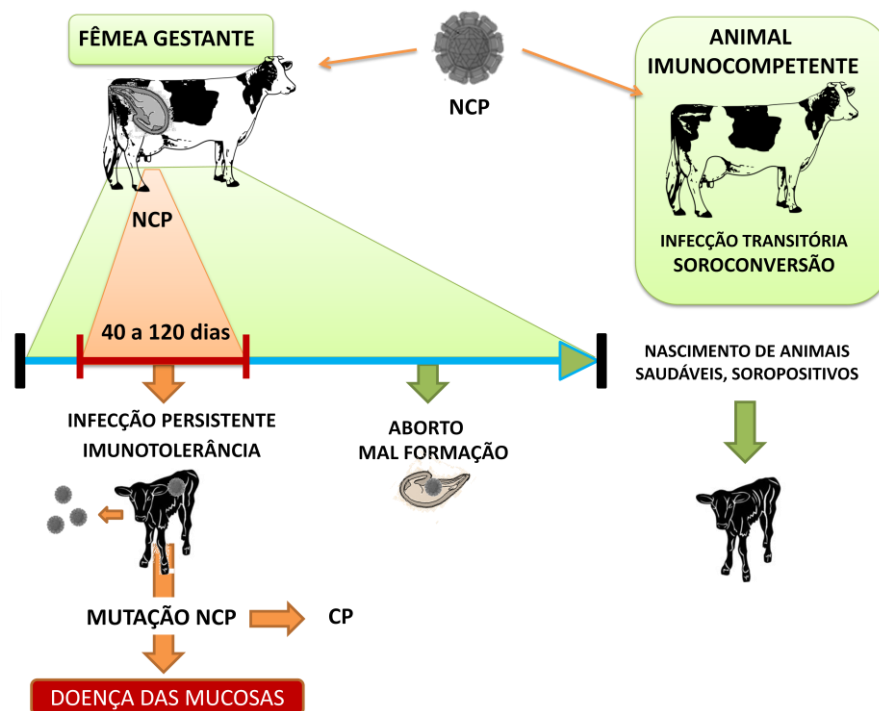
A infecção pelo BVDV tem sido associada a uma ampla variedade de manifestações clínicas: desde infecções inaparentes ou com sinais leves até doença aguda fatal (THIEL et al., 1996; LINDBERG, 2003). As consequências e a gravidade da infecção aguda pelo BVDV dependem de uma série de fatores que incluem a cepa viral (e o biótipo), o *status* imunológico do animal, o *status* reprodutivo e a ocorrência de infecções secundárias (BIELEFELDT-OHMANN et al., 2008; RIDPATH et al., 2012). A severidade clínica da infecção aguda pós-natal em animais imunocompetentes e soronegativos é variável, sendo a maioria assintomática. Viremia breve e imunossupressão transitória podem ser observadas, predispondo o hospedeiro a infecções por outros patógenos (BROWNLIE, 1991; LINDBERG & HOUE, 2005). A imunossupressão é mediada pela supressão das funções do sistema imune devido ao linfotropismo do BVDV que resulta na depleção dos linfócitos e tecidos linfóides (BRODERSEN & KELLING, 1998; WALZ et al., 1999). Alguns isolados de maior virulência podem provocar um período febril curto, acompanhado por hiperemia, descarga nasal, tosse e diarreia (EVERMANN & BARRINGTON, 2005; RIDPATH et al., 2012). Problemas reprodutivos (decréscimo na taxa de concepção, mortalidade embrionária ou fetal, aborto, reabsorção embrionária, mumificação, malformações fetais e o nascimento de bezerras fracas e inviáveis) e patologias cutâneas estão entre as consequências mais frequentes da infecção pelo BVDV (BROWNLIE, 1990; DUBOVI, 1994; MCGOWAN et al., 1995; FRAY et al., 2000; BROCK, 2004; GROOMS, 2004; SOLIS-CALDERON et al., 2005).

Quanto à soroconversão, o BVDV induz uma resposta humoral prolongada e protetora. Por esse motivo a infecção transitória causada pelo BVDV pode ser auto-limitante em rebanhos, desde que esses não possuam fêmeas não imunes, prenhes. Por outro lado, se existirem vírus e fêmeas prenhes suscetíveis, a infecção persistente (PI) pode se estabelecer (LINDBERG & HOUE, 2005) (Figura 7). A infecção fetal pelo biótipo NCP entre 40 e 120 dias de gestação (antes do desenvolvimento da competência imunológica) resulta no nascimento de animal PI, com indução de imunotolerância (MOENNIG & LIESS 1995; FRAY et al., 2000; COLLEN & MORRISON 2000). Esses animais não apresentam anticorpos no soro, já que não são capazes de responder

imunologicamente contra o vírus infectante e também contra amostras de BVDV antigenicamente muito semelhantes. Assim, os animais PI replicam e excretam o vírus durante toda a vida, constituindo-se no principal reservatório do vírus (HOUE, 1995). O sistema imune fetal responde com eficiência quando a infecção pelo BVDV ocorre no último trimestre da gestação (SMIRNOVA et al., 2008; SHOEMAKER et al., 2009; HANSEN et al., 2010). A infecção transplacentária durante esse período não está associada a níveis significativos de defeitos congênitos, resultando no nascimento de animais clinicamente normais com elevados níveis de anticorpos pré-colostral. Isso é indicativo de que a infecção ocorreu no final da gestação, depois do desenvolvimento da imunocompetência fetal (MOENNIG & LIESS 1995; FRAY et al., 2000).

A doença das mucosas, caracterizada por baixa morbidade e letalidade próxima a 100%, é desencadeada quando um animal PI (portador do biótipo NCP) é superinfectado com um biótipo CP antigenicamente semelhante. Geralmente o biótipo CP se origina de mutações, deleções ou rearranjos genéticos do biótipo NCP do próprio animal PI. Outras fontes de vírus CP são as vacinas vivas modificadas e a transmissão a partir de outros animais PI (RIDPATH et al., 2012).

Figura 7 - Consequências da infecção de fêmeas bovinas prenhes pelo BVDV.



Adaptado de Peterhans et al., 2010.

2.3.4 Epidemiologia

A principal via de transmissão do BVDV ocorre por contato direto de animais suscetíveis com animais infectados (RUSH et al., 2001). O vírus também pode ser transmitido indiretamente por insetos hematófagos, fômites, embriões, soro fetal bovino e sêmen (TARRY et al., 1991; NISKANEN & LINDBERG, 2003; WRATHALL et al., 2006; STHAL et al., 2007), além da forma vertical de transmissão, da fêmea infectada para o embrião/feto em desenvolvimento (RUSH et al., 2001). Animais PI eliminam constantemente o BVDV por todas as secreções e excreções, favorecendo a disseminação da infecção nos rebanhos (BRUSCHKE et al., 1998; ARENARTH et al., 2009).

O agente etiológico da BVD apresenta distribuição mundial e já foi identificado na maioria dos países onde há criação de bovinos. A prevalência da enfermidade, em algumas áreas, atinge cerca de 50 a 90 % do rebanho. Em países livres da febre aftosa, o BVDV é considerado o agente viral mais importante de bovinos e tem sido alvo de numerosos estudos e programas de controle e/ou erradicação (FLORES et al., 2005, CANÁRIO et al., 2009). As infecções por BVDV são endêmicas nas populações de bovinos. Conforme sugerido por Lazzari e colaboradores (2008), a prevalência média mundial de anticorpos em animais adultos seja em torno de 60 % (Tabela 3), já a porcentagem de animais persistentemente infectados foi estimada entre 1 e 2 % do rebanho global de bovinos (HOUE, 2003).

Na Argentina, a prevalência de animais soropositivos chega a cerca de 70 % (LÉRTORA, 2003; GOGORZA et al., 2005). Alguns países europeus como a Dinamarca, Suécia, Finlândia, Noruega e Áustria conseguiram erradicar a BVD sem vacinação, entretanto, apenas a Islândia é considerada livre da doença (OIE, 2009).

A infecção pelo BVDV em bovinos tem sido descrita no Brasil desde o final dos anos 1960. Vários relatos clínico-patológicos, virológicos e sorológicos demonstram a ampla distribuição da infecção no rebanho bovino brasileiro (Tabela 3) (RIDPATH et al., 2012).

Tabela 3 – Dados referentes à ocorrência de BVDV em bovinos.

| País | Estado | Casos estudados | Teste aplicado | Prevalência (%) | Referências |
|----------------|------------------------|-----------------|----------------|-----------------|------------------------|
| Canadá | - | 56 | SN | 64,3 | AHMAD et al., 2011 |
| Irã | - | 642 | ELISA | 49,2 | SHIRVANI et al., 2012 |
| Bélgica | - | 5246 | ELISA | 32,9 | SARRAZIN et al., 2013 |
| | Bahia | 220 | SN | 56,0 | NORONHA et al., 2001 |
| | Goiás | 3533 | SN | 64,0 | BRITO et al., 2010 |
| | Maranhão | 400 | ELISA | 61,5 | CHAVES et al., 2010 |
| | Paraíba | 2343 | SN | 22,2 | THOMPSON et al., 2006 |
| Brasil | São Paulo/Minas Gerais | 260 | SN | 39,2 | DIAS et al., 2011 |
| | São Paulo | 219 | SN | 46,1 | OLIVEIRA et al., 2012 |
| | Paraná | 937 | SN | 73,5 | MÉDICE et al., 2000b |
| | RS | 1734 | SN | 66,3 | QUINCOZES et al., 2007 |
| | RS | 204 | SN | 67,9 | POLETTO et al., 2004 |

Nos últimos anos, com o desenvolvimento da bubalinocultura, tornou-se interessante investigar também a sanidade desses animais, principalmente em relação aos microrganismos que causam prejuízo à bovinocultura e que poderiam eventualmente afetar essas espécies, como o BVDV (Tabela 4).

Tabela 4 - Ocorrência de BVDV em bubalinos.

| Continente | País | Casos estudados | Teste aplicado | Prevalência (%) | Referência |
|------------|-----------|-----------------|----------------|-----------------|--------------------------|
| | Brasil | - | - | 52,7 | LAGE et al., 1996 |
| América | Brasil | 425 | SN | 16,2 | PITUCO et al., 1997 |
| | Brasil | - | - | 12,9 | MARTINS et al., 2012 |
| Europa | Itália | 465 | ELISA | 22,0 | RONCORONI et al., 2007 |
| Ásia | Índia | 47 | - | 65,9 | SUDHARSHANA et al., 1999 |
| | Paquistão | 36 | SN | 30,6 | AKHTAR & ASIF, 1996 |
| | Turquia | 82 | ELISA | 68,3 | ALBAYRAK et al., 2012 |
| África | Egito | 62* | SN | 52,0 | ZAGHAWA, 1998 |

*62 casos estudados entre bovinos, bubalinos, ovinos, caprinos, e camelídeos, não especificando a prevalência de cada espécie separadamente.

(-) Não mencionado

2.3.5 Diagnóstico virológico

2.3.5.1 *Isolamento Viral*

O teste padrão de diagnóstico para o BVDV, que também é tradicionalmente empregado em programas de controle e erradicação, é o isolamento do agente em cultivos celulares. O isolamento do vírus permite que se disponha do agente para a caracterização, principalmente nos aspectos antigênicos e genotípicos, que são de especial interesse epidemiológico (FLORES et al., 2005). No entanto, muitos fatores afetam a capacidade de isolar o vírus de uma amostra clínica. Primeiramente, deve-se conhecer a sensibilidade do sistema celular utilizado para o crescimento do vírus. O tempo de coleta da amostra, o transporte, o processamento da amostra no laboratório e o conhecimento da patogênese da doença infecciosa são fatores essenciais para maximizar as chances de um isolamento bem sucedido (DUBOVI, 2013). Outros cuidados são essenciais, como a certificação de que as células utilizadas no experimento não foram previamente contaminadas com BVDV e assegurar a ausência de anticorpos específicos no suplemento utilizado para manter as células em cultivo (BOLIN & RIDPATH, 1998). No diagnóstico dos biótipos NCP, é necessário o uso de técnicas indiretas como a imunofluorescência e a imunoperoxidase (HOUE et al., 1995).

2.3.6 Diagnóstico sorológico

As técnicas sorológicas mais empregadas no diagnóstico de rotina são a soroneutralização (SN) e o ensaio imunoenzimático (ELISA) (SANDVIK, 2005). O método de ELISA apresenta como principal vantagem a redução no período de tempo necessário para a identificação de animais PI, a alta sensibilidade e especificidade. Quando aplicado em amostras individuais pode inviabilizar o seu uso em situações em que muitos animais de um rebanho devem ser avaliados (TIJSSEN, 1985; SANDVIK & KROGSRUD, 1995; BRINKHOF et al., 1996; SCHRIJVER & KRAMPS, 1998; ROSSMANITH et al., 2001). Muitas vezes há necessidade de avaliar a exposição de outras espécies ao BVDV, já que ele não é espécie-específico. Assim a SN se torna amplamente aplicável, reduzindo custos, considerando que muitos testes de ELISA vinculam-se a espécies reagentes específicas. A detecção de BVDV em bezerros por técnicas sorológicas é dificultada pela presença de anticorpos passivos que podem neutralizar o vírus por até três meses (PALFI et al., 1993; BROCK et al., 1998). Em bezerros não PI, os anticorpos passivos podem ser detectados até cerca de oito meses de

idade (GRAHAM et al., 2003). O indicado nesses casos são os testes de imunohistoquímica e PCR.

2.3.6 Diagnóstico molecular

Os métodos de diagnóstico baseados na detecção de genomas apresentam elevadas taxas de sensibilidade e especificidade. Devido a estas características, a reação em cadeia da polimerase, precedida de uma etapa de transcrição reversa (RT-PCR), tem sido muito utilizada para o diagnóstico das várias formas de manifestações clínicas da infecção pelo BVDV. Ensaios de RT-PCR podem ser realizados a partir de qualquer amostra, individuais ou em *pools* (ROSSMANITH et al., 2001; WEINSTOCK et al., 2001; PILZ et al., 2005; MISHRA et al., 2007; CRAIG et al., 2008, MARTUCCIELLO et al., 2009). O fator limitante é a qualidade da extração do material genético da amostra (DUBOVI, 2013).

2.3.8 Controle e prevenção

O conhecimento da grande variedade de formas clínicas das doenças associadas ao BVDV e a diversidade genética e antigênica são importantes para o monitoramento epidemiológico e para decidir formas estratégicas de controle (HAMERS et al., 2001). O sucesso de programas de controle e erradicação do BVDV depende da identificação e eliminação dos animais PI. A identificação pode ser realizada através da combinação de diferentes técnicas, como ELISA e imunohistoquímica. As técnicas moleculares, mais sensíveis que as técnicas convencionais, tem aprimorado o diagnóstico dessa virose (HOUE et al., 2006).

A vacinação é indicada para rebanhos com alta rotatividade de animais, rebanhos com sorologia positiva, com histórico de doença clínica ou reprodutiva, e com confirmação virológica de BVDV (BROCK et al., 1995; LINDBERG & ALENIUS, 1999; RIDPATH et al., 2012). A vacina contra BVDV está disponível desde a década de 1960 e em geral é eficaz (DEREGT, 2005). No entanto ela deve ser administrada em conjunto com outras medidas de biossegurança (LINDBERG & HOUE, 2005; HOUE et al., 2006). De maneira individual, a vacinação não impede todas as infecções, mas aumenta a imunidade individual e se torna eficaz em nível de rebanho (RIDAPATH, 2013). Com isso, a vacina previne a doença clínica após a exposição ao BVDV e impede a infecção fetal que leva à infecção persistente (BOLIN & RIDPATH, 1995; GROOMS et al., 2007).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- ✓ Contribuir para o conhecimento da biologia dos herpesvírus e pestivírus em bubalinos.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Evidenciar a circulação de herpesvírus e pestivírus em bubalinos;
- ✓ Avaliar se testes sorológicos baseados na neutralização viral são capazes de identificar o agente causador da infecção em bubalinos;
- ✓ Pesquisar a presença de genomas de BVDV em amostras de soro de bubalinos.

CAPÍTULO 1

Anticorpos neutralizantes contra herpesvírus bovino tipo 1, herpesvírus bovino tipo 5 e herpesvírus bubalino tipo 1 em búfalos

Camila Mengue Scheffer^{1,2}, Ana Paula Mutterle Varela^{1,2}, Thais Fumaco Teixeira^{1,2}, Candice Schmidt^{1,2}, Samuel Paulo Cibulski^{1,2}, Phelipe Magalhães Duarte⁴, Helton Fernandes dos Santos^{1,2}, Fabrício Souza Campos^{2,3}, Paulo Michel Roehle^{1,2,3}

¹Equipe de Virologia, Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), Estrada do Conde 6000, Eldorado do Sul, RS, CEP 92990-000.

²Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV)

³Laboratório de Virologia, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS. Av. Sarmiento Leite 500, sala 208, Porto Alegre, RS, CEP 90050-170.

⁴URCAMP – Universidade da Região da Campanha – Campus universitário de Alegrete. Rua Castro Alves, 148, Centro, RS, CEP 97541-070.

Artigo a ser submetido ao Italian Journal of Animal Science.

Resumo

No presente estudo foi realizada uma pesquisa de anticorpos neutralizantes contra herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1), herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) e herpesvírus bubalino tipo 1 (BuHV-1) em búfalos (*Bubalus bubalis*) do Estado do Rio Grande do Sul. Paralelamente, foram realizados estudos para determinar o nível de reatividade sorológica cruzada induzida pelos mesmos nesta espécie, utilizando testes de soroneutralização com diferentes vírus de desafio. Para tanto, foram processadas 339 amostras de soros de bubalinos clinicamente saudáveis, de ambos os sexos, maiores de 12 meses, provenientes de 9 criatórios comerciais. Das 339 amostras analisadas, 159 amostras apresentaram anticorpos neutralizantes contra pelo menos um dos vírus testados. Cento e quarenta e nove (44,0 %) dos soros neutralizaram a amostra A663 (BoHV-5) e 145 (42,8%) neutralizaram a amostra Los Angeles (LA) (BoHV-1) assim como a amostra b6 (BuHV-1). Cento e trinta e uma (38,6 %) amostras mostraram-se positivas para a presença de anticorpos neutralizantes para as três cepas analisadas simultaneamente. Adicionalmente, 108 das 339 amostras foram analisadas para pesquisa de anticorpos frente outras duas cepas virais de BoHV-1 (EVI123/98 e SV265/96), onde 47 (43,5 %) e 54 (50 %) das amostras apresentaram anticorpos neutralizantes contra esses vírus, respectivamente. Individualmente, houve variação (43 a 50 %) na detecção de anticorpos neutralizantes nas amostras analisadas conforme as cepas utilizadas nos testes de SN. A sensibilidade da SN foi menor quando considerados os resultados obtidos com cada um dos vírus separadamente. A sensibilidade máxima da SN foi obtida quando os resultados positivos frente às amostras LA, SV265/96 e A663 foram somados. Os resultados obtidos permitem afirmar que os herpesvírus circulam nas populações de búfalos examinadas, todavia, com o método empregado não foi possível identificar efetivamente qual(is) o(s) vírus associado(s) à infecção nesses animais.

