



Universidade de Cuiabá

Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal
Área de Concentração Saúde Animal

SANDRO RIBEIRO DA COSTA

**AVALIAÇÃO DA EXCREÇÃO DO VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA
(BVDV) NO SÊMEN DE TOUROS DE REBANHOS NO ESTADO DE MATO
GROSSO POR MEIO DA RT-PCR**

Cuiabá, 2015

SANDRO RIBEIRO DA COSTA

**AVALIAÇÃO DA EXCREÇÃO DO VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA
(BVDV) NO SÊMEN DE TOUROS DE REBANHOS NO ESTADO DE MATO
GROSSO POR MEIO DA RT-PCR**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociência Animal, da Universidade de Cuiabá – UNIC como requisito para obtenção do Título de Mestre.
Orientadora: Profa. Dra. Michele Lunardi

Cuiabá, 2015

FICHA CATALOGRÁFICA
Catálogo na Fonte

C837a Costa, Sandro Ribeiro da.
Avaliação da excreção do vírus da diarreia viral bovina (BVDV) no sêmen de touros de rebanhos no Estado de Mato Grosso por meio da RT-PCR / Sandro Ribeiro da Costa – Cuiabá, 2015.
76 f. : il.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade de Cuiabá - Unic.
Orientadora: Profª. Dra. Michele Lunardi.

1. Patologia Animal. 2. Bovinos. 3. Vírus da Diarréia Viral Bovina. 3. BVDV. I. Título.

CDU: 591.2:636.2

Ficha Catalográfica
Valéria Oliveira dos Anjos
Bibliotecária – CRB1/1713

SANDRO RIBEIRO DA COSTA

**AVALIAÇÃO DA EXCREÇÃO DO VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA
(BVDV) NO SÊMEN DE TOUROS DE REBANHOS NO ESTADO DE MATO
GROSSO POR MEIO DA RT-PCR**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Biociência Animal, da Universidade de Cuiabá – UNIC como requisito para obtenção
do Título de Mestre.

Orientadora Prof^a. Michele Lunardi

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Michele Lunardi - UNIC

Prof. Dr. Marcelo Diniz dos Santos - UNIC

Profa. Dra. Michelle Igarashi - UFMT

Cuiabá, _____ de _____ de 2015.

Conceito Final: _____

Dedico a meus Pais e minha família.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus primeiramente, por me oportunizar de viver todas essas experiências e me conduzir ao fechamento de mais um ciclo em minha vida!!

A meu pai Waldemar e minha mãe Rosa, por sempre estarem presentes em minha vida, compartilhando de todos os momentos bons e não tão bom também e por me apoiarem.

A minha orientadora Professora Michele Lunardi, por toda atenção, paciência e ensinamentos prestados ao longo desses dois anos de mestrado. Agradeço imensamente a oportunidade de desenvolver este trabalho.

Aos demais professores do mestrado.

A professora Michelle Igarashi pela atenção, paciência, sensibilidade e confiança.

Ao professor Marcelo Diniz pela compreensão e apoio nos momentos de dificuldade no laboratório.

Ao Paulo Ramalho, meu eterno parceiro para todas as horas que preciso, muito obrigado por me ajudar a vencer os momentos de desespero e crises existenciais.

A minha amiga Elis Zambra, que participou de grande parte da minha vida no mestrado, prestando grande apoio quando mais precisei, valeu Elis, de coração!!

Aos meus familiares e amigos de maneira geral, vô Alexandre, vó Orienta, tia Alé, tia Graça, tio Amigo, tio Jorge, Rô, Neto, João, Gabriel, Gabriella, Jóia, Sued, Diêgo, Dona Elza, Drika, Junior, Naka, Bob, Danny, Kelre... simplesmente todos, afinal não conseguirei citá-los... cada um de sua maneira contribui para que eu pudesse concluir este ciclo.

Aos colegas que sempre estavam prontos a ajudar quando necessário, nas disciplinas, no laboratório e sempre dando força para seguirmos focados no trabalho.

Aos colegas ICs do laboratório sempre apostos para ajudar no que precisasse, meu muito obrigado Rafael, Paulo Victor, Daniel Bica, Gabriela...

Raphael Quinteiro meu colega e parceiro de orientações.

Aos veterinários que participaram das coletas de sêmen, muito obrigado pelo apoio sempre prestado. Obrigado João Gaeti, João Paulo, Thiago Soares, Professor Marcelo Diniz, Daniel Fialkoski, Adirson, Alex José, Taiane, Rogério. Aproveito para me desculpar pela insistência em meus contatos.

A professora Kelly Ito pela meticulosa e cansativa correção e ao professor Glauco pelas excelentes discussões e contribuições para a dissertação.