Introdução

Os herpesvírus bovinos tipos 1 (BoHV-1) e 5 (BoHV-5) e o herpesvírus bubalino tipo 1 (BuHV-1) pertencem à ordem *Herpesvirales*, família *Herpesviridae*, gênero *Varicellovirus* (ICTV, 2011). Em bovinos, o BoHV-1 e o BoHV-5 tem sido associados a vários Tabela clínicos, como rinotraqueíte, conjuntivite, vulvovaginite, balanopostite, encefalite e falhas reprodutivas diversas (JONES & CHOWDHURY, 2008; ZAJAC et al., 2010). Quanto ao BuHV-1, não há informações do seu envolvimento com enfermidades em bubalinos, já que os animais dos quais este agente foi isolado apresentavam infecções subclínicas (GEORGE & PHILPOTT, 1972; DE CARLO et al., 2004).

Os dois vírus de origem bovina (BoHV-1 e BoHV-5) são muito semelhantes entre si em aspectos estruturais, biológicos, antigênicos e moleculares (FRENCH, 1962; METZLER et al., 1986; STUDDERT, 1989; BRATANICH et al., 1991; THIRY et al., 2007). Ambos induzem extensa reatividade sorológica cruzada, que pode ser evidenciada por testes de soroneutralização (BRATANICH et al., 1991; TEIXEIRA et al., 1998). Em função dessa reatividade cruzada, estudos de prevalências ou incidência de infecções, tanto para BoHV-1 como para BoHV-5, não permitem avaliações tipo-específicas, impedindo assim, o estabelecimento da real prevalência dessa infecções. Não obstante, tais estudos refletem claramente a ampla distribuição desses agentes nos rebanhos bovinos (FRENCH, 1962; CHINCHKAR et al., 2002; STAHL et al., 2002; SOLIS-CALDERON et al., 2003; RIET-CORREA et al., 2006; GUARINO et al., 2008; HOLZ et al., 2009; DIAS et al., 2013).

Em relação ao BuHV-1, os estudos antigênicos e sorológicos realizados em bubalinos e bovinos são escassos, embora os níveis de reatividade sorológica cruzada induzidos por este em relação a BoHV-1 e BoHV-5 são desconhecidos. É possível que herpesvírus de origem bovina circulem em bubalinos e vice-versa, embora o grau de participação de bubalinos hospedeiros para os herpesvírus bovinos permaneça desconhecido (GEORGE & PHILPOTT, 1972; DE CARLO et al., 2004; SCICLUNA et al., 2007; 2010; THIRY et al., 2007; AMOROSO et al., 2013). Estudos sorológicos com BoHV-1 e BuHV-1 já foram relatados em bubalinos, revelando a circulação de ambos agentes (YADAV & PATHAK, 1995; AKHTAR & ASIF, 1996; SCICLUNA et al., 2007; RONCORONI et al., 2007). Contudo, nenhum estudo sorológico foi até o presente reportado pesquisando anticorpos contra BuHV-1, BoHV-1, BoHV-5 e suas

possíveis reações cruzadas em búfalos. Além disso, embora tenha sido especulado que o BoHV-5 teria evoluído a partir de herpesvírus bubalinos (STUDDERT, 1989), o BoHV-5, assim como o BoHV-1, ainda não foram identificados nessa espécie.

Como parte de um projeto mais amplo sobre infecções com herpesvírus em búfalos, o presente estudo foi conduzido para investigar a ocorrência de anticorpos neutralizantes contra BoHV-1, BoHV-5 e BuHV-1 visando avaliar o perfil de resposta sorológica frente a estes agentes em bubalinos. Paralelamente, foi conduzido um estudo visando determinar o nível de reatividade sorológica cruzada induzida pelos mesmos.

2 Materiais e Métodos

2.1 Células

Foram utilizadas as células da linhagem CRIB, um clone da linhagem *Madin Darby Bovine Kidney cells* (MDBK), selecionadas pela resistência à infecção pelo vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) (FLORES & DONIS, 1995). As células foram cultivadas em meio mínimo essencial de Eagle (MEM; Gibco) suplementadas com 10% de soro fetal bovino (SFB; Gibco) e antibióticos (penicilina e estreptomicina) em condições usuais (FRESHNEY, 1992). Todos os meios e soros foram previamente testados e demonstrados livres de herpesvírus e BVDV, através do isolamento viral em cultivos celulares e testes de imunoperoxidase (ROEHE, 1991; FRANCO et al., 2012). As células foram tripsinizadas a cada 3-4 dias e cultivadas segundo métodos usuais (FRESHNEY, 1992).

2.2 Vírus

Foram utilizadas as seguintes amostras de vírus: BoHV-1.1 amostra Los Angeles (ou LA; MADIN et al., 1956), BoHV-1.1 amostra EVI123/98 (ROEHE et al., 1997; D'ARCE et al., 2002; SOUZA et al., 2002), BoHV-1.2a amostra SV265/96 (FRANCO et al., 2002; D'ARCE et al., 2002; SPILKI et al., 2005), BoHV-5b amostra A663 (CARRILO et al., 1983) e BuHV-1 amostra b6 (GEORGE & PHILPOTT, 1972). A multiplicação e titulações dos vírus foram realizadas em células CRIB seguindo métodos usuais (ROEHE et al., 1997).

2.3 Amostras

Foram examinadas 339 amostras de soro bubalino, colhidas de animais de rebanhos privados do Estado do Rio Grande do Sul. A população bubalina analisada neste estudo era constituída de animais maiores de 12 meses, de ambos os sexos, de diferentes raças e tipo de exploração. Os animais não eram vacinados contra BoHV-1 e BoHV-5 e todos se apresentavam clinicamente saudáveis na ocasião da coleta. As amostras de soro foram mantidas refrigeradas até o laboratório, onde o soro foi separado do coágulo por centrifugação, inativado em banho-maria a 56 °C por 30 minutos e as amostras estocadas a – 20 °C até o momento do uso. Dentre as amostras de soro, 108 foram selecionadas (essencialmente com base no volume de soro disponível) para testes frente a outros vírus de desafio (BoHV-1.1, cepa EVI123/98 e BoHV-1.2a, cepa SV265/96) em testes de soroneutralização.

2.4 Soroneutralização (SN)

A pesquisa de anticorpos neutralizantes para BoHV-1, BoHV-5 e BuHV-1 foi realizada frente as amostras de vírus BoHV-1.1 amostra Los Angeles (ou LA; MADIN et al., 1956), BoHV-1.1 amostra EVI123/98 (ROEHE et al., 1997; D'ARCE et al., 2002; SOUZA et al., 2002), BoHV-1.2a amostra SV265/96 (FRANCO et al., 2002; D'ARCE et al., 2002; SPILKI et al., 2005), BoHV-5 amostra A663 (CARRILO et al., 1983) e BuHV-1 amostra b6 (GEORGE & PHILPOTT, 1972), individualmente, utilizando-se a técnica de soroneutralização (DEREGT et al., 1993). Os soros foram diluídos em duplicata, nas diluições $\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{4}$ e as misturas soro-vírus incubadas por 24 horas antes da adição das células CRIB. Utilizou-se em cada teste, para as cinco cepas virais, 100 doses infectantes para 50% dos cultivos celulares ($DICC_{50}$). As placas foram incubadas a 37 °C em estufa em atmosfera contendo 5 % de CO_2 . A leitura final dos resultados foi realizada pela avaliação da presença ou ausência de efeito citopático. Cada partida de testes foi realizada com controles de células e controle de vírus (100, 10, 1 e 0,1 $DICC_{50}$). Foram considerados válidos testes em que o número de $DICC_{50}$ efetivamente utilizadas encontrava-se entre 31,6 e 316.

3 Resultados

3.1 Detecção de anticorpos neutralizantes contra herpesvírus

Os resultados obtidos na SN com os 339 soros frente às três diferentes amostras de desafio, LA (BoHV-1.1), A663 (BoHV-5b) e b6 (BuHV-1) estão apresentados na Tabela 1. Das 339 amostras analisadas, 46,9 % (159) foram positivas para pelo menos um dos vírus testados. O número de amostras positivas encontrada foi de 42,8 % (145) para o vírus LA; 44 % (149) para o vírus A663 e 42,8 % (145) para o vírus b6. Do total de amostras analisadas 38,6 % (131) foram positivas para as três cepas virais (LA, A663, b6). Um pequeno número de amostras apresentou anticorpos neutralizantes reconhecidos por somente uma das cepas de vírus. Quatro amostras foram detectadas apenas com LA, uma amostra foi detectada apenas com A663 e quatro amostras foram detectadas apenas com b6. A sensibilidade máxima (ou seja, o número mais elevado de soros positivos) foi obtida quando computados os somatórios dos positivos detectados pelas cepas LA, A663 e b6 (Tabela 1).

Do total de amostras analisadas, 108 foram selecionadas (essencialmente em virtude do volume de soro disponível) para testes utilizando mais duas cepas virais de diferentes subtipos: EVI123/98 (BoHV-1.1) e SV265/96 (BoHV-1.2a), como vírus de desafio nas provas de SN. Os resultados obtidos na SN com estes soros frente às cinco diferentes cepas estão apresentados na Tabela 2. Das 108 amostras analisadas, 53,7% (58) foram positivas para pelo menos uma cepa analisada. O número de amostras positivas encontrada foi de 43,5 % (47) para a cepa LA; 43,5 % (47) para a cepa EVI123/98; 50 % (54) para a cepa SV265/96; 48,1 % (52) para a cepa A663 e 47,2 % (51) para a cepa b6. Os dados obtidos revelaram que, quando considerados isoladamente os resultados obtidos com cada cepa, a SV265/96 foi a que permitiu a detecção do maior número de soros como positivos (Tabela 2).

A análise dos resultados obtidos revela que o número máximo de soros positivos foi obtido quando computados os soros positivos obtidos frente a três cepas: LA, SV265/96 e A663. Além disso, os resultados demonstram uma extensa reatividade sorológica cruzada entre os herpesvírus, inclusive para BuHV-1, já que dentre as amostras soropositivas (58/108), apenas 18 amostras (16,7%) não foram positivas para as cinco cepas simultaneamente (Tabela 2).

4 Discussão

Os resultados obtidos no presente estudo indicam a presença de anticorpos neutralizantes contra o BoHV-1, BoHV-5 e BuHV-1 em animais de rebanhos bubalinos do RS. Contudo, não foi possível associar a ocorrência da infecção a um determinado tipo viral. Como aqui evidenciado e de acordo com a literatura (BRATANICH et al., 1991; TEIXEIRA et al., 1998), a similaridade antigênica existente entre esses vírus não permite distinção.

A identificação de 46,9 % de soropositividade observada não é distinta daquelas identificadas em outros estudos (CORTEZ, 2001; PHARANDE et al., 2004; NANDI et al., 2010). Entretanto, estes resultados são de difícil comparação, uma vez que naqueles estudos não haviam sido realizados testes com diferentes tipos e subtipos de herpesvírus, pelo que torna-se difícil estabelecer um paralelo. Igualmente, como aqui observado, naqueles estudos não foi possível identificar qual o vírus foi efetivamente o causador da resposta imune identificada, em função da elevada reatividade sorológica cruzada.

Buscou-se ainda detectar se diferentes cepas de herpesvírus utilizadas como vírus de desafio poderiam apresentar maior sensibilidade (ou seja, detectar maior número de soros contendo anticorpos neutralizantes) em testes de SN. Para tanto, foram selecionadas 108 amostras de soro, essencialmente em função dos volumes então disponíveis. Além dos testes realizados com as cepas acima, estas foram testadas adicionalmente frente a EVI123/98 (BoHV1.1) e SV265/96 (BoHV-1.2a) como vírus de desafio. A sensibilidade da SN foi significativamente menor quando considerados os resultados obtidos com cada um dos vírus isoladamente (LA, EVI123/98, A663 e b6). A sensibilidade mais elevada foi atingida quando os resultados positivos frente às amostras LA, SV265/96 e A663 foram computados conjuntamente (Tabela 2). Este método e os resultados com ele obtidos são comparáveis aos obtidos com o mesmo tipo de testes em soros bovinos, onde a maior sensibilidade em testes de SN foi revelada por uma combinação de resultados frente a diferentes vírus de desafio (HOLZ et al., 2010; VARELA et al., 2010). Isoladamente, a amostra SV265/96 (BoHV-1.2a) foi a que reagiu com o maior número de soros de bubalinos (93 % de sensibilidade). Este achado é de certa maneira surpreendente, uma vez que o esperado seria de que os bubalinos reagissem mais intensamente com a cepa de BuHV-1 (b6), o que, nas condições do presente estudo, não se revelou verdadeiro. A cepa LA, que nos testes em bovinos demonstrou isoladamente a mais elevada sensibilidade (HOLZ et al., 2010; VARELA et

al., 2010), no presente estudo permitiu somente 81 % das amostras consideradas positivas.

Quanto ao BoHV-5, que seja do conhecimento dos autores, não há na literatura trabalhos investigando sua ocorrência em bubalinos. No entanto, no presente estudo, das 339 amostras analisadas, a presença de anticorpos neutralizantes contra este tipo viral foi identificada em 44 % das amostras de soro bubalino analisadas (Tabela 1). Isso, no entanto, como afirmado anteriormente, não permite definir se os bubalinos examinados foram ou não infectados com esse agente devido às similaridades na resposta imune induzida por este agente com a provocada pelos demais herpesvírus examinados. Assim, com os resultados aqui obtidos, não é possível afirmar se infecções com BoHV-5 ou BoHV-1 podem efetivamente ocorrer em bubalinos.

No presente estudo foram realizados somente testes de triagem, não sendo realizadas titulações de anticorpos neutralizantes frente aos diferentes vírus de desafio. Entretanto, em estudos similares realizados por nosso grupo previamente com soros bovinos (TEIXEIRA et al, 1998), mesmo as titulações de anticorpos neutralizantes não se mostraram capazes de permitir inferências sobre o vírus efetivamente causador da infecção nos animais. Não obstante, esse importante aspecto permanece para ser analisado em seguimento a estes estudos.

O presente estudo revelou que os testes de SN permitem comprovar a circulação de herpesvírus nos rebanhos bubalinos examinados. Não obstante, a SN, mesmo quando executada frente a diferentes amostras de desafio, não permite definir qual o herpesvírus (ou os herpesvírus) são efetivamente causadores da infecção nos animais investigados. Provavelmente e em analogia ao observado em bovinos, a presença de anticorpos neutralizantes somente indica que o animal foi exposto em algum momento a algum (ou alguns) desses vírus, o que não pode ser esclarecido como este tipo de teste em função da alta reatividade cruzada dos anticorpos induzidos.

5 Referências

- AKHTAR, S. & ASIF, M. Epidemiologic association between antibody titres against bovine virus diarrhoea virus, rinderpest disease virus and infectious bovine rhinotracheitis virus in a buffalo herd. **Tropical Animal Health Production**, v. 28, p. 207-212. 1996.
- AMOROSO, M.G. et al. Bubaline herpesvirus 1 associated with abortion in a Mediterranean water buffalo. **Research in Veterinary Science**, v. 94, n. 3, p. 813-816. 2013.
- BRATANICH, A.C. et al. Comparative studies of BHV-1 variants by in vivo – in vitro tests. **Journal of Veterinary Medicine B**, v. 38, p. 41-48. 1991.
- CARRILLO, B.J.; POSPISCHIL, A.; DAHME, E. Pathology of a bovine viral necrotizing encephalitis in Argentina. **Zentralbl Veterinarmed B**, v. 30, n. 3, p. 161-168. 1983.
- CORTEZ, A. et al. Comparação das técnicas de ELISA indireto e de soroneutralização na detecção de anticorpos contra o BHV-1 em amostras de soro bubalino (*Bubalus bubalis*). **Brazilian Journal of Veterinary Research and animal Science**, v. 38, n. 3, p. 146-148. 2001.
- CHINCHKAR, S.R. et al. Seroprevalence of IBR in Maharashtra state. **Indian Veterinary Journal**, v. 79, p. 68-69. 2002.
- D'ARCE, R.C. et al. Restriction endonuclease and monoclonal antibody analysis of Brazilian isolates of bovine herpesviruses types 1 and 5. **Veterinary Microbiology**, v. 88, n. 4, p. 315-324. 2002.
- DE CARLO, E. et al. Molecular characterisation of a field strain of bubaline herpesvirus isolated from buffaloes (*Bubalus bubalis*) after pharmacological reactivation. **Veterinary Record**, v. 154, p. 171-174. 2004.
- DEREGT, D.; CHO, H. J. & KOZUB, G. C. A comparative evaluation of two sensitive serum neutralization tests for bovine herpesvirus-1 antibodies. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 57, n. 1, p. 56-59. 1993.
- DIAS, J. A. et al. Seroprevalence and Risk Factors of Bovine Herpesvirus 1 Infection in Cattle Herds in the State of Paraná, Brazil. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 60, p. 39-47. 2013.
- FLORES E.F. & DONIS R. Isolation of a mutant MDBK cell line resistant to bovine viral diarrhoea virus infection due to a block in viral entry. **Virology**, v. 208, p. 565-575. 1995.
- FRANCO, A.C. et al. Construction and characterization of a glycoprotein E deletion mutant of bovine herpesvirus type 1.2 strain isolated in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 274-278. 2002.

FRANCO, A.C.; ROEHE, P.M. & VARELA, A.P.M. Herpesviridae, In: FLORES, E.F., *Virologia Veterinária*, Santa Maria-RS, Ed. Da UFSM, cap. 18, p. 503-570. 2012.

FRENCH, E.L. A specific virus encephalitis in calves: isolation and characterization of the causal agent. **Veterinary Journal**, v. 38, p. 216-221. 1962.

FRESHNEY, I. *Animal Cell Culture: A Practical Approach*, 2nd ed. Oxford University Press, Oxford, 329 p. 1992.

GEORGE, T.D.ST. & PHILPOTT, M. Isolation of IBR virus from the prepuce of water buffalo bulls in Australia. **Australian Veterinary Journal**, v. 48, p. 126. 1972.

GUARINO, H. et al. Prevalence of serum antibodies to bovine herpesvirus-1 and bovine viral diarrhoea virus in beef cattle in Uruguay. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 85, n. 1-2, p. 34-40. 2008.

HOLZ, C.L. et al. Soroprevalência de herpesvírus bovinos tipos 1 e/ou 5 no Estado do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 9, p. 767-773. 2009.

HOLZ, C.L. et al. Serum neutralization with different types and subtypes of bovine herpesvirus 1 and 5. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 7, p. 515-522. 2010.

JONES, C. & CHOWDHURY, S. A review of the biology of bovine herpesvirus type 1 (BHV-1), its role as a cofactor in the bovine respiratory disease complex and development of improved vaccines. **Animal Health Research Reviews**, v. 8, n. 2, p. 187-205. 2008.

MADIN, S. H.; YORK, R. J. & MCKERCHER, D. G. Isolation of the infectious bovine rhinotracheitis virus. **Science**, v. 124, n. 3225, p. 721-722, 1956.

METZLER, A.E.; SCHUDEL, A.A. & ENGELS, M. Bovine herpesvirus 1: molecular and antigenic characteristics of variant viruses isolated from calves with neurological disease. **Archives of Virology**, v. 87, p. 205-217. 1986.

NANDI, S. et al. Serological Evidences of Bovine Herpesvirus-1 Infection in Bovines of Organized Farms in India. **Transboundary and Emerging Diseases**. 2010. doi: 10.1111/j.1865-1682.2010.01185.x. Epub ahead of print

PHARANDE, R.R.; DESHMUKH, V. V. & M. B. GUJAR. Seroprevalence and Characterization Studies of Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus. In: 11th International Conference of the Association of Institutions for Tropical Veterinary Medicine and 16th Veterinary Association Malaysia Congress, 23-27.,2004. Sunway Pyramid Convention Centre, Petaling Jaya, 2004. P. 300-301.

RIET-CORREA, G. et al. Meningoencefalite e polioencefalomalacia causada por Herpesvírus bovino-5 no Estado do Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, p. 44-46. 2006.

- ROEHE, P.M. et al. Diferenciação entre o vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (BHV-1) e o herpesvírus da encefalite bovina (BHV-5). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 17, p. 41-44. 1997.
- RONCORONI, C. Serological survey and reproductive performances in buffaloes under fixed time artificial insemination. **Italian Journal of Animal Science**, v. 6, p. 828-831. 2007.
- SOLIS-CALDERON, J.J. et al. Seroprevalence of and risk factors for infectious bovine rhinotracheitis in beef cattle herds of Yucatan, Mexico. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 57, n. 4, p. 199-208. 2003.
- SOUZA, V.F. et al. Caracterização de herpesvírus bovinos tipos 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5) com anticorpos monoclonais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 22, n. 1, p.13-18, 2002.
- SCICLUNA, M.T. Epidemiological situation of Herpesvirus infections in buffalo herds: Bubaline Herpesvirus1 or Bovine Herpesvirus1? **Italian Journal of Animal Science**, v. 6, p. 845-849. 2007.
- SCICLUNA M.T. et al. Should the domestic buffalo (*Bubalus bubalis*) be considered in the epidemiology of Bovine Herpesvirus 1 infection? **Veterinary Microbiology**, v. 143, n.1, p. 81-88. 2010.
- SPIILKI, F.R. et al. A monoclonal antibody-based ELISA allows discrimination between responses induced by bovine herpesvirus subtypes 1 (BoHV-1.1) and 2 (BoHV-1.2). **Journal of Virological Methods**, v. 129, n. 2, p. 191-193. 2005.
- STAHL, K. et al. Bulk milk testing for antibody seroprevalence to BVDV and BHV-1 in a rural region of Peru. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 56, p 193-202. 2002.
- STUDDERT, M.J. Bovine encephalitis herpesvirus. **Veterinary Record**, v. 125, p. 584. 1989.
- TEIXEIRA, M.B. et al. Diferenças em níveis de anticorpos neutralizantes contra herpesvírus bovinos tipos 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5). **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v. 4, n. 1, p. 61-65, 1998.
- THIRY, J. et al. Isolation and characterisation of a ruminant alphaherpesvirus closely related to bovine herpesvirus 1 in a free-ranging red deer. **Veterinary Research**, v. 3, p. 26. 2007.
- VARELA, A.P.M. et al. Neutralizing antibodies to bovine herpesvirus types 1 (BoHV-1) and 5 (BoHV-5) and its subtypes. **Veterinary Microbiology**, v. 142, p. 254-260. 2010.
- ZAJAC, M. P. D. M. et al. Biology of bovine herpesvirus 5. **The Veterinary Journal**, v. 184, p. 138-145. 2010.

Tabela 1 – Resultados (individuais e acumulativos) obtidos na soroneutralização (SN) com soros de bubalinos frente a três diferentes cepas de herpesvírus (BoHV-1, BoHV-5 e BuHV-1) utilizadas como vírus de desafio nos testes, considerando apenas os soros positivos para pelo menos um dos vírus (n=159).

| Amostras de desafio | Número de soros positivos (n=339) | Percentual de soros positivos (%) | Sensibilidade^a (159/159 = 100%) | McNemar's test[□] |
|----------------------------|--|--|---|-----------------------------------|
| LA (BoHV-1) | 145 | 42,8 | 91 | 0,0003 |
| A663 (BoHV-5) | 149 | 44 | 94 | 0,003 |
| b6 (BuHV-1) | 145 | 42,8 | 91 | 0,0003 |
| LA+A663 | 155 | 45,7 | 97 | 0,074 |
| LA+b6 | 158 | 46,6 | 99 | 0,480 |
| A663+b6 | 155 | 45,7 | 97 | 0,074 |
| LA+A663+b6 | 159 | 46,9 | 100 | 1,000 |

[□] Valores <0,005 são considerados significativos.

^a Sensibilidade calculada com um intervalo de confiança de 95% sobre o número total de soros positivos (n=159).

Tabela 2 - Resultados (individuais e cumulativos) obtidos na soroneutralização (SN) com soros de bubalinos frente a cinco diferentes cepas de herpesvírus utilizadas como vírus de desafio nos testes, considerando apenas os soros positivos para pelo menos um dos vírus (n=58).

| Amostras de desafio | Número de soros positivos | Percentual de soros positivos (%) | Sensibilidade ^a (58/58 =100%) | McNemar's test [□] |
|----------------------------|---------------------------|-----------------------------------|--|-----------------------------|
| BoHV-1.1 LA | 47 | 43,5 | 81 | 0,001 |
| BoHV-1.1 EVI123/98 | 47 | 43,5 | 81 | 0,001 |
| BoHV-1.2a SV265/96 | 54 | 50,0 | 93 | 0,074 |
| BoHV-5b A663 | 52 | 48,1 | 90 | 0,023 |
| BuHV-1 b6 | 51 | 47,2 | 88 | 0,013 |
| LA+EVI123/98 | 52 | 48,1 | 90 | 0,007 |
| LA+SV265/96 | 57 | 52,8 | 98 | 0,480 |
| LA+A663 | 55 | 51,0 | 94 | 0,134 |
| LA+b6 | 54 | 50,0 | 93 | 0,074 |
| EVI123/98+SV265/96 | 54 | 50,0 | 93 | 0,074 |
| EVI123/98+A663 | 53 | 49,1 | 91 | 0,041 |
| EVI123/98+B6 | 52 | 48,1 | 90 | 0,023 |
| SV265/96+A663 | 56 | 51,9 | 97 | 0,248 |
| SV265/96+b6 | 55 | 51,0 | 95 | 0,134 |
| A663+b6 | 53 | 49,1 | 91 | 0,041 |
| LA+EVI123/98+SV265/96 | 57 | 52,8 | 98 | 0,480 |
| LA+EVI123/98+A663 | 55 | 51,0 | 95 | 0,134 |
| LA+EVI123/98+b6 | 54 | 50,0 | 93 | 0,074 |
| LA+SV265/96+A663 | 58 | 53,7 | 100 | 1,000 |
| LA+SV265/96+b6 | 57 | 52,8 | 98 | 0,480 |
| LA+A663+b6 | 55 | 51,0 | 95 | 0,134 |
| EVI123/98+SV265/96+A663 | 56 | 51,9 | 97 | 0,248 |
| EVI123/98+SV265/96+b6 | 55 | 51,0 | 95 | 0,134 |
| EVI123/98+A663+b6 | 53 | 49,1 | 91 | 0,041 |
| SV265/96+A663+b6 | 56 | 51,9 | 97 | 0,248 |
| LA+EVI123/98+SV265/96+A663 | 57 | 52,8 | 98 | 0,480 |
| LA+EVI 123/98+SV265/96+b6 | 57 | 52,8 | 98 | 0,480 |
| LA+SV265/96+A663+b6 | 58 | 53,7 | 100 | 1,000 |
| EVI123/98+SV265/96+A663+b6 | 56 | 51,9 | 97 | 0,248 |

□ Valores <0,005 são considerados significativos.

^a Sensibilidade calculada com um intervalo de confiança de 95% sobre o número total de soros positivos (n=58).

CAPÍTULO 2

Detecção do vírus da diarreia viral bovina (BVDV) em búfalos

Camila Mengue Scheffer^{1,2}, Samuel Paulo Cibulski^{1,2}, Thais Fumaco Teixeira^{1,2}, Candice Schmidt^{1,2}, Ana Paula Muterle Varela^{1,2}, Phelipe Magalhães Duarte⁴, Helton Fernandes dos Santos^{1,2}, Paulo Michel Roehle^{1,2,3}

¹Equipe de Virologia, Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), Estrada do Conde 6000, Eldorado do Sul, RS, CEP 92990-000.

²Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV)

³Laboratório de Virologia, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS. Av. Sarmiento Leite 500, sala 208, Porto Alegre, RS, CEP 90050-170.

⁴URCAMP – Universidade da Região da Campanha – Campus universitário de Alegrete. Rua Castro Alves, 148, Centro, RS, CEP 97541-070.

Artigo a ser submetido ao Italian Journal of Animal Science.

Resumo

Com o desenvolvimento da bubalinocultura no Estado do RS, frequentemente próxima ou associada à criação de bovinos, tornou-se de interesse investigar a circulação do BVDV em rebanhos bubalinos. Com esse intuito, 176 amostras de soro de búfalos de ambos os sexos, clinicamente saudáveis, foram examinadas em busca de anticorpos e genomas de pestivírus. Os testes sorológicos foram realizados por soroneutralização. Para a detecção de genomas virais, foi desenvolvido um teste baseado na transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa (qPCR), desenhado para detectar todos os tipos conhecidos de BVDV (1, 2 e 3). A pesquisa de anticorpos revelou que 10,8 % dos soros apresentavam anticorpos neutralizantes contra pestivírus. Dentre os animais soronegativos, 2,8 % continham genomas de pestivírus circulantes. Além de confirmar a possibilidade de circulação de pestivírus em bubalinos, esse estudo demonstra que estes animais podem ser portadores de genomas virais no soro, de maneira similar ao que ocorre em bovinos persistentemente infectados com BVDV. Estudos subsequentes deverão ser realizados para avaliar o significado da presença desses genomas no soro de bubalinos e seu papel na biologia dos pestivírus.

1 Introdução

O vírus da diarreia viral bovina (BVDV) é membro da família *Flaviviridae*, gênero *Pestivirus* (ICTV, 2011). É um vírus envelopado, com 40 a 60 nm de diâmetro e com genoma de RNA fita simples linear de polaridade positiva de aproximadamente 12.5 Kb (COLLETT et al., 1989; HORZINEK, 1991; DONIS, 1995; THIEL et al., 1996). Esse vírus pode eventualmente cruzar barreiras entre espécies e infectar uma ampla variedade de hospedeiros. Anticorpos para pestivírus já foram detectados em mais de 40 espécies ruminantes (HAMBLIN & HEDGER, 1979) e já foram isolados de caprinos (FRASER et al., 1981), bubalinos (PLOWRIGHT, 1969), cervídeos (NETTLETON, 1990) e girafídeos (PLOWRIGHT, 1969).

O BVDV abrange duas espécies virais distintas, BVDV-1 e BVDV-2, anteriormente classificados como genótipos (RIDPATH et al., 1994). Análises filogenéticas do genoma viral suportam que os pestivírus bovinos anteriormente classificados como “atípicos” (SCHIRRMEIER et al., 2004; STALDER et al., 2005) sejam reclassificados como uma nova espécie denominada BVDV-3 (LIU et al., 2009). Os vírus BVDV-1 representam a maioria dos vírus vacinais e das cepas de referência, enquanto os vírus BVDV-2 foram identificados em surtos de doença aguda e doença hemorrágica na América do Norte (PELLERIN et al., 1994).

Na bovinocultura, o BVDV é um patógeno de grande importância, especialmente por estar associado a capacidade de causar problemas reprodutivos. Infecções durante a gestação podem dar margem a reabsorção embrionária, nascimento de animais persistentemente infectados (PI), animais com malformações congênitas, abortos e/ou natimortos (FRAY et al., 2000; BROCK, 2004; GROOMS, 2004; SOLIS-CALDERON et al., 2005; ARENARTH et al., 2009). Os animais PI são imunotolerantes e não desenvolvem anticorpos contra a amostra de vírus infectante, permitindo a replicação e disseminação do vírus indefinidamente, constituindo-se assim, nos principais perpetuadores da infecção nos rebanhos (HOUE, 1995; COLLEN & MORRISON 2000). Como o número de animais persistentemente infectados tende a ser relativamente baixo – cerca de 1 % (HOUE, 2003), a identificação desses animais nos rebanhos tem sido realizada usualmente pela identificação de animais soronegativos em testes de SN ou ELISA, sendo estes suplementados pela detecção do vírus por imunistoquímica em cortes de tecido, isolamento viral em cultivos celulares ou ainda pela detecção de genomas virais em órgãos ou tecidos (DUBOVI, 2013).

O teste de soroneutralização é bastante utilizado no estudo da soroprevalência do BVDV em bovinos (BRITO et al., 2010; AHMAD et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2012). Já em bubalinos, estudos desse tipo são menos frequentes (AKHTAR & ASIF, 1996; LAGE et al., 1996; ZAGHAWA, 1998).

Nos últimos anos, com a expansão da bubalinocultura em nosso País, o interesse pelo estado sanitário desses animais vem aumentando, não só pela importância dessa espécie como também por possíveis participações em enfermidades que possam afetar bovinos e outras espécies criadas em associação com bubalinos. Assim, o presente estudo foi realizado a fim de identificar a circulação do BVDV em populações bubalinas aparentemente saudáveis, não vacinadas, oriundas de propriedades do Estado do Rio Grande do Sul. Para tanto, foram utilizados os métodos: soroneutralização, para a detecção de anticorpos neutralizantes contra o BVDV no soro desses animais; transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) para detecção de genomas virais.

2 Material e métodos

2.1 Amostras

Foram examinadas 176 amostras de sangue bubalino, coletadas por punção da veia jugular de animais mantidos em criatórios particulares do Estado do RS. A população bubalina analisada neste estudo era constituída de animais maiores de 12 meses, de ambos os sexos, de diferentes raças e tipos de exploração. Os animais não foram previamente vacinados contra BVDV e se apresentavam clinicamente saudáveis. As amostras de sangue foram mantidas refrigeradas até o laboratório, onde foi realizada a centrifugação a 2000 x g durante 10 minutos para a separação e coleta do soro. Estas amostras foram inativadas em banho-maria a 56 °C por 30 minutos e estocadas a -20 °C até o momento do uso.

2.2 Células e vírus

Foram utilizadas células da linhagem “*Madin Darby Bovine Kidney*” (MDBK), originalmente obtida de ATCC (CCL-22), mantidas em meio essencial mínimo de Eagle (MEM; Gibco) suplementadas com 10 % de soro fetal bovino (SFB; Gibco) e antibióticos (penicilina e estreptomicina) em condições usuais. As células foram tripsinizadas a cada 3-4 dias e cultivadas segundo métodos usuais (FRESHNEY, 1992). Células e SFBs foram previamente testados para assegurar a ausência de antígenos e anticorpos contra BVDV.

Para a produção de antígeno viral para os testes de soroneutralização, a cepa “Oregon C24V” (GILLESPIE et al., 1960) foi inoculada em monocamadas semiconfluentes de MDBK. Após 3-4 dias, ou quando o efeito citopático viral atingia aproximadamente 90 % da monocamada, as células foram congeladas a -70 °C e o vírus foi titulado seguindo métodos usuais (ROEHE et al., 1997).

2.3 Teste de soroneutralização

A pesquisa de anticorpos neutralizantes para BVDV foi realizada de forma individual, utilizando a técnica de soroneutralização (OLIVEIRA et al., 1996). Os soros foram diluídos em duplicatas, nas diluições 1/10 e 1/20 e as misturas soro-vírus incubadas por 2 horas antes da adição das células MDBK. Em cada teste foram utilizadas 100 doses infectantes para 50 % dos cultivos celulares (DICC₅₀). As placas

foram incubadas a 37 °C em estufa com 5 % de CO₂. A leitura final dos resultados foi realizada pela avaliação da presença ou ausência de efeito citopático característico.

2.4. Transcrição reversa/ reação da qPCR

2.4.1. Projeção dos oligonucleotídeos

A projeção dos oligonucleotídeos para a amplificação de BVDV foi realizada utilizando múltiplos alinhamentos de sequências da região 5' não-codificadora do genoma dos BVDV. As sequências foram obtidas do NCBI Entrez nucleotide database em março de 2012, utilizando o NCBI taxonomy browser (WHEELER et al., 2005). As sequências, parciais e completas, (~1900) (Tabela 1) foram agrupadas e alinhadas utilizando o programa MUSCLE (EDGAR, 2004), do pacote de programas Geneious (DRUMMOND et al., 2011). Fragmentos de elevada identidade, encontrados no alinhamento múltiplo de sequências, foram escolhidos para a construção dos oligonucleotídeos pan-reativos para BVDV. Os oligonucleotídeos projetados foram denominados pan-BVDV F (5'-CACCTATCAGGCTGTRTYC-3') e pan-BVDV R (5'-GSGYAGTCGTCAGTGGTCC-3') (Y= C/T; R= A/G; S= G/C).

2.4.2. Construção de curvas-padrão e determinação da sensibilidade e especificidade da qPCR para BVDV

Para a obtenção de curvas-padrão de BVDV-1, BVDV-2 e BVDV-3, células MDBK foram inoculadas com as amostras de BVDV “ICEL-A” (BVDV-1), “Soldan” (BVDV-2) e “1.10” (BVDV-3). O RNA viral foi extraído com o PureLinK™ Viral RNA/DNA Mini Kit (Invitrogen). O RNA viral foi convertido para cDNA utilizando-se SuperScript® III First-Strand Synthesis Supermix (Invitrogen), conforme instruções do fabricante. Três microlitros de cada cDNA foram utilizados para a realização da PCR (dados não mostrados) com os oligonucleotídeos pan-BVDV-F e pan-BVDV-R. Produtos com aproximadamente 150 pb foram recuperados do gel e clonados em um vetor procariótico (pCR®2.1-TOPO®) utilizando o TOPO TA Cloning® kit (Invitrogen). Após a clonagem, transformação em células competentes de *Escherichia coli* (Invitrogen) e seleção em meio apropriado, um clone plasmidial de cada isolado foi selecionado e sequenciado para a confirmação da natureza do inserto, além do seu tamanho (em pb).

Após a confirmação do inserto de cada clone, os plasmídeos foram quantificados usando o fluorímetro Qubit (Invitrogen). Diluições seriadas (1×10^0 a 1×10^9 cópias/reação) dos plasmídeos foram preparados em 10 mM de tampão Tris-EDTA (pH 8,0) para gerar as curvas padrão, para a determinação da sensibilidade dos ensaios.

Para verificar a especificidade dos ensaios, DNA e cDNA extraído de patógenos comumente encontrados em bovinos foram submetidos a pan-BVDV qPCR. DNA extraído de herpesvírus bovino tipo 1.1, 1.2a e 1.2b, herpesvírus bovino tipo 5a, 5b e 5c, parvovírus bovino tipo 1 e adenovírus bovino foram extraídos com o PureLink™ Genomic DNA kit (Invitrogen). RNA viral foi extraído do vírus da parainfluenza bovina tipo 3 e do vírus sincicial respiratório bovino com PureLinK™ Viral RNA/DNA Mini Kit (Invitrogen). RNA foi convertido em cDNA conforme mencionado anteriormente. Três microlitros do DNA/cDNA foi utilizado nos ensaios de especificidade.

2.4.3 Extração de RNA e síntese de cDNA das amostras de soro bubalino

O RNA foi extraído de 200 μ L das amostras de soro bubalino utilizando PureLinK™ Viral RNA/DNA Mini Kit (Invitrogen), conforme instruções do fabricante. Para a síntese de cDNA, aproximadamente 500 ng do RNA extraído (quantificado em L-QUANT, Locus biotecnologia) foi submetido à transcrição reversa retrotranscrito usando SuperScript® III First-Strand Synthesis Supermix (Invitrogen), conforme instruções do fabricante. Três microlitros de cDNA foram utilizados em cada ensaio.

2.4.4 PCR em tempo real (qPCR)

Para a detecção de pestivírus com os oligonucleotídeos pan-BVDV, uma qPCR utilizando SYBR Green-I foi padronizada. A qPCR foi realizada em um volume de 12,5 μ L, contendo 3 μ L de cDNA ou plasmídeo, 6,25 μ L of 2X Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen) e 200 nM de cada oligonucleotídeo. A amplificação foi realizada no termociclador StepOne™ Real-Time PCR system (Life Technologies) nas seguintes condições: ativação da uracil DNA glicosilase (UDG), incubação a 50 °C durante 2 minutos; desnaturação inicial e ativação da Platinum® Taq, 95 °C durante 5 minutos, seguidos de 40 ciclos de amplificação (15 s a 95 °C, 15 s a 56 °C e 30 s a 72 °C). Todas as reações (incluindo padrões, amostras e controles) foram realizadas em triplicata. Após os 40 ciclos de amplificação, uma curva de dissociação foi realizada, com incrementos de 0,3 °C (de 60 °C até 95 °C).

3 Resultados

3.1 Detecção de anticorpos neutralizantes contra o vírus da diarreia viral bovina

Do total de 176 soros analisados, anticorpos contra o BVDV foram detectados em 10,8 % das amostras (19/176). Amostras positivas para o BVDV foram detectadas em todas as propriedades analisadas, com índice de positividade variando de 5,3 a 23,1% (Tabela 2).

3.2 Padronização da qPCR

As sequências utilizadas na construção do plasmídeo mostraram-se 100 % idênticas a outras amostras de BVDV1, 2 e 3 já sequenciadas, mostrando que os oligonucleotídeos projetados eram específicos para as três espécies conhecidas de BVDV. Utilizando a ferramenta Primer-BLAST (YE et al., 2012), foi verificado que variação do tamanho do fragmento amplificado para cada espécie de BVDV foi mínima, já que a região 5' UTR é uma região bastante conservada entre as espécies de BVDV. Para o BVDV1, o fragmento amplificado *in silico* variou de 145-153 pb. Já para o BVDV2, o fragmento variou de 148-155 pb. Não foi verificada variação no tamanho do fragmento de BVDV3, que foi de 151 pb.

A sensibilidade analítica do ensaio foi de 10 moléculas de plasmídeo recombinante para o BVDV1 e BVDV2 e de 100 moléculas por reação para o BVDV3 (Figura 1). Após os 40 ciclos de amplificação, as amostras foram submetidas a um aumento gradual na temperatura, com aquisição de fluorescência pelo equipamento (*melting curve* ou curva de dissociação). A qPCR apresentou-se altamente específica, já que apenas um pico de dissociação foi gerado. A temperatura média de dissociação para BVDV1, BVDV2 e BVDV3 foi de 83,99 °C, 82,73 °C e 83,24 °C, respectivamente (Figura 2). Como as temperaturas de dissociação foram bastante próximas, não foi possível determinar os tipos dos BVDVs amplificados, sendo necessário o sequenciamento das amostras positivas para determinação do tipo viral.

A determinação da especificidade dos oligonucleotídeos projetados foi realizada em teste *in silico*. As sequências dos oligonucleotídeos foram submetidas ao NCBI Primer-BLAST (YE et al., 2012). Os resultados das análises do programa mostraram que os oligonucleotídeos projetados hibridizam somente com sequências de genomas de membros do gênero *Pestivirus* (BVDV e border disease vírus, BVD). Esse resultado confirmou o potencial desses oligonucleotídeos para serem utilizados para a detecção

dos três tipos de BVDV enfocados neste estudo. A variação do tamanho do fragmento amplificado para cada espécie de BVDV foi mínima, de acordo com os dados gerados pelo Primer-BLAST (YE et al., 2012), já que a região 5' UTR é uma região bastante conservada entre as espécies de BVDV.

Para a determinação da especificidade dos oligonucleotídeos *in vitro*, DNA e cDNA de vírus comumente associados a doenças de bovinos foram utilizados (vide Material e métodos). Nenhum dos cDNA e DNA utilizados gerou amplificação na PCR.

3.3 PCR em tempo real (qPCR) em amostras de soro de búfalos

O RNA total das 176 amostras de soros foi submetido à transcrição reversa e utilizado para a detecção de genomas de BVDV com qPCR. Dentre as amostras examinadas, cinco (2,8 %) permitiram amplificação de genomas de possíveis pestivírus, dando origem a uma curva de amplificação com temperaturas de dissociação próximas a das amostras utilizadas como controle positivo (plasmídeo contendo fragmentos de BVDV 1, 2 e 3 clonados). O produto de amplificação dessas amostras foi submetido à eletroforese em gel de agarose 2 % para a confirmação do tamanho do fragmento amplificado (Figura 3).

As cinco amostras de BVDV amplificadas foram oriundas de três propriedades. Todos os animais que apresentavam genomas de BVDV no soro eram soronegativos ao teste de SN. As amostras que amplificaram foram clonadas em vetor procariótico e serão sequenciadas para a confirmação da infecção, determinação da espécie viral e relações filogenéticas entre outros isolados de BVDV de búfalos, bovinos e de outros ruminantes.

4 Discussão

O vírus da diarreia viral bovina (BVDV) é um importante patógeno de ruminantes, que pode levar a problemas clínicos, incluindo perdas reprodutivas. No Brasil, a prevalência de anticorpos para o BVDV em rebanhos bovinos é elevada, embora varie significativamente de região para região (8-73 %) (FLORES et al., 2005). Frequentemente os rebanhos bubalinos são mantidos próximos ou mesmo associados a bovinos, o que pode ocasionar infecções cruzadas entre esses animais. Anticorpos específicos contra o BVDV foram encontrados em uma grande variedade de espécies, incluindo animais de produção, domésticos e selvagens (HAMBLIN & HEDGER, 1979), porém a relevância epidemiológica desses achados permanece incerta. Infecções por BVDV em búfalos são conhecidas desde os anos 60 (PLOWRIGHT, 1969; HAMBLIN & HEDGER, 1979). Apesar de serem bastante limitadas, evidências sorológicas da infecção pelo BVDV em búfalos já foram relatadas no Paquistão (AKHTAR & ASIF, 1996), Egito (ZAGHAWA, 1998; GHAZI et al., 2008), Índia (SUDHARSANA et al., 1999), Irã (HAJIKOLAEI et al., 2008) e Itália, (RONCORONI et al., 2007) com índices de soropositividade variando de 13 % a 70 %.

No presente estudo, a presença de anticorpos para o BVDV foi detectada em todas as propriedades analisadas, variando de 5,3 a 23,1%. Das 176 amostras de soros analisadas, 19 (10,8 %) apresentaram anticorpos neutralizantes reagentes com a amostra “Oregon C24V” de BVDV utilizada no teste. Estes resultados indicam que, em algum momento, a população bubalina analisada neste estudo foi exposta ao agente. No Brasil, a presença de anticorpos contra o BVDV em búfalos foi relatada por Lage e colaboradores (1996), os quais encontraram anticorpos em 52,7 % da população avaliada no Estado de Minas Gerais. Em outro estudo com bubalinos provenientes do estado de São Paulo, anticorpos foram detectados em 12,9% das amostras analisadas (MARTINS et al., 2012). Esses resultados sugerem a circulação do BVDV nas propriedades analisadas.

A qPCR desenvolvida nesse trabalho mostrou-se eficiente na amplificação dos isolados de BVDV1, BVDV2 e BVDV3, com sensibilidade de 10 moléculas/equivalentes de genoma por reação para BVDV1 e BVDV2 e de 100 moléculas para BVDV3. Foi específica, tanto em ensaios *in silico* quanto em ensaios *in vitro*. Até o presente, nenhum ensaio havia sido desenvolvido que detectasse, com um único par de oligonucleotídeos, genomas dos três tipos conhecidos de BVDV. Essa qPCR, portanto, poderá vir a ser uma importante ferramenta para o diagnóstico de

infecções por *Pestivirus*, não somente em bubalinos como também – e principalmente em bovinos ou outros ruminantes, já que é mais rápida que os testes de isolamento viral e altamente sensível e específica.

A presença de genomas virais de BVDV em búfalos foi relatada na Argentina (CRAIG et al., 2008), em fetos abortados na Itália (MARTUCCIELLO et al., 2009; GIAMMARIOLI et al., 2008), em soros fetais e de animais com doença das mucosas na Austrália (BECHER et al., 1997) e nas Filipinas (MINGALA et al., 2009). Nesses estudos, todos os isolados foram caracterizados como BVDV1. No Brasil, apenas uma amostra de BVDV foi isolada de búfalo, sendo caracterizada como BVDV3 (pestivírus atípico) (STALDER et al., 2005). Entretanto, até o presente, nenhum estudo buscou a presença de genomas virais em soros de animais assintomáticos. Este estudo relata a presença de cinco animais que continham genomas no soro (2,8 %), podendo-se tratar de animais persistentemente infectados (PI), embora testes confirmatórios sejam requeridos para sustentar essa hipótese. Em bovinos, estima-se que a prevalência de animais PIs nos rebanhos seja em torno de 1 % (HOUE, 2003). Aparentemente, a quantidade de animais PI neste estudo foi maior do que a encontrada em bovinos. A escassez de informações sobre as condições sanitárias da espécie bubalina pode justificar essa possível ocorrência. Além disso, frequentemente, búfalos são criados próximos ou em associação com bovinos, todavia não são inclusos nos programas de controle de enfermidades de bovinos. Talvez isso ocorra devido a baixa frequência de bubalinos clinicamente afetados, como pode ser observado neste estudo, onde búfalos aparentemente saudáveis, provenientes de rebanhos sem histórico clínico foram identificados portadores de anticorpos neutralizantes contra o BVDV e material genético do vírus.

5 Referências

- AHMAD, A. et al. Prevalence of Bovine Viral Diarrhea Virus Persistency in 12 Holstein Cattle Dairy Herds of Charlottetown, Canada. **Pakistan Journal of Zoology**, v. 43, n. 2, p. 255-261. 2011.
- AKHTAR, S. & ASIF, M. Epidemiologic association between antibody titres against bovine virus diarrhoea virus, rinderpest disease virus and infectious bovine rhinotracheitis virus in a buffalo herd. **Tropical Animal Health Production**, v. 28, p. 207-212. 1996.
- ARENHART, S. et al. Excreção e transmissão do vírus da diarreia viral bovina por bezerros persistentemente infectados. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, p. 736-742. 2009.
- BECHER, P. Phylogenetic analysis of pestiviruses from domestic and wild Ruminants. **Journal of General Virology**, v. 78, p. 1357-1366. 1997
- BRITO, W. M. E. D. et al. Prevalência da infecção pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV) no Estado de Goiás, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 39, n. 1, p. 7-19. 2010.
- BROCK, K.V. The many faces of bovine viral diarrhoea virus. **The Veterinary Clinic of North America: Food Animal Practice**, v. 20, p. 1-3. 2004.
- COLLEN, T. & MORRISON, W.I. CD4+ T-cell responses to bovine viral diarrhoea virus in cattle. **Virus Research**, v. 67, p. 67-80. 2000.
- COLLETT, M.S. et al. Recent advances in pestivirus research. **Journal of General Virology**, v. 70, p. 253-266. 1989.
- CRAIG, M.I. et al. Detection of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) nucleic acid and antigen in different organs of water buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Research in Veterinary Science**, v. 85, p. 194-196. 2008.
- DONIS, R. Molecular biology of bovine viral diarrhoea virus and its interactions with the host. **Veterinary Clinical**, v. 11, p. 393-421. 1995.
- DUBOVI, E.J. Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhoea virus. **Biologicals**, v. 41, p. 8-13. 2013.
- DRUMMOND, A. et al. 2011. **Geneious**, v.5, n. 4. Disponível em: <http://www.geneious.com/> Acesso em: Dez 2012.
- EDGAR, R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, v. 32, p. 1792-1797. 2004.
- FLORES, E. et al. A infecção pelo vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) no Brasil - histórico, situação atual e perspectivas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, n. 3, p. 125-134. 2005.

FRAY, M.D. et al. The effects of bovine viral diarrhoea virus on cattle reproduction in relation to disease control. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 615-627. 2000.

FRASER, G. C. et al. Isolation of a probable pestivirus from a goat. **Australian Veterinary Journal**, v. 57, p.197-198. 1981.

FRESHNEY, I. *Animal Cell Culture: A Practical Approach*, 2nd ed. Oxford University Press, Oxford, 329 p. 1992.

GIAMMARIOLI, M. Genetic diversity of Bovine viral diarrhoea virus 1: Italian isolates clustered in at least seven subgenotypes. **Journal of veterinary Diagnostic Investigation**, v. 20, p. 783-788. 2008.

GILLESPIE, J. H. et al. A cytopathogenic strain of virus diarrhoea virus. **Cornell Veterinarian**, v. 50, p.73-79, 1960.

GROOMS, D.L. Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhoea virus. **The Veterinary Clinic of North America: Food Animal Practice**, v. 20, p. 5-19. 2004.

HAMBLIN, C. & HEDGER, R. S. The prevalence of antibodies to bovine viral diarrhoea/mucosal disease virus in African wildlife. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Disease**, v.2, p. 295-303. 1979.

HOUE, H. et al. Comparison of the prevalence and incidence of infection with bovine virus diarrhoea virus (BVDV) in Denmark and Michigan and association with possible risk factors. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 36, p. 521-531. 1995.

HOUE, H. Economic impact of BVDV infection in dairies. **Biologicals**, v. 31, p. 137-143. 2003.

HORZINEK M.C. Pestivirus: taxonomic perspectives. **Archives of Virology**, v. 3, p. 1-5. 1991.

LAGE, A. P. et al. Prevalence of antibodies to blue tongue, bovine herpes virus 1 and bovine viral diarrhoea/mucosal disease viruses in water buffaloes in Minas Gerais State, Brazil. **Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux**, v.49, p. 195-197. 1996.

LIU, L. et al. Phylogeny, classification and evolutionary insights into pestiviruses. **Virology**, v. 385, p. 351-357.2009.

MARTINS, M. S. N. et al. Infection of buffaloes of state of Sao Paulo/Brazil by BoHV-1 and BVDV. In: XXIII Brazilian Congress of Virology & VII Mercosur Meeting of Virology, Veterinary Virology, v. 17, n. 2, p. 107. 2012.

MARTUCCIELLO, A. et al. Detection of Bovine viral diarrhoea virus from three water buffalo fetuses (*Bubalus bubalis*) in southern Italy. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 21, p. 137-140. 2009.

MINGALA, C.N. Comparative moleculo-immunological analysis of swamp - and riverine - type water buffaloes responses. **Cytokine**, v. 46, n. 2, p. 273-282, 2009

NETTLETON, P.F. Pestivirus infections in other ruminants than cattle. **Revue Scientifique et Technique: Office International des Epizoties**, v. 9, p. 131-145. 1990

OLIVEIRA, I. G. et al. Presença de pestivírus e anticorpos contra pestivírus em soros e cultivos celulares. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 48, n. 5, p. 513-521. 1996.

OLIVEIRA, M.C. et al. Infecção pelo vírus da diarreia viral bovina em vacas gestantes abatidas no Estado de São Paulo-Brasil. **Medicina Veterinária**, v. 6, n. 2, p. 10-17. 2012.

PELLERIN C. et al. Identification of a new group of bovine viral diarrhoea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. **Virology**, v. 203, p. 260-267. 1994.

PLOWRIGHT, W. Other virus diseases in relation to the J. P. 15 programme. In: **Joint Campaign Against Rinderpest**. First Technical Review Meeting, Phase IV, Mogadiscio, Kenya. 1969. p. 19-23.

RIDPATH, J. et al. Segregation of Bovine Viral Diarrhoea Virus into genotypes. **Virology**, v. 205, p. 66-74. 1994.

ROEHE, P. M. Studies on the comparative virology of pestiviruses. 1991. Tese (Doutorado em virologia) – University of Surrey, Surrey, Inglaterra, 1991.

RONCORONI, C. Serological survey and reproductive performances in buffaloes under fixed time artificial insemination. **Italian Journal of Animal Science**, v. 6, p. 828-831. 2007.

SOLIS-CALDERON, J.J. et al. Bovine viral diarrhoea virus in beef cattle herds of Yucatan, Mexico: seroprevalence and risk factors. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 72, p. 253-262. 2005.

SUDHARSHANA, K. J.; SURESH, K. B. & RAJASEKHAR, M. Prevalence of bovine viral diarrhoea virus antibodies in India. **Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)**, v. 18, p. 667-671. 1999.

SCHIRRMIEIER, H. et al. Genetic and antigenic characterization of an atypical pestivirus isolate, a putative member of a novel pestivirus species. **Journal of General Virology**, v. 85, p. 3647-3652. 2004.

STALDER, H.P. et al. Genetic heterogeneity of pestiviruses of ruminants in Switzerland. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 72, p. 37-41. 2005.

THIEL, H.J.; PLAGEMANN, P. G. W. & MOENNIG, V. *Pestiviruses*. In: **FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M. & HOWLEY, P. M. (Eds) Fields Virology (3rd ed.)**, Philadelphia: Lippincott-Raven Co., 1996. p.1059-1074.

YE, J. et al. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. **BMC bioinformatics**, v. 13, n. 134. 2012.

ZAGHAWA, A. Prevalence of antibodies to bovine viral diarrhea virus and/or border disease virus in domestic ruminants. **Zentralbl Veterinarmed B**, v. 45, p. 345-351. 1998.

Tabela 1- Número de sequências utilizadas nos alinhamentos para a construção dos primers pan-BVDV.

| BVDV | 5' UTR | | Genomas completos | |
|--------------|---------------|----------|--------------------------|----------|
| | N° | % | N° | % |
| BVDV1 | 1697 | 60.85 | 40 | 1.43 |
| BVDV2 | 137 | 45.36 | 26 | 8.61 |
| BVDV3 | 34 | 53.13 | 6 | 9.38 |
| Total | 1868 | | 72 | |

Tabela 2 - Resultados obtidos no teste de soroneutralização frente ao vírus da diarreia viral bovina em amostras de soro bubalino oriundas do Estado do Rio Grande do Sul

| Propriedade | Número de soros testados | Número soros positivos | Percentual de soros positivos (%) |
|--------------------|---------------------------------|-------------------------------|--|
| CAV | 38 | 2 | 5,3 |
| MV | 94 | 8 | 8,5 |
| FA | 18 | 3 | 16,7 |
| RSM | 26 | 6 | 23,1 |
| Total | 176 | 19 | 10,8 |

Figura 1- Curvas de amplificação e gráfico de amplificação das amostras ICEL-A (BVDV1) (A), Soldan (BVDV2) (B) e 1.10 (BVDV3) (C). Diluições seriadas dos plasmídeos com fragmentos genômicos de BVDV1, BVDV2 e BVDV3 (10^9 até 10^1) foram testadas em triplicata. Os dados estão apresentados nos gráficos abaixo. O limite de detecção para BVDV1 e BVDV2 foi de 10 moléculas por reação. Para o BVDV3, o limite foi de 100 moléculas.

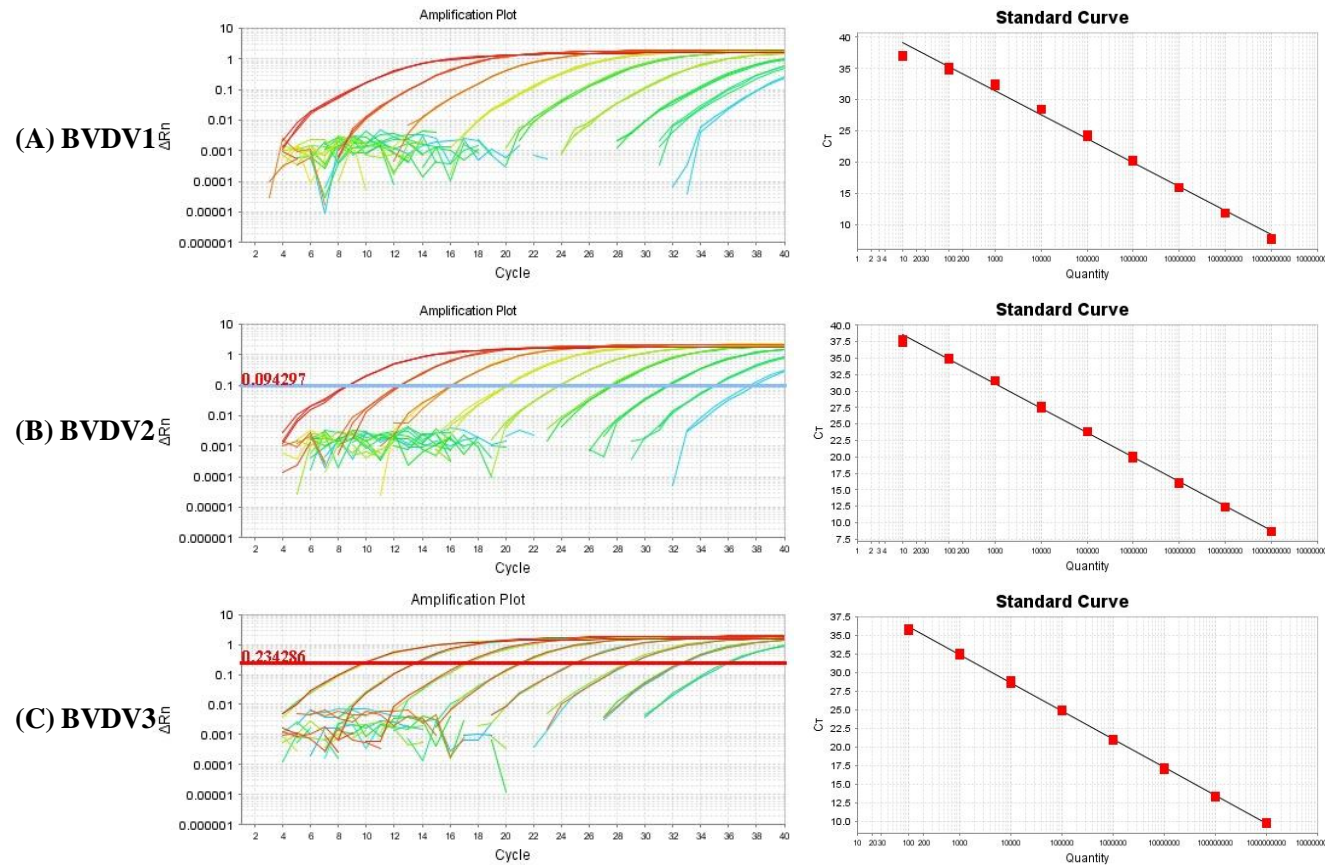
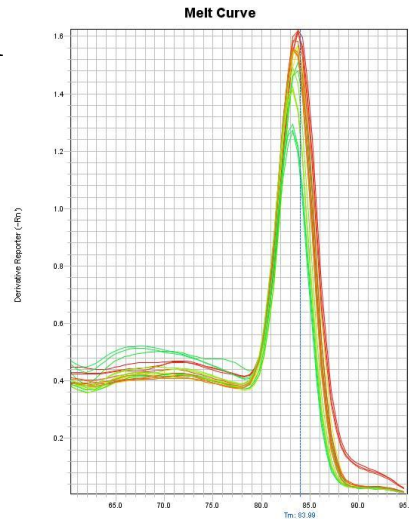
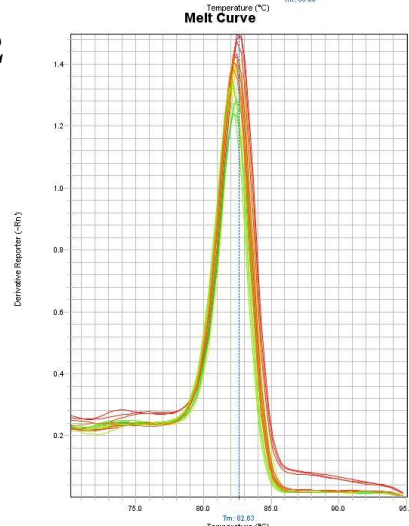


Figura 2 - Curva de dissociação das curvas padrão de BVDV1 (A), BVDV2 (B) e BVDV3 (C). Após os 40 ciclos de amplificação, as amostras foram submetidas a aumentos graduais de temperatura (0,3 °C, de 60 °C até 95 °C) e aquisição de fluorescência. É notado um único pico de dissociação nos gráficos, mostrando a especificidade da amplificação.

(A) BVDV1



(B) BVDV2



(C) BVDV3

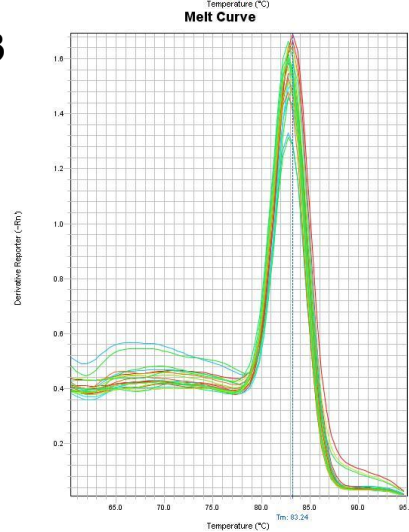
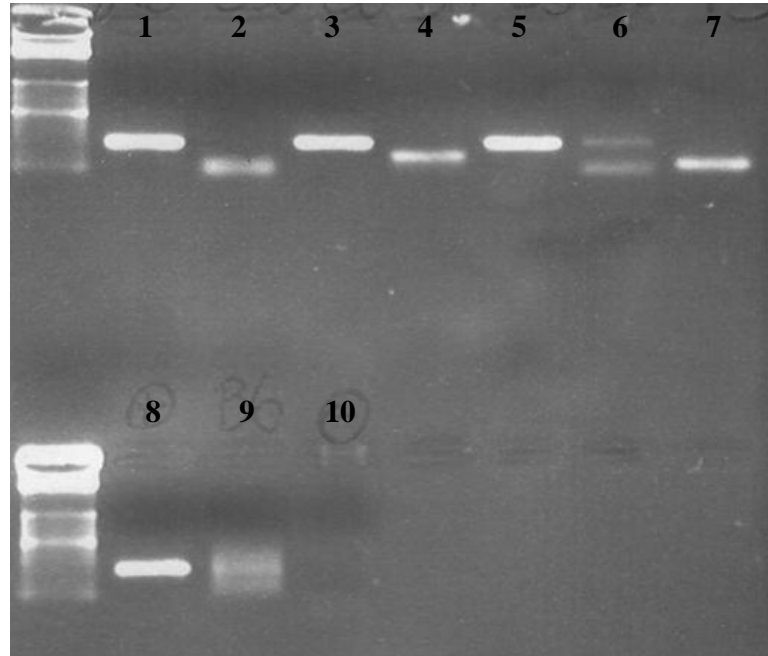


Figura 3 - Eletroforese em gel de agarose das cinco amostras positivas para BVDV em amostras de soro de búfalos. Linha 1, marcador de peso molecular (50 pb, Invitrogen), linhas 1, 3, 5, 6 e 9, amplificados de soro bubalino, linha 8, controle positivo (BVDV2, amostra Soldan). Linha 2, 4, 7 e 10, controles negativos (cDNA a partir de RNA extraído de células MDBKs livres de BVDV e cDNA proveniente de sêmens negativos).



4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesta dissertação foram realizados estudos objetivando evidenciar a circulação de herpesvírus e pestivírus em bubalinos e esclarecer determinados aspectos da epidemiologia destas infecções, bem como buscando otimizar os métodos de detecção dos mesmos. Na primeira etapa, buscou-se a identificação de anticorpos contra herpesvírus em búfalos, através do teste de soroneutralização. Na inexistência de uma amostra padrão para testes em soros de bubalinos, a SN foi executada frente a diferentes amostras de herpesvírus como vírus de desafio. Assim, 339 amostras de soro bubalino foram testadas frente às amostras LA (BoHV-1.1), A663 (BoHV-5) e b6 (BuHV-1). Adicionalmente, na busca de um (ou mais) vírus de desafio que revelasse maior sensibilidade à SN (ou seja, que apresentasse capacidade de detectar o maior número possível de soropositivos), 108 soros foram selecionados (em função dos volumes de amostra disponíveis) e testados frente a outros dois subtipos de BoHV-1 (EVI 123/98 e SV 265/96), em consonância com provas executadas previamente em nosso grupo com soros bovinos (HOLZ et al., 2010; VARELA et al., 2010). Observou-se que, quando tomados os resultados obtidos isoladamente frente a cada um dos vírus, a amostra de BoHV-1.2a SV265/96 foi a que apresentou maior sensibilidade dentre todas as avaliadas como vírus de desafio. Independente do fato de não ter sido possível identificar o vírus (ou os vírus) que efetivamente induziram a resposta imune detectada nos animais em teste, a amostra que apresentou maior sensibilidade nesse sentido foi a SV265/95, que permitiu a identificação de resposta sorológica em 54 das 108 amostras testadas (50%). No entanto, o maior número de soros positivos foi revelado pela soma dos resultados positivos obtidos com as cepas LA, SV265/96 e A663, que identificaram 58 amostras positivas nas 108 examinadas (53,7%). Estas cepas somadas foram significativamente mais sensíveis, quando comparadas com as cepas LA, EVI123/98, A663 e b6, analisadas individualmente e com a soma dos resultados positivos das cepas LA+EVI123/98; EVI123/98+A663; EVI123/98+b6; A663+b6; EVI123/98+A663+b6.

Assim, embora tenha sido possível demonstrar a circulação de herpesvírus nas populações bubalinas examinadas, não foi possível diferenciar, através da técnica de SN, qual o vírus efetivamente indutor dessa resposta imune. Estudos futuros deverão ser realizados buscando executar a titulação de anticorpos contra diferentes amostras, na tentativa de discriminar o agente causador da infecção através de diferenças em títulos de anticorpos neutralizantes. Estudos similares previamente realizados por nosso grupo com soros bovinos (TEIXEIRA et al, 1998), titulações de anticorpos neutralizantes

igualmente não foram capazes de diferenciar os agentes efetivamente implicados nas infecções.

Na segunda etapa do presente projeto foi realizada uma pesquisa sobre a ocorrência de infecções pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV) em búfalos. Através de testes de SN frente à amostra Oregon C24V de BVDV-1, buscou-se identificar inicialmente a presença de anticorpos neutralizantes contra pestivírus em soros dos animais em teste. Amostras soropositivas puderam ser detectadas em 19 de 176 soros examinados (10,8 %), evidenciando a circulação de pestivírus em búfalos. Uma vez constatada circulação viral e, na incerteza em relação ao nível de reatividade cruzada que diferentes amostras de pestivírus pudessem induzir em bubalinos, foi feita a opção pela pesquisa de genomas virais nas amostras de soro. Para tanto, foi desenvolvida uma PCR em tempo real quantitativa (qPCR), capaz de detectar genomas dos três tipos virais conhecidos de BVDV (1, 2 e 3). Cinco animais continham genomas no soro (2,8 %). Embora não tenha sido possível isolar os vírus causadores destas infecções, presume-se que estes animais podem encontrar-se em estado análogo ao de bovinos persistentemente infectados (PI), os quais são importantes perpetuadores e disseminadores da infecção naquela espécie (RIDPATH et al., 2012). No andamento destes estudos, testes confirmatórios, incluindo tentativas de isolamento viral, serão necessários para avaliar com mais profundidade a ocorrência de animais portadores de genomas de pestivírus circulantes em bubalinos. Infelizmente, devido a limitações de tempo, não foi possível executar o sequenciamento dos genomas identificados nestes animais. Não obstante, essa etapa será realizada em seguida, uma vez que os segmentos genômicos obtidos já foram encaminhados para sequenciamento. A análise das sequências obtidas deverá permitir uma avaliação mais apropriada dos agentes causadores dessas infecções.

Em conclusão, no presente estudo foi possível identificar que herpesvírus circulam em rebanhos bubalinos, embora até o presente não seja possível estabelecer qual ou quais os tipos de herpesvírus estariam efetivamente infectando estes animais, devido à acentuada reatividade sorológica cruzada induzida por estes vírus (tanto de origem bovina como de origem bubalina) em testes de SN.

Igualmente, as evidências obtidas indicam que pestivírus circulam em rebanhos bubalinos examinados. Análises subsequentes a serem realizadas na continuidade desses estudos deverão permitir um maior conhecimento da biologia destes agentes e suas interações com bubalinos como espécie hospedeira.

5 REFERÊNCIAS

- ACKERMANN, M.; BELAK, S. & BITSCH, V. Round table on infectious bovine rhinotracheitis/infectious vulvovaginitis virus infection diagnosis and control. **Veterinary Microbiology**, v. 23, p. 361-363. 1990.
- AHMAD, A. et al. Prevalence of Bovine Viral Diarrhea Virus Persistency in 12 Holstein Cattle Dairy Herds of Charlottetown, Canada. **Pakistan Journal of Zoology**, v. 43, n. 2, p. 255-261. 2011.
- AKHTAR, S. & ASIF, M. Epidemiologic association between antibody titres against bovine virus diarrhoea virus, rinderpest disease virus and infectious bovine rhinotracheitis virus in a buffalo herd. **Tropical Animal Health Production**, v. 28, p. 207-212. 1996.
- ALEGRE, M. et al. Development of a multiplex polymerase chain reaction for the differentiation of bovine herpesvirus-1 and -5. **Journal of Veterinary Medicine B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health**, v. 48, p. 613-621. 2001.
- AMOROSO, M.G. Bubaline herpesvirus 1 associated with abortion in a Mediterranean water buffalo. **Research in Veterinary Science**. Article in press. 2013.
- ARENHART, S. et al. Excreção e transmissão do vírus da diarreia viral bovina por bezerros persistentemente infectados. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, p. 736-742. 2009.
- ASHBAUGH, S.E. et al. Specific detection of shedding and latency of bovine herpesvirus 1 and 5 using a nested polymerase chain reaction. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 9, p. 387-394. 1997.
- BADIEI, K.; GHANE, M. & MOSTAGHNI K. Seroprevalence of Bovine Herpes Virus Type 1 in the Industrial Dairy Cattle Herds in Suburb of Shiraz-iran. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 4, n. 10, p. 4650-4654. 2010.
- BAKER, J. C. The clinical manifestations of bovine viral diarrhoea infection. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 11, p. 425-45. 1995.
- BARBOSA, A.C.V.C. et al. Soroprevalência e fatores de risco para a infecção pelo herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1) no Estado de Goiás, Brasil. **Ciência Rural**, v. 35, n. 6, p.1368-1373. 2005.
- BARENFUS, M. et al. Isolation of infectious bovine rhinotracheitis virus from calves with meningoencephalitis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 143, p. 725-728. 1963.
- BARTHA, A. et al. Occurrence of encephalitis caused by infectious bovine rhinotracheitis virus in calves in Hungary. **Acta Veterinaria Academiae Scientiarum Hungaricae**, v. 19, p. 145-151. 1969.

BECHER, P. Phylogenetic analysis of pestiviruses from domestic and wild Ruminants. **Journal of General Virology**, v. 78, p. 1357-1366. 1997.

BELÁK, S. & BALLAGI-PORDÁNY, A. Application of the polymerase chain reaction (PCR) in veterinary diagnostic virology. **Veterinary Research Communications**, v. 17, p. 55-72. 1993.

BIELANSKI, A. et al. Isolation of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) and bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in association with the *in vitro* production of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 40, p. 531-538. 1993.

BIELEFELDT-OHMANN, H. et al. Transplacental infection with non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus types 1b and 2: viral spread and molecular neuropathology. **Journal Comparative Pathology**, v. 138, n. 2-3, p. 72-85. 2008.

BITSCH, V. The P24-37 modification of the infectious bovine rhinotracheitis virus-serum neutralization test. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 19, n. 1, p. 497-505. 1978.

BOELAERT, F. et al. Risk factors for bovine herpesvirus-1 seropositivity. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 69, p. 285-295. 2005.

BOLIN, S.R. & RIDPATH, J.F. Assessment of protection from systemic infection or disease afforded by low to intermediate titers of passively acquired neutralizing antibody against bovine viral diarrhoea virus in calves. **American Journal of Veterinary Research**, v. 56, p. 755-759. 1995.

BOLIN, S.R. & RIDPATH, J.F. Prevalence of bovine viral diarrhoea virus genotypes and antibody against those viral genotypes in fetal bovine serum. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 10, p. 135-139. 1998.

BUSTIN, S.A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 25, n. 2, p. 169-193. 2000.

BUSTIN, S.A. et al. Quantitative real-time RT-PCR - a perspective. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 34, n. 3, p. 597-601. 2005.

BUONAVOGLIA, C. Reactivation of caprine herpesvirus 1 in latently infected goats. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Disease**, v. 19, p. 275-281. 1996.

BULACH, D.M. & STUDDERT, M.J. Comparative genome mapping of bovine encephalitis herpesvirus, bovine herpesvirus 1, and buffalo herpesvirus. **Archives of Virology**, v. 113, n. 1-2, p. 17-34, 1990.

BLACK, E.M. et al. A rapid RT-PCR method to differentiate six established genotypes of rabies and rabies-related viruses using TaqMan1 technology. **Journal of Virology Methods**, v. 105, n. 1, p. 25-35. 2002.

- BRAKE, F. & STUDDERT, M.J. Molecular epidemiology and pathogenesis of ruminant herpesviruses including bovine, buffalo and caprine herpesviruses 1 and bovine encephalitis herpesvirus. **Australian Veterinary Journal**, v. 62, p. 331-334. 1985.
- BRINKHOF, J. et al. Comparative study on four enzyme-linked immunosorbent assays and a cocultivation assay for the detection of antigens associated with the bovine viral diarrhoea virus in persistently infected cattle. **Veterinary Microbiology**, v. 50, p. 1-6. 1996.
- BRITO, W. M. E. D. et al. Prevalência da infecção pelo vírus da diarréia viral bovina (BVDV) no Estado de Goiás, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 39, n. 1, p. 7-19. 2010.
- BROCK, K. V. et al. Diagnosis of BVDV infections. **The Veterinary Clinic of North America, Food animal practice**, v. 11, p. 549-561. 1995.
- BROCK, K. V. et al. Changes in levels of viremia in cattle persistently infected with bovine viral diarrhea virus. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 10, p. 22-26. 1998.
- BROCK, K.V. & CORTESE, V.S. Experimental fetal challenge using type II bovine viral diarrhea virus in cattle vaccinated with modified-live virus vaccine. **Veterinary Therapeutics**, v. 2, p. 354-360. 2001.
- BROCK, K.V. The many faces of bovine viral diarrhea virus. **The Veterinary Clinic of North America: Food Animal Practice**, v. 20, p. 1-3. 2004.
- BRODERSEN, B. W. & KELLING, C. L. Effect of the concurrent experimentally induced bovine respiratory syncytial virus and bovine viral diarrhea virus infection in respiratory tract and enteric diseases in calves. **American Journal of Veterinary Research**, v. 59, p. 1423-1430. 1998.
- BROWNLIE, J. Pathogenesis of mucosal disease and molecular aspects of bovine virus diarrhoea virus. **Veterinary Microbiology**, v. 23, p. 371-82. 1990.
- BROWNLIE, J. The pathways for bovine virus diarrhoea virus biotypes in the pathogenesis of disease. **Archives Virology**, v.3, p. 79-96. 1991.
- BRUSCHKE, C.J.M. et al. The immune response of cattle, persistently infected with noncytopathic BVDV, after superinfection with antigenically semi-homologous cytopathic BVDV. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.62, p. 37-50. 1998.
- CAMPOS, F.S. et al. High prevalence of co-infections with bovine herpesvirus 1 and 5 found in cattle in southern Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 139, n. 1-2, p. 67-73. 2009.
- CANÁRIO, R. et al. Diarréia viral bovina: uma afecção multifacetada. **Veterinaria.com.pt**, v. 1, n. 2, 46 p. 2009. Disponível em:

<http://www.veterinaria.com.pt/media//DIR_27001/VPC-I-2-e6.pdf> Acesso em: 19 dezembro de 2012.

CANN, A.J. Expression. In: Principles of Molecular Virology 4th Ed. USA: Elsevier Academic Press, 2005. p. 140-143.

CARBONERO, A. et al. Seroprevalence and risk factors associated to Bovine Herpesvirus 1 (BHV-1) infection in non-vaccinated dairy and dual purpose cattle herds in Ecuador. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 100, n. 1, p. 84-88. 2011.

CARON, L. et al. Latent infection by bovine herpesvirus type-5 in experimentally infected rabbits: virus reactivation, shedding and recrudescence of neurological disease. **Veterinary Microbiology**, v.4, p. 285-295. 2002.

CARRILLO, B.J. et al. A Meningoencephalitis caused by IBR virus in calves in Argentina. **Zentralbl Veterinarmed B**, v. 30, n. 5, p. 327-332. 1983a.

CARRILLO, B.J.; POSPISCHIL, A.; DAHME, E. Pathology of a bovine viral necrotizing encephalitis in Argentina. **Zentralbl Veterinarmed B**, v. 30, n. 3, p. 161-168. 1983b.

CASCIO, K.E. et al. Encephalitis induced by bovine herpesvirus 5 and protection by prior vaccination or infection with bovine herpesvirus 1. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 11, p. 134-139. 1999.

CAVIRANI, S. et al. A serological survey of different bovine herpesviruses (BHV-1, BHV-2, BHV-4) in dairy buffaloes of southern and northern Italy. In: Proc. Fifth World Buffalo Congress, Caserta, Italy, 1997. p. 626-630.

CERQUEIRA, R.B. et al. Serological survey for bovine herpesvirus 1 in cattle from different regions in the state of Bahia, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 37, n. 6, p. 497-500. 2000.

COLLETT, M.S. et al. Recent advances in pestivirus research. **Journal of General Virology**, v. 70, p. 253-266. 1989.

COLLINS, J. K. et al. Antigenic differences between the major glycoproteins of bovine herpesvirus type 1.3. **Journal of General Virology**, v. 74, p. 1509-1517. 1993.

COLODEL, E.M. et al. Meningoencefalite necrosante em bovinos causada por herpesvirus bovino no estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 32, p. 293-298. 2002.

CORTEZ, A. et al. Comparação das técnicas de ELISA indireto e de soroneutralização na detecção de anticorpos contra o BHV-1 em amostras de soro bubalino (*Bubalus bubalis*). **Brazilian Journal of veterinary Research and animal Science**, v. 38, n. 3, p. 146-148. 2001.

COSTA, E.O. Influence of infections and infectious disease on buffaloes reproduction. In: Proc. First Buffalo Symposium of Americas, Pará, Brazil, 2002. p. 5-14.

CHAVES, N.P. et al. Frequência de anticorpos e fatores de risco para a infecção pelo vírus da diarreia viral bovina em fêmeas bovinas leiteiras não vacinadas na região amazônica maranhense, Brasil. **Ciência Rural**, v. 40, p. 1448-1451. 2010.

CHINCHKAR, S.R. et al. Seroprevalence of IBR in Maharashtra state. **Indian Veterinary Journal**, v. 79, p. 68-69. 2002.

CLAUS, M.P. et al. Rapid detection and differentiation of bovine herpesvirus 1 and 5 glycoprotein C gene in clinical specimens by multiplex- PCR. **Journal of Virological Methods**, v. 128, n.1-2, p. 183-188. 2005.

CRAIG, M.I. et al. Detection of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) nucleic acid and antigen in different organs of water buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Research in Veterinary Science**, v. 85, p. 194-196. 2008.

DAVISON, A.D. Herpesvirus systematics Veterinary. **Microbiology**, v.143, p. 52-69. 2010.

D'ARCE, R.C. et al. Restriction endonuclease and monoclonal antibody analysis of Brazilian isolates of bovine herpesviruses types 1 and 5. **Veterinary Microbiology**, v. 88, n. 4, p. 315-324. 2002.

DEBIASI, R.L. & TYLER, K.L. Molecular methods for diagnosis of viral encephalitis. **Clinical Microbiology Reviews**. V, 17, n. 4, p. 903-925. 2004.

DE CARLO, E. et al. Molecular characterisation of a field strain of bubaline herpesvirus isolated from buffaloes (*Bubalus bubalis*) after pharmacological reactivation. **Veterinary Record**, v. 154, p. 171-174. 2004.

DEKA, D. et al. Detection of bovine herpesvirus-1 infection in breeding bull semen by virus isolation and polymerase chain reaction. **Revue scientifique et technique: Office international Des Epizooties**, v. 24, n. 3, p. 1085-1094. 2005.

DEL FAVA, C.; PITUCO, M.E. & D'ANGELINO, L.J. Herpesvírus Bovino tipo 1 (HVB-1): revisão e situação atual no Brasil. **Continuous Education journal, CRMV-SP**, v. 5, p. 300-312. 2002.

DELHON, G. et al. Genome of bovine herpesvirus 5. **Journal of Virology**, v. 77, n. 19, p. 10339-10347. 2003.

DE PAULA, R.R. et al. Meningoencefalite causada pelo BHV-5 em um bovino no Estado de Goiás. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, p. 2. 2005.

DEREGT, D. Introduction and history. In: GOYAL, S.M.; RIDPATH, J.F. (Ed). Bovine viral diarrhea virus: diagnosis, management and control. Ames, IA: Blackwell Publishing, 2005. p. 3-34.

DIAS, L.E. et al. Rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) descrição de um quadro clínico em terneros de tambo. In: Anais III Congresso Nacional Veterinária, 1982,

Montevideo. Sociedad de Medicina Veterinaria Del Uruguay, Montevideo, 1982. p.521-530.

DIAS, M.M. **Análise da soroprevalência do herpesvírus bovino tipo 1 e do cortisol sérico em diferentes situações de manejo no Rio Grande do Sul.** 2006. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias)-Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

DIAS, F. C. et al. Ocorrência de anticorpos neutralizantes contra o BVDV-1 E o BVDV-2 em rebanhos bovinos de Minas Gerais e São Paulo, Brasil. **Ars Veterinaria**, Jaboticabal, SP, v.27, n.3, 161-167. 2011.

DIAS, J. A. et al. Seroprevalence and Risk Factors of Bovine Herpesvirus 1 Infection in Cattle Herds in the State of Paraná, Brazil. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 60, p. 39-47. 2013.

DONIS, R.O. Molecular biology of bovine viral diarrhea virus and its interactions with the host. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 11, p. 393-423. 1995.

D'OFFAY, J.M. et al. Isolation and characterization of encephalitic bovine herpesvirus type 1 isolates from cattle in North America. **American Journal of Veterinary Research**, v. 54, p. 534-539. 1993.

D'OFFAY, J.M.; FULTON, R.W. & EBERLE, R. Complete genome sequence of the NVSL BoHV-1.1 Cooper reference strain. **Archives of Virology**. 2012.

DUBOVI, E. J. Impact of bovine viral diarrhea virus on reproductive performance in cattle. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.10, p. 503-514.1994.

DUBOVI, E.J. Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhea virus. **Biologicals**, v. 41, p. 8-13. 2013.

EDWARDS, S.; WHITE, H. & NIXON, P. A study of the predominant genotypes of bovid herpesvirus 1 found in the UK. **Veterinary Microbiology**, v. 22, p. 213-223. 1990.

EDWARDS, S. et al. The virulence of British isolates of bovid herpesvirus 1 in relationship to viral genotype. **The British Veterinary Journal**, v. 143, n. 3, p. 216-231. 1991.

ELIAS, F.; SCHILD, A.L. & RIET-CORREA. Meningoencefalite e encefalomalácia por herpesvírus bovino-5: distribuição das lesões no sistema nervoso central de bovinos naturalmente infectados. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 24, p. 123-131. 2004.

ELY, R.W. et al. Bovine herpesviral encephalitis: a retrospective study on archived formalin-fixed, paraffin-embedded brain tissue. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 8, p. 487-492, 1996.

ENGELS, M. et al. Comparison of the genomes of infectious bovine rhinotracheitis and infectious pustular vulvovaginitis virus strains by restriction endonuclease analysis. **Archive of Virology**, v. 67, n. 2, p. 169-174. 1981.

ENGELS, M. et al. The genome of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) strains exhibiting a neuropathogenic potential compared to known BHV-1 strains by restriction site mapping and cross-hybridization. **Virus Research**, v. 6, p. 57-73. 1986.

ENGELS, M. & ACKERMANN, M. Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. **Veterinary Microbiology**, v. 53, p. 3-15. 1996.

ESTEVEZ, P.A. et al. Phylogenetic comparison of the carboxy-terminal region of glycoprotein C (gC) of bovine herpesviruses (BoHV) 1.1, 1.2 and 5 from South America (SA). **Virus Research**, v. 131, p. 16-22. 2008.

EVERMANN, J.F. & BARRINGTON, G.M. Bovine Viral Diarrhea Virus: Diagnosis, management and control. In: GOYAL S.M. & RIDPATH J.F. (Eds), **Clinical Features**, Blackwell Publishing, Iowa, 2005. p.105-129.

FAGIOLO, A. et al. Controlli sanitari in 21 allevamenti bufalini nella Regione Lazio. In: Proc. I° Congresso Nazionale sull'Allevamento Del Bufalo, 2001. p. 409-412.

FAGIOLO, A. & RONCORONI, C. Patologia nell'allevamento bufalino italiano - Italian buffalo breeding pathology. In: Proc. Secondo Congresso Nazionale sull'Allevamento del Bufalo, Monterotondo, Roma, 2003. p. 99-105.

FENNER, F.J. et al. Herpesviridae In: *Veterinary Virology*. San Diego: Academic Press, 1993. p. 337-368.

FIELDS, B.N. & KNIPE, D.M. **Virology**. New York: Raven Press, 1992, 2 v., 2419 p.

FUCHS, M. et al. Detection of bovine herpesvirus type 1 in blood from naturally infected cattle by using a sensitive PCR that discriminates between wild-type virus and virus lacking glycoprotein E. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 2498-2507. 1999.

FURUOKA, H. et al. Bovine herpesvirus meningoencephalitis association with infectious bovine rhinotracheitis (IBR) vaccine. **Acta Neuropathologica**, v. 90, p. 565-571. 1995.

FLORES, E.F. et al. Phylogenetic analysis of Brazilian bovine viral diarrhea virus type 2 (BVDV-2) isolates: evidence for a subgenotype within BVDV-2. **Virus Research**, v. 87, p. 51-60. 2002.

FLORES, E. et al. A infecção pelo vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) no Brasil - histórico, situação atual e perspectivas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, n. 3, p. 125-134. 2005.

FRANCO, A.C.; ROEHE, P.M. & VARELA, A.P.M. Herpesviridae, In: FLORES, E.F., *Virologia Veterinária*, Santa Maria-RS, Ed. Da UFSM, cap. 18, p. 503-570. 2012.

- FRAY, M.D. et al. The effects of bovine viral diarrhea virus on cattle reproduction in relation to disease control. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 615-627. 2000.
- FRENCH, E.L. A specific virus encephalitis in calves: isolation and characterization of the causal agent. **Veterinary Journal**, v. 38, p. 216-221. 1962.
- GALIERO, G. Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR), a complex of diseases concerning also buffaloes. **Bubalus bubalis**, v. 2, p. 29-31. 1998.
- GALIERO, G.; GIORDANELLI, M. P. & FRAULO, P. Infectious bovine rhinotracheitis (IBR) - note 1: serum epidemiological survey in buffalo herds of Southern Italy. **Bubalus Bubalis**, v. 4, p. 69-74. 2001.
- GARDINER, M.R.; NAIRN, M.E. & SIER, M. Viral meningoencephalitis of calves in Western Australia. **Australian Veterinary Journal**, v.40, p. 225-228. 1964.
- GEORGE, L.W. Understanding the encephalitic form of infectious bovine rhinotracheitis. **Food Animal Practice**, p. 335-337. March, 1991.
- GENBANK. National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>> Acesso em: 12 de setembro de 2012.
- GERSHON, A.A. et al. Intracellular transport of newly synthesized varicella-zoster virus: final envelopment in the trans-Golgi network. **Journal of Virology**, v. 68, p. 6372-6390. 1994.
- GIBBS, E.P. & RWEYEMAMU, M.M. Bovine herpesviruses. Part I. Bovine herpesvirus 1. **The Veterinary Bulletin**, v. 47, p. 317-343. 1977.
- GOENS, D.S. The evolution of bovine viral diarrhea: a review. **Canadian Veterinary Journal**, v. 43, p. 945-954. 2002.
- GOGORZA, L.M. et al. Detection of bovine viral diarrhea virus (BVDV) in seropositive cattle. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 72, p. 49-54. 2005.
- GOUGH, A. & JAMES, D. Isolation of IBR virus from a heifer with meningoencephalitis. **Veterinary Journal**, v. 16, p. 313-314. 1975.
- GUARINO, H. et al. Prevalence of serum antibodies to bovine herpesvirus-1 and bovine viral diarrhea virus in beef cattle in Uruguay. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 85, n. 1-2, p. 34-40. 2008.
- GRAHAM, D.A. et al. Standardization of enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) for quantitative estimation of antibodies specific for infectious bovine rhinotracheitis virus, respiratory syncytial virus, parainfluenza-3 virus, and bovine viral diarrhea virus. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v.9, p. 24-31, 1997.

GRAHAM, D.A. et al. Antibody responses of naïve cattle to two inactivated bovine viral diarrhoea virus vaccines, measured by indirect and blocking ELISAs and virus neutralisation. **Veterinary Record**, v. 152, p. 795-800. 2003.

GRANZOW H. et al. Egress of alphaherpesviruses: comparative ultrastructural study. **Journal of Virology**, v. 75, p. 3675–3684. 2001.

GRÉGIO, C.R. et al. Profile of neutralizing serum antibodies against infectious bovine rhinotracheitis virus in cattle in Rio de Janeiro state. **Virus Reviews & Research**, v. 3, p. 77 (A07). 2000.

GROM, J. et al. Molecular detection of BHV-1 in artificially inoculated semen and in the semen of a latently infected bull treated with dexamethasone. **The Veterinary Journal**, v. 171, p. 539-544. 2006.

GROOMS, D.L. et al. Fetal protection against continual exposure to bovine viral diarrhoea virus following administration of a vaccine containing an inactivated bovine viral diarrhoea virus fraction to cattle. **American Journal of Veterinary Research**, v.68, n. 12, p.1417-1420. 2007.

HAGE, J.J. et al. Sheep do not have a major role in bovine herpesvirus 1 transmission. **Veterinary Microbiology**, v. 30, p. 41-54. 1997.

HALFEN, D.C. & VIDOR, T. Infecção por herpesvírus bovino 1 e herpesvírus bovino 5. In: RIET-CORREA, F. et al. **Doenças de ruminantes e equinos**. Universitária, UFPEL, pelotas, 1998. p. 82-91.

HAMBLIN, C. & HEDGER, R. S. The prevalence of antibodies to bovine viral diarrhoea/mucosal disease virus in African wildlife. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Disease**, v.2, p. 295-303. 1979.

HAMERS, C. et al. Diversity among bovine pestiviruses: a review. **Veterinary Journal**, v. 161, p.112-122. 2001.

HANSEN, T.R. et al. Maternal and fetal response to fetal persistent infection with bovine viral diarrhoea virus. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 64, p. 295-306. 2010.

HOFFMANN, B. et al. A review of RT-PCR technologies used in veterinary virology and disease control: Sensitive and specific diagnosis of five livestock diseases notifiable to the World Organisation for Animal Health. **Veterinary Microbiology**, v. 139, n. 1-2, p. 1-23. 2009.

HOLZ, C.L. et al. Serum neutralization with different types and subtypes of bovine herpesvirus 1 and 5. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 7, p. 515-522. 2010.

HOLZ, C.L. et al. Soroprevalência de herpesvírus bovinos tipos 1 e/ou 5 no Estado do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 9. p. 767-773. 2009.

HOMAN, E.J. & EASTERDAY, B.C. Isolation of bovine herpesvirus 1 from trigeminal ganglia of clinically normal cattle. **American Journal of Veterinary Research**, v. 41, p. 1212-1213. 1980.

HOUE, H. et al. Comparison of the prevalence and incidence of infection with bovine virus diarrhoea virus (BVDV) in Denmark and Michigan and association with possible risk factors. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 36, p. 521-531. 1995.

HOUE, H. Economic impact of BVDV infections in dairies. **Biologicals**, v. 31, p. 137-143. 2003.

HOUSE J.A. & BAKER, J.A. Bovine herpesvírus IBR-IPV. The antibody virus neutralization reaction. **Cornell Veterinarian**, v. 61, p. 320-335. 1971.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo Agropecuário. Produção da Pecuária Municipal (PPM), v. 38, p. 1-65. 2010. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2010/ppm2010.pdf>> Acesso em: 19 de dezembro de 2012.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Comunicação social. 2012. Disponível em: <<http://saladeimprensa.ibge.gov.br/noticias>> Acesso em: 19 de dezembro de 2012.

ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. Disponível em: <<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2011>>. Acesso em 1 de outubro de 2012.

JACEVIČIUS, E. Five year serological study of bovine herpesvirus type-1 in cattle in Lithuania. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, v. 54, p. 289-292. 2010.

JAIN, V. et al. Seroprevalance of IBR among bovines of Garwal region. **Indian Veterinary Journal**, v. 83, p. 340-342. 2006.

JOHNSTON, L.A.Y.; SIMMONS, G.C. & MCGAVIN, M.D. A viral meningoencephalitis in calves. **Australian Veterinary Journal**, v. 38, p. 207-215. 1962.

JONES, C. & CHOWDHURY, S. A review of the biology of bovine herpesvirus type 1 (BHV-1), its role as a cofactor in the bovine respiratory disease complex and development of improved vaccines. **Animal Health Research Reviews**, v. 8, n. 2, p. 187-205. 2008.

KAASHOEK, M.J. Non essential glycoproteins gC, gG, gI and gE are expressed in all of 223 isolates of bovine herpesvirus 1. In: KAASHOEK, M.J. (Eds.), *Marker Vaccines Against Bovine Herpesvirus 1 Infections*. Ph.D. Thesis, Utrecht University. 1995.

KIRAN, K.K.; RAVI, P. & PRABHUDAS, K. Infectious bovine rhinotracheitis. National survey of IBR antibodies by ABELISA kit. Annual Report of Project Directorate on Animal Disease Monitoring and Surveillance, ICAR, Bangalore, 2005. p. 7-10.

KRAMPS, J.A. et al. A simple, specific, and highly sensitive blocking enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to bovine herpesvirus 1. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, p. 2175-2181. 1994.

KRAMPS J.A. et al. Evaluation of tests for antibodies against bovine herpesvirus 1 performed in national reference laboratories in Europe. **Veterinary Microbiology**, v. 102, p. 169-181. 2004.

KREY, T. et al. Crystal structure of the pestivirus envelope glycoprotein E(rns) and mechanistic analysis of its ribonuclease activity. **Structure**, v. 20, n. 5, p. 862-873. 2012.

LACKNER, T. et al. Temporal modulation of an autoprotease is crucial for replication and pathogenicity of an RNA virus. **Journal of Virology**, v. 78, p. 10765-10775. 2004.

LAGE, A. P. et al. Prevalence of antibodies to blue tongue, bovine herpes virus 1 and bovine viral diarrhoea/mucosal disease viruses in water buffaloes in Minas Gerais State, Brazil. **Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux**, v.49, p. 195-197. 1996.

LAZZARI F.C., BARTHOLOMEI L. & PICCININ A. Diarréia Viral Bovina. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n. 10, 4 p. 2008. Disponível em <<http://www.revista.inf.br/veterinaria10/revisao/edic-vi-n10-RL32.pdf>>. Acesso em: 28 de setembro de 2012.

LEMAIRE, M.; PASTORET, P.P. & THIRY E. Le contrôle de l'infection par Le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine. **Annales de Médecine Vétérinaire**, v. 138, p. 167-180. 1994.

LÉRTORA, W.J. Diarrea viral bovina: actualización. **Rev. Vet.**, v. 14, n. 1, p. 42-51. 2003.

LINDBERG, A. L. E. & ALLENIUS, S. Principles for eradication of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections in cattle populations. **Veterinary Microbiology**, v. 64, n. 2-3, p. 197-222. 1999.

LINDBERG, A. L. E. Bovine viral diarrhoea virus infections and its control - a review. **Vet. Q.**, v.25, p. 1-16. 2003.

LINDBERG, A. & HOUE, H. Characteristics in the epidemiology of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) of relevance to control. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 72, p. 55-73. 2005.

LINDENBACH B.D. & RICE C.M. Flaviviridae: The viruses and their replication, In: KNIPE, D.M. et al. (Ed.), **Fields Virology**. Lippincot Williams and Williams, Philadelphia, PA., USA, 2001. p.991-1042.

LINDENBACH, B.D.; THIEL, H.J. & RICE, C.M. Flaviviridae: the viruses and their replication, In: KNIPE, DAVID M., HOWLEY, PETER M., GRIFFIN, DIANE E.,

LAMB, ROBERT A., MARTIN, MALCOLM A., BERNARD, ROIZMAN, STRAUS, STEPHEN E. (Eds.). **Fundamental Virology**. Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 1001-1152.

MADIN, S. H.; YORK, R. J.; MCKERCHER, D. G. Isolation of the infectious bovine rhinotracheitis virus. **Science**, v. 124, n. 3225, p. 721-722, 1956.

MADINELLI, R. et al. Results of an investigation on the seroprevalence of BHV-1 virus in Verona and Vicenza provinces. **Atti della Societa Italiana di Buiatria**, v. 33, p. 205-210. 2001.

MAHONY, T. J. et al. Genetic analysis of bovine viral diarrhoea viruses from Australia. **Veterinary Microbiology**, v. 106, p. 1-6. 2005.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e abastecimento. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/bovinos-e-bubalinos>>. Acesso em: 19 de dezembro de 2012.

MARTINS, M. S. N. et al. Infection of buffaloes of state of Sao Paulo/Brazil by BoHV-1 and BVDV. In: XXIII Brazilian Congress of Virology & VII Mrcosur Meeting of Virology, Veterinary Virology, v. 17, n. 2, p. 107. 2012.

MARTUCCIELLO, A. et al. Detection of Bovine viral diarrhea virus from three water buffalo fetuses (*Bubalus bubalis*) in southern Italy. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 21, p. 137-140. 2009.

MÉDICI, K.C.; ALFIERI, A.A. & ALFIERI, A.F. Prevalência de anticorpos neutralizantes contra o herpesvírus bovino tipo 1, decorrentes de infecção natural, em rebanhos com distúrbios reprodutivos. **Ciência Rural**, v. 30, n. 2, p. 347-350. 2000.

MÉDICI, K.C. et al. Identification of antibodies against bovine virus diarrhea virus in beef and dairy cattle herds in Parana State. **Virus Rev. Res.**, v. 5, n. 1, p. 145. 2000.

MEHROTRA, M.L.; RAJYA, B.S. & KUMAR, S. IBR-keratoconjunctivitis in calves. **Indian Journal of Veterinary Pathology**, v. 1, p. 70-73. 1976.

MÉNDEZ, M.C. et al. Laboratório Regional de Diagnóstico, doenças diagnosticadas no ano 1986. Editora Universitária, Pelotas, 1987. 40p.

METTENLEITER, T. C. Initiation and spread of α -herpesvirus infections. **Trends in Microbiology**, v. 2, p. 2-4. 1994.

METTENLEITER, T.C. Herpesvirus assembly and egress. **Journal of Virology**, v. 76, n. 4, p. 1537-1547. 2002.

METTENLEITER, T.C. Budding events in herpesvirus morphogenesis. **Virus Research**, v. 106, p. 167-180. 2004.

METTENLEITER T.C.; KLUPP, B.G. & GRANZOW, H. Herpesvirus assembly: An update. **Virus Research**, v. 143, p. 222-234. 2009.

METZLER, A.E. et al. European isolates of bovine herpesvirus 1: a comparison of restriction endonuclease sites, polypeptides, and reactivity with monoclonal antibodies. **Archives of Virology**, v. 85, p. 57-69. 1985.

METZLER et al. Bovine Herpesvirus 1: Molecular and antigenic characteristics of variant viruses isolated from calves with neurological disease. **Archives of Virology**, v. 87, p. 205-217. 1986.

MEYERS, G. & THIEL, H.J. Molecular characterization of pestiviruses. **Advances in Virus Research**, v. 47, p. 53-118. 1996.

MEYER, G. et al. Comparative pathogenesis of acute and latent infections of calves with bovine herpesvirus types 1 and 5. **Archives of Virology**, v. 146, n. 4, p. 633-652. 2001.

MILLER, J.M. et al. Abortifacient property of BHV-1 isolates that represent three subtypes of determined by RE analysis of viral DNA. **American Journal of Veterinary Research**, v. 52, p. 458-461. 1991.

MISHRA, N. et al. Genetic and antigenic characterization of bovine viral diarrhoea virus type 2 isolated from Indian goats (*Capra hircus*). **Veterinary Microbiology**, v. 124, p. 340-347. 2007.

MISRA, V. et al. Protein and DNA elements involved in transactivation of the promoter of the bovine herpesvirus (BHV) 1 IE-1 transcription unit by the BHV alpha gene transinducing factor. **Journal of Virology**, v. 68, p. 4898-4909. 1994.

MOENNIG, V. & LIESS, B. Pathogenesis of intrauterine infections with bovine viral diarrhoea virus. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 11, p. 477-487. 1995.

MOLNÁR, E. et al. Prevalência da infecção pelo vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) em bubalinos e bovinos no estado do Pará, Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 25, n. 2, 2001.

MOLLEMA, L. Quantification of the transmission of bovine herpesvirus 1 among red deer (*Cervus elaphus*) under experimental conditions. **Veterinary Microbiology**, v. 111, p. 25-34. 2005.

MOORE, S.; GUNNA, M. & WALLSB, D. A rapid and sensitive PCR-based diagnostic assay to detect bovine herpesvirus 1 in routine diagnostic submissions. **Veterinary Microbiology**, v. 75, p. 145-153. 2000.

MUNCHOW, G. & PISARZ, M. 1994. Epidemiological studies of some economical significant infectious diseases in water buffaloes in the central Amazon region, Brazil. In: Proc. Fourth World Buffalo Congress, Sao Paulo, Brazil, 1994. p. 353-355.

MUYLKENS, B. et al. Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. **Veterinary Research**, v. 38, p. 181-209. 2007.

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

McMILLAN, T. & JOHNSON, D.C. Cytoplasmic domain of herpes simplex virus gE causes accumulation in the trans-Golgi network, a site of virus envelopment and sorting of virions to cell junctions. **Journal of Virology**, v. 75, p. 1928-1940. 2001.

NANDI, S. et al. Serological evidence of BHV-1 antibodies in cattle and buffalo from different states of India. **Indian Journal of Comparative Microbiology, Immunology and Infectious Diseases**, v. 25, p. 87-89. 2004.

NANDI, S. et al. Seroprevalence of infectious bovine rhinotracheitis in cattle of an organized farm by indirect ELISA. **The Indian Cow**, v. 7, p. 50-53. 2007.

NANDI, S. et al. Serological Evidences of Bovine Herpesvirus-1 Infection in Bovines of Organized Farms in India. **Transboundary and Emerging Diseases**. 2010. doi: 10.1111/j.1865-1682.2010.01185.x. Epub ahead of print

NAZARENKO, I.A.; BHATNAGAR, S.K. & HOHMAN, R.J. A closed tube format for amplification and detection of DNA based on energy transfer. *Nucleic Acids Res.* 25, 2516–2521.1997.

NEILL J.D. Molecular biology of bovine viral diarrhoea virus. **Biologicals**, v.41, p.2-7. 2013.

NISKANEN, R. & LINDBERG, A. Transmission of bovine viral diarrhoea virus by unhygienic vaccination procedures, ambient air, and from contaminated pens. **The Veterinary Journal**, v. 165, p. 125-130. 2003.

NOORDEGRAAF, A.V. et al. Evaluating control strategies for outbreaks in BHV1-free areas using stochastic and spatial simulation. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 44, p. 21-42. 2000.

NORONHA, R.; CAMPOS, S.G. & SARDI, S. Serum neutralization test and viral isolation for bovine viral diarrhoea virus in the state of Bahia. **Virus Rev. Res.**, v. 6, n. 1, p. 146. 2001.

OIE. Office International des Epizooties. International Animal Health Code. Manual of Standards. Disponível em: <<http://oie.int/norms/mmanual>>. Acesso em: 28 de setembro de 2012.

OKUDA, L.H. Inquérito soro-epidemiológico do herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) no município de Monte Negro, Estado de Rondônia, Brasil. In: *Biológico*, 2006, São Paulo. Resumo expandido, 2006, v.68.p.157-159.

OLIVEIRA, M.C. et al. Infecção pelo vírus da diarréia viral bovina em vacas gestantes abatidas no Estado de São Paulo-Brasil. **Medicina Veterinária**, v. 6, n. 2, p. 10-17. 2012.

OSORIO, F. Latency of bovine herpesvirus-1. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE HERPESVÍRUS BOVINO (TIPO 1 E 5) E VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA (BVDV), 1998, Santa Maria. Anais... Santa Maria, RS, 1998. p. 117-126.

PALFI, V. et al. Studies on the decline of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) maternal antibodies and detectability of BVDV in persistently infected calves. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.34, p. 105-107. 1993.

PASTORET, P.P. & THIRY, E. Diagnosis and prophylaxis of infectious bovine rhinotracheitis: the role of virus latency. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Disease**, v. 89, n. 1, p. 35-42. 1985.

PELLERIN C. et al. Identification of a new group of bovine viral diarrhea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. **Virology**, v. 203, p. 260-267. 1994.

PENNY, C.D. et al. Upper respiratory disease and encephalitis in neonatal beef calves caused by bovine herpesvirus type 1. **Veterinary Record**, v. 151, p. 89-91. 2002.

PÉREZ, S.E. et al. Retrospective analysis of cases with a diagnosis of cerebrocortical necrosis and its relation with type 5 bovine herpesvirus. **Revista Argentina Microbiología**, v. 35, n. 2, p. 69-73. 2003.

PESHEV, R. & CHRISTOVA, L. Study of bovine herpes virus 1 spreading among buffalo herds in Bulgaria. **Acta Virologica**, v. 44, p. 229-230. 2000.

PETERHANS, E. et al. Cytopathic bovine viral diarrhea viruses (BVDV): emerging pestiviruses doomed to extinction. **Veterinary Research**, v. 41, n. 6, 14 p. 2010.

PIDONE, C.L. et al. Restriction endonuclease analysis of BHV-1 and BHV-5 strains isolated in Argentina. **Journal of Veterinary Medicine B**, v. 46, n. 7, p. 453-456. 1999.

PILZ, D.; ALFIERI, A.F. & ALFIERI, A.A. Comparação de diferentes protocolos para a detecção do vírus da diarréia viral bovina por RT-PCR em grupos de sangue total e de soro sanguíneo, artificialmente contaminados. **Semina Ciências Agrárias**, v.26, p. 211-220. 2005.

PINTO, A.M.V.; ROMIJN, P.C. & SILVA, R.C.F. et al. Geographic distribution of BHV-5 in Rio de Janeiro state. In: NATIONAL MEETING OF VIROLOGY, 14., 2003, Florianópolis. Anais... São Paulo: Sociedade Brasileira de Virologia, 2003. p.141.

PITUCO E.M.; DEL FAVA C. & OKUDA L.H. Prevalência da infecção pelo vírus da diarréia bovina a vírus (BVD) em búfalos (*Bubalus bubalis*) no Vale do Ribeira, SP, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.64, n. 1, p. 23-28. 1997.

POLETTO, R. et al. Prevalência de tuberculose, brucelose e infecções víricas em bovinos leiteiros do município de Passo Fundo, RS. **Ciência Rural**, v. 34, n. 2, p. 595-598. 2004.

PHARANDE, R.R.; DESHMUKH, V. V. & M. B. GUJAR. Seroprevalence and Characterization Studies of Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus. In: 11th International Conference of the Association of Institutions for Tropical Veterinary Medicine and 16th Veterinary Association Malaysia Congress, 23-27., 2004. Sunway Pyramid Convention Centre, Petaling Jaya, 2004. P. 300-301.

QUINCOZES, C.G. et al. Prevalência e fatores associados à infecção pelo vírus da diarreia viral bovina na região Sul do Rio Grande do Sul. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 28, p. 269-276. 2007.

RAIZMAN, et al. Seroprevalence of infectious bovine rhinotracheitis and bovine viral diarrhoea virus type 1 and type 2 in non-vaccinated cattle herds in the Pacific Region of Central Costa Rica. **Tropical Animal Health and Production**, v. 43, n. 4, p. 773-778. 2011.

RANA, S.K. et al. Use the of real-time polymerase reaction to detect bovine herpesvirus 1 in frozen cattle and buffalo semen in India. **Veterinaria Italiana**, v. 47, n. 3, p. 313-322. 2011.

REED, D.E.; BICKNELL, E.J. & BURY, R.J. Systemic form of infectious bovine rhinotracheitis in young calves. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 163, p. 753-755. 1973.

REBORDOSA X. Glycoprotein E of bovine herpesvirus type 1 is involved in virus transmission by direct cell-to-cell spread. **Virus Research**, v. 45, p. 59-68. 1996.

RENUKARADHYA, G.J.; RAJASEKHAR, M. & RAGHAVAN, R. Prevalence of infectious bovine rhinotracheitis in southern India. **Revue Scientifique Technique**, v. 15, p. 1021-1028. 1996.

RIDPATH, J. et al. Segregation of Bovine Viral Diarrhoea Virus into genotypes. **Virology**, v. 205, p. 66-74. 1994.

RIDPATH, J.F. Phylogenetic, antigenic and clinical characterization of type 2 BVDV from North America. *Veterinary Microbiology*, v. 77, n. 1-2, p. 145-155. 2000.

RIDPATH, J. et al. Flaviviridae, In: FLORES, E.F., *Virologia Veterinária*, Santa Maria-RS, Ed. Da UFSM, cap. 23, p. 657-689. 2012.

RIDPATH, J.F. Immunology of BVDV vaccines. **Biologicals**, v. 41, n. 1, p.14-19. 2013.

RIET-CORREA, F. et al. Atividades do Laboratório Regional de diagnóstico e doenças da área de influência no período 1978-1982. Editora Universitária, Pelotas. 98p. 1983.

RIET-CORRÊA, F. et al. Meningoencefalite e necrose do córtex cerebral em bovinos causadas por herpesvírus bovino-1. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 9, n. 1-2, p. 13-16. 1989.

- RIET-CORREA, G. et al. Meningoencefalite e polioencefalomalacia causada por Herpesvírus bovino-5 no Estado do Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, p. 44-46. 2006.
- RIJSEWIJK, F.A. et al. Epitopes on glycoprotein C of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) that allow differentiation between BHV-1.1 and BHV-1.2 strains. **Journal of General Virology**, v. 80, p. 1477-1483. 1999.
- RISSI, D.R. et al. Epidemiologia, sinais clínicos e distribuição das lesões encefálicas em bovinos afetados por meningoencefalite por herpesvírus bovino-5. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, p. 123-132. 2006.
- RIXON, F. J. Structure and assembly of herpesviruses. **Seminars in Virology**, v. 4, p. 135-144. 1993.
- ROCHA, M.A. et al. A high sensitivity-nested PCR assay for BHV-1 detection in semen of naturally infected bulls. **Veterinary Microbiology**, v. 63, p. 1-11. 1998.
- ROCHA, M.A. et al. Pesquisa de anticorpos para IBR em amostragem de demanda no Estado de Minas Gerais, 1990-1999. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 6. 2001.
- ROEHE, P.M. et al. Diferenciação entre o vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (BHV-1) e o herpesvírus da encefalite bovina (BHV-5). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 17, p. 41-44. 1997.
- ROEHE, P.M. Comunicação pessoal. Fepagro Saúde Animal - Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, Virologia. Eldorado do Sul, 2012. E-mail proehe@gmail.com.
- ROELS, S. et al. Natural case of bovine herpesvirus 1 meningoencephalitis in an adult cow. **Veterinary Record**, v. 146, p. 586-588. 2000.
- ROIZMAN, B. & PELLETT, P.E. The family Herpesviridae: A brief introduction. In: KNIPE D.M., HOWLEY P.M. (Eds.) **Fields Virology**, 4th ed., Lippincott Williams and Wilkins publishers, Philadelphia, 2001, pp. 2381–2398.
- ROIZMANN, B. et al. The family Herpesviridae: an update. **Archives of Virology**, v. 123, p. 425-449. 1992.
- RONCORONI, C. Serological survey and reproductive performances in buffaloes under fixed time artificial insemination. **Italian Journal of Animal Science**, v. 6, p. 828-831. 2007.
- ROS, C. & BELAK, S. Studies of genetic relationships between bovine, caprine, cervine, and rangiferine alphaherpesviruses and improved molecular methods for virus detection and identification. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 1247-1253. 1999.

ROSSMANITH, W. et al. Improved antigen and nucleic acid detection in a bovine virus diarrhoea eradication program. **Veterinary Microbiology**, v. 81, p. 207-218, 2001.

ROXO, E. & PAULIN, L. Brucelose em búfalos. Centro de sanidade animal do Instituto Biológico, n. 169. 2012. Disponível em:
<http://www.biologico.sp.gov.br/artigos_ok.php?id_artigo=169>. Acesso em: 5 de outubro de 2012.

RUSH, D.M. et al. Descriptive epidemiology of postnatal bovine viral diarrhea virus infection in intensively managed dairy heifers. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 219, p. 1426-1431. 2001.

SALVADOR, S.W.C. et al. Meningoencefalite em bovinos causada por herpesvírus bovino-5 no Mato Grosso do Sul e São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 18, p.76-83. 1998.

SALWA, A; RULKA, J. & ARENT, Z. The prevalence of the mixed infection of BLV, BHV-1, BVD-MD in dairy herds. **Veterinary Medicine**, v. 56, p. 443-444. 2000.

SANDVIK, T. & KROGSRUD, J. Evaluation of an antigen-capture ELISA for detection of bovine viral diarrhea virus in cattle blood samples. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 7, p. 65-71. 1995.

SANDVIK, T. Selection and use of laboratory diagnostic assays in BVD control programmes. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 72, p. 3-16. 2005.

SANTURDE, G. et al. Rapid and high sensitivity test for direct detection of bovine herpesvirus-1 genome in clinical samples. **Veterinary Microbiology**, v. 49, p. 81-92. 1996.

SARRAZIN, S. Serological and virological BVDV prevalence and risk factor analysis for herds to be BVDV seropositive in Belgian cattle herds. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 108, n. 1, p. 28-37. 2013.

SILVA, A.D. et al. Vaccination with a gE-negative bovine herpesvírus type 1 vaccine confers insufficient protection to a bovine herpesvírus type 5 challenge. **Vaccine**, Netherlands, v. 24, p. 3313-3320, 2006.

SILVA-FRADE, C. et al. Effects of bovine Herpesvirus Type 5 on development of in vitro-produced bovine embryos. **Theriogenology**, v. 73, p. 324-331. 2010.

SILVA, M.C.O.P. Soroprevalência do herpesvírus bovino tipo 1 e 5 no estado de São Paulo, Brasil. 2011. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) - Instituto Biológico, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, São Paulo, 2011.

SILVA, M.S. et al. Molecular and antigenic characterization of Brazilian bovine herpesvirus type 1 isolates recovered from the brain of cattle with neurological disease. **Virus Research**, v. 129, p. 191-199. 2007.

- SIX, A. Latency and reactivation of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) in goats and of caprine herpesvirus 1 (CapHV-1) in calves. **Archives Virology**, v. 146, p. 1325-1335. 2001.
- SOLIS-CALDERON, J.J. et al. Seroprevalence of and risk factors for infectious bovine rhinotracheitis in beef cattle herds of Yucatan, Mexico. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 57, n. 4, p. 199-208. 2003.
- SOLIS-CALDERON, J.J. et al. Bovine viral diarrhoea virus in beef cattle herds of Yucatan, Mexico: seroprevalence and risk factors. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 72, p. 253-262. 2005.
- SOUZA, V.F. et al. Caracterização de herpesvírus bovinos tipos 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5) com anticorpos monoclonais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 22, n. 1, p.13-18, 2002.
- SUDHARSHANA, K. J.; SURESH, K. B. & RAJASEKHAR, M. Prevalence of bovine viral diarrhoea virus antibodies in India. **Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)**, v. 18, p. 667-671. 1999.
- SURESH, K. B.; SUDHARSHANA, K. J.& RAJASEKHAR, M. Seroprevalence of infectious bovine rhinotracheitis in India. **Indian Veterinary Journal**, v. 76, n. 1, p. 5-9, 1999.
- SCHILD A.L. et al. **Doenças diagnosticadas pelo Laboratório Regional de Diagnóstico em 1993**. Boletim do Laboratório Regional de Diagnóstico. Editora Universitária, Pelotas, 1994. 45p.
- SCHIRRMIEIER, H. et al. Genetic and antigenic characterization of an atypical pestivirus isolate, a putative member of a novel pestivirus species. **Journal of General Virology**, v. 85, p. 3647-3652. 2004.
- SCHUDEL, A.A. et al. Infections of calves with antigenic variants of bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) and neurological disease. **Journal of Veterinary Medicine B.**, v. 33, p. 303-310. 1986.
- SCHRIJVER, R.S. & KRAMPS, J.A. Critical factors affecting the diagnostic reliability of enzyme-linked immunosorbent assay formats. **Revue Scientifique et Technique**, v. 17, p. 550-61. 1998.
- SCHWEIGER, B. et al. Application of a fluorogenic PCR assay for typing and subtyping of influenza viruses in respiratory samples. **Journal of clinical Microbiology**, v. 38, n. 4, p. 1552-1558. 2000.
- SCHWYZER, M. & ACKERMANN. M. Molecular virology of ruminant herpesviruses. **Veterinary Microbiology**, v. 53, p. 17-29. 1996.
- SCICLUNA, M.T. Herpesvirus infections in buffaloes (*Bubalus bubalus*): comparative analysis of various serological assays for diagnosis and epidemiological evaluations. In: Proc 4th IVVDC P084, Oslo, Norway. 2006.

SCICLUNA, M.T. Epidemiological situation of Herpesvirus infections in buffalo herds: Bubaline Herpesvirus1 or Bovine Herpesvirus1? **Italian Journal of Animal Science**, v. 6, p. 845-849. 2007.

SCICLUNA M.T. et al. Should the domestic buffalo (*Bubalus bubalis*) be considered in the epidemiology of Bovine Herpesvirus 1 infection? **Veterinary Microbiology**, v. 143, n.1, p. 81-88. 2010.

SHARMA, A. Status of infectious bovine rhinotracheitis (IBR) in Punjab state. **Indian Journal of Animal Sciences**, v. 74, p. 264-66. 2004.

SHIRVANI, E. et al. Seroepidemiological study of bovine respiratory viruses (BRSV, BoHV-1, PI-3V, BVDV, and BAV-3) in dairy cattle in central region of Iran (Esfahan province). **Tropical Animal Health Production**, v. 44, n. 1, p. 191-195. 2012.

SHOEMAKER, M.L. et al. Differential expression of the type I interferon pathway during persistent and transient bovine viral diarrhoea virus infection. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 29, p. 23-35.2009.

SMIRNOVA, N.P. et al. Acute non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus infection induces pronounced type I interferon response in pregnant cows and fetuses. **Virus Research**, v. 132, p. 49-58. 2008.

SNOWDON, W. A. The IBR/IPV virus: reaction to infection and intermittent recovery of virus from experimentally infected cattle. **Australian Veterinary Journal**, v. 41, p. 135-142. 1965.

SPEAR, P. G. Entry of alphaherpesviruses into cells. **Seminars in Virology** v. 4, p. 167-180. 1993.

SPEAR, P.G. Herpes simplex virus: receptors and ligands for cell entry. **Cellular Microbiology**, v. 6, n. 5, p. 401-410. 2004.

SPIILKI, F.R. et al. A monoclonal antibody-based ELISA allows discrimination between responses induced by bovine herpesvirus subtypes 1 (BoHV-1.1) and 2 (BoHV-1.2). **Journal of Virological Methods**, v. 129, n. 2, p. 191-193. 2005.

STAHL, K. et al. Bulk milk testing for antibody seroprevalence to BVDV and BHV-1 in a rural region of Peru. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 56, p 193-202. 2002.

STAHL, K. et al. Natural infection of cattle with an atypical 'HoBi'-like pestivirus-implications for BVD control and for the safety of biological products. **Veterinary Research**, v. 38, p. 517-523. 2007.

STALDER, H.P. et al. Genetic heterogeneity of pestiviruses of ruminants in Switzerland. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 72, p. 37-41. 2005.

STEVEN, A. C. & SPEAR, P. G. Herpesvirus capsid assembly and envelopment. In: CHIU, W.; BURNETT, R. M. & GARCEA, R. (Eds.). **Structural biology of viruses**. Oxford University Press, New York, 1997. p. 312-351.

STUDDERT, M.J. Bovine encephalitis herpesvirus. **Veterinary Record**, v. 124, n. 25, p. 584. 1989.

ST GEORGE, T.D. & PHILPOTT, M. Isolation of IBR virus from the prepuce of water buffalo bulls in Australia. **Australian Veterinary Journal**, v. 48, p. 126, Mar. 1972.

STRAUB, O.C. Infectious bovine rhinotracheitis virus. In: Morin ZdaB (Ed.) **Virus Infections of Ruminants**. Amsterdam: Elsevier, 1990. p. 71–109.

STRAUB, O.C. BoHV-1 infections: relevance and spread in Europe. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Disease**, v. 14, p. 175-186. 1991.

TAKIUCHI, E. et al. Standardization of a polymerase chain reaction (Semi Nested-PCR) to detect bovine herpesvirus type 1 in aborted fetus and semen from naturally infected cattle. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 24, n. 1, p. 43-56. 2003.

TAKIUCHI, E. et al. Bovine herpesvirus type 1 abortions detected by a semi-nested PCR in Brazilian cattle herds. **Research in Veterinary Science**, v. 79, p. 85-88. 2005.

TARRY, D.W. et al. Transmission of bovine virus diarrhea virus by blood feeding flies. **Veterinary Record**, v. 128, p. 82-84. 1991.

TEIXEIRA, M. F. B. et al. Diferenças em níveis de anticorpos neutralizantes contra herpesvírus bovinos tipos 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5). **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v. 4, n. 1, p. 61-65, 1998.

TEIXEIRA, M. F. B. et al. Elisa de bloqueio monoclonal para o diagnóstico sorológico de infecções pelo herpesvírus bovino tipo 1(BoHV-1). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.21, n. 1, p. 33-37. 2001.

TEMPESTA, M. et al., Development of a real time PCR for the detection and quantitation of caprine herpesvirus type 1 DNA. In: NAUWYNCK, H., FAVOREEL, H. (Eds), Proc. 2nd ESVV Veterinary Herpesvirus Symposium, Ghent, 2005.

TIKOO, S.K.; CAMPOS, M. & BABIUK, L.A. Bovine herpesvírus 1 (BoHV-1): Biology, pathogenesis and control. **Advances in virus research**, v. 45, p. 191-223, 1995.

TIJSSEN, P. **Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology: Practice and Theory of Enzyme Immunoassay**. Elsevier, Amsterdam. ISBN 0-444-80633-4. 1985.

TOLARI, F. et al. Isolation and reactivation of bovid herpesvirus 1 in goats, **Microbiologica** 13 (1990) 67-71.

TOMICH, R.G.P. et al. Sorodiagnóstico de doenças da reprodução em rebanhos de bovinos leiteiros de assentamentos rurais de Corumbá, MS. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n.4, p. 986-991. 2009.

TURIN, L. & RUSSO, S. BHV-1 infection in cattle: an update. **Veterinary Bulletin**, v. 73, p. 16–21. 2003.

THIEL, H.J.; PLAGEMANN, P. G. W. & MOENNIG, V. Pestiviruses. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M. & HOWLEY, P. M. (Eds) **Fields Virology** (3rd ed.), Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996. p.1059-1074.

THIRY, J. et al. Ruminant alphaherpesvirus related to bovine herpesvirus 1. **Veterinary Research**, v. 37, p. 169-190. 2006.

THIRY, J. et al. Isolation and characterisation of a ruminant alphaherpesvirus closely related to bovine herpesvirus 1 in a free-ranging red deer. **Veterinary Research**, v. 3, p. 26. 2007.

THOMISHIMA, M.J. & EQUIST, L.W. A conserved alpha-herpesvirus protein necessary for axonal localization of viral membrane protein. **Journal of Cell Biology**, v. 154, n. 4, p. 741-752. 2001.

THOMPSON, J.A. et al. Spatial hierarchical variances and age covariances for seroprevalence to *Leptospira interrogans* serovar hardjo, BoHV-1 and BVDV for cattle in the State of Paraíba, Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 76, p. 290-301. 2006.

TREMBLAY, R. et al. Acute BVD in Ontario. In: Int. Symp. Bovine Viral Diarrhoea Virus. A 50 year review. Cornell University, College of Veterinary Medicine, 23-25, 65-70. June, 1996.

VAN ENGELBURG, et al. Excretion of bovine herpesvirus 1 in semen is detected much longer by PCR than by virus isolation. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, p. 3129-3125. 1994.

VANROOSE, G. et al. Effect of Bovine Herpesvirus-1 or Bovine Viral Diarrhea Virus on Development of In Vitro-Produced Bovine Embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 54, p. 255-263. 1999.

VARELA, A.P.M. et al. Neutralizing antibodies to bovine herpesvirus types 1 (BoHV-1) and 5 (BoHV-5) and its subtypes. **Veterinary Microbiology**, v. 142, p. 254-260. 2010.

VASCONCELOS, R.O. et al. Meningoencefalite Bovina por Herpesvírus. Anais VI Encontro Nacional de Patologia Veterinária, 40, Santa Maria, 1993. p.1993.

VIEIRA, S. et al. Anticorpos para o herpesvírus bovino 1 (BHV-1) em bovinos do estado de Goiás. **Ciência Animal Brasileira**, v. 4, n. 2, p. 131-137. 2003.

VIRALZONE. Swiss Institute of Bioinformatics, 2010. Disponível em: <http://viralzone.expasy.org/all_by_species/39.html>. Acesso em: 12 de novembro de 2012.

VIRALZONE. Swiss Institute of Bioinformatics, 2012 Disponível em: <http://viralzone.expasy.org/all_by_species/176.html>. Acesso em: 16 de outubro de 2012.

WALZ, P.H. et al. Experimental model of type II bovine viral diarrhea virus-induced thrombocytopenia in neonatal calves. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 11, p. 505-514. 1999.

WANG, J. et al. Validation of a real-time PCR assay for the detection of bovine herpesvirus 1 in bovine semen. **Journal of Virology Methods**, v.144, p. 103-108. 2007.

WEIBLEN, R. et al. Bovine meningoencephalitis from IBR virus. **Veterinary Record**, v. 124, p. 666-667.1989.

WEIBLEN, R. et al. Isolation of bovine herpesvirus 1 from perputial swabs and semen of bulls with balanoposthitis. *Journal of veterinary Diagnostic Investigation*, v. 4, p. 341-343. 1992.

WEILAND, F. et al. Localization of pestiviral envelope proteins E(rns) and E2 at the cell surface and on isolated particles. **Journal of General Virology**, v. 80, p. 1157-1165. 1999.

WEINSTOCK, D.; BHUDEVI, B. & ANTHONY, E. C. Singletube single-reverse transcriptase PCR assay for detection of bovine viral diarrhea virus in pooled bovine serum. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 343-346. 2001.

WELLENBERG, G.J.; MARSB, M.H.; VAN OIRSCHOT, J.T. Antibodies against bovine herpesvirus (BHV) 5 may be differentiated from antibodies against BHV1 in a BHV1 glycoprotein E blocking ELISA. **Veterinary Microbiology**, v. 78, p. 79-84. 2001.

WIEDMANN, M. et al. Detection of bovine herpesvirus-1 in bovine semen by a nested PCR assay. **Journal of Virological Methods**, v. 44, p. 129-140. 1993.

WILD, P. et al. Novel Entry Pathway of Bovine Herpesvirus 1 and 5. **Journal of virology**, v. 72, n. 12, p. 9561-9566. 1998.

WILLIAMS, N.M. et al. Multiple abortions associated with caprine herpesvirus infection in a goat herd. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 211, p. 89-91. 1997.

WIRTH, U.V. Comparasion of immediate-early transcripTE among bovine herpesvirus type 1 and type 5 strains differing in neurovirulent potential. **Virus Research**, v.27, p.1-12, 1993.

WORKMAN, A. et al. A Protein (ORF2) Encoded by the Latency-Related Gene of Bovine Herpesvirus 1 Interacts with Notch1 and Notch3. **Journal of virology**, v. 85, n. 6, p. 2536-2546. 2011.

WHETSTONE, C.A.; SEAL, B.S. & MILLER, J.M. Variability occurs in the inverted repeat region of genomic DNA from bovine herpesvirus 1 respiratory, genital and bovine herpesvirus 5 encephalitic isolates. **Veterinary Microbiology**, v. 38, p. 181-189. 1993.

WRATHALL, A.E.; SIMMONS, H.A. & VAN SOOM, A. Evaluation of risks of viral transmission to recipients of bovine embryos arising from fertilisation with virus-infected semen. **Theriogenology**, v. 65, n. 2, p. 247-274. 2006.

YAN, B.F. Serological survey of bovine herpesvirus type 1 infection in China. **Veterinary Microbiology**, v. 127, p. 136–141. 2008.

ZAGHAWA, A. Prevalence of antibodies to bovine viral diarrhea virus and/or border disease virus in domestic ruminants. **Zentralbl Veterinarmed B**, v. 45, p. 345-351. 1998.

ZAJAC, M. P. D. M. et al. BHV-1 vaccine induces cross-protection against BHV-5 disease in cattle. **Research Veterinary Science**, v. 81, n. 3, p. 327-34, Mar. 2006.

ZAJAC, M. P. D. M. et al. Biology of bovine herpesvirus 5. **The Veterinary Journal**, v. 184, p. 138-145. 2010.