A querida Cátia, que está sempre pronta a nos ouvir, nos orientar e mesmo nos ceder o ombro amigo no momento de tristeza e agonia, praticamente um psicóloga. Além de muito eficiente quando se trata das questões que envolvem o programa, meu muito obrigado!!

A todos que direta ou indiretamente contribuem para que o programa em Biociência Animal seja efetivamente desenvolvido.

Ao apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPEAM, no programa RH- Interiorização/ Mestrado no EDITAL N.005/2013.

"A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original"
Albert Einstein

"Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes"
Martin Luther King Jr.

AVALIAÇÃO DA EXCREÇÃO DO VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA (BVDV) NO SÊMEN DE TOUROS DE REBANHOS NO ESTADO DE MATO GROSSO POR MEIO DA RT-PCR

EVALUATION OF EXCRETION OF BOVINE VIRAL DIARRHEA VIRUS (BVDV) IN SEMEN OF BULLS FROM CATTLE HERDS FROM MATO GROSSO STATE THROUGH RT-PCR.

RESUMO

COSTA, S. R. Avaliação da excreção do vírus da diarreia viral bovina (BVDV) no sêmen de touros de rebanhos no Estado de Mato Grosso por meio da RT-PCR. 2015. Dissertação (Mestrado Biociência Animal) – Universidade de Cuiabá, Cuiabá, 2015.

Devido às consequências causadas pela infecção do BVDV, o mesmo passou a ter relevante destaque no cenário da bovinocultura, evidenciando a necessidade de um melhor entendimento da forma de transmissão venérea. Nesse sentido, é fundamental verificar o papel do touro como disseminador do vírus para fêmeas, por meio do sêmen, para que, futuramente, possam ser implementadas estratégias de controle e prevenção adequadas e direcionadas às formas de manejo nos rebanhos do Estado. Deste modo, a pesquisa teve como objetivo investigar a presença do vírus da diarreia viral bovina no sêmen de touros do Estado de Mato Grosso. Para isso, um total de 64 amostras de sêmen *in natura* de touros, provenientes de rebanhos distintos no Estado de Mato Grosso, foram submetidas à RT-PCR para amplificação da região 5'UTR do genoma do BVDV, utilizando os primers 324 e 326. Todas as amostras foram diluídas em água DEPC a 50% (v/v), ainda, foram empregados controles positivo e negativo em todo o processo. Os resultados dos controles positivos e negativos citados anteriormente foram satisfatórios, fato que validou os procedimentos empregados no diagnóstico molecular estabelecido no presente trabalho. Deste modo, a ausência de excreção do BVDV no sêmen dos touros avaliados neste estudo pode ser explicada pelo fato de todos os animais estudados serem provenientes de rebanhos com manejo extensivo. Tais rebanhos eram, em sua maioria, caracterizados pela baixa rotatividade de animais e também pela reprodução por meio da monta natural. Portanto, estudos mais abrangentes deveriam ser conduzidos nestas e outras regiões, devido à identificação prévia do vírus no Estado, assim como a prevalência estabelecida nos Estados vizinhos, em níveis elevados, evidenciando o risco de transmissão aos animais suscetíveis, inclusive por via venérea.

Palavras-chave: BVDV; infecção natural; RT-PCR; sêmen.

ABSTRACT

COSTA, S. R. **Evaluation of excretion of bovine viral diarrhea virus (BVDV) in semen of bulls from cattle herds from Mato Grosso State through RT-PCR.** 2015. Dissertation (Master Animal Bioscience) - University of Cuiabá, Cuiabá, 2015.

Due to the consequences caused by BVDV infection, this viral agent became relevant to cattle industry, suggesting a need for better understanding of the form of venereal transmission. In this sense, evaluating the potential of the bulls as disseminators of the virus to females through semen is critical for the future, allowing implementation of appropriate control and prevention strategies and targeted forms of management in state herds. Thus this research aimed to investigate the presence of bovine viral diarrhea virus in the semen of bulls from State of Mato Grosso. A total of 64 samples of semen *in natura* from bulls from different herds in Mato Grosso underwent RT-PCR for amplification of the 5'UTR region of the genome of BVDV, using the primers 324 and 326. All samples were previously diluted (50%, v/v) in DEPC water, and positive and negative controls were used in the whole process. The results of positive and negative controls mentioned above were satisfactory, validating all procedures used in this work. Thus the absence of BVDV excretion in the semen of bulls evaluated in this study may be explained by the fact that all studied animals came from herds with extensive management. Such herds were mostly characterized by low turnover of animals and also for reproduction through natural mating. Therefore more comprehensive studies should be conducted in these and other regions, due to previous confirmation of circulation of the virus in the state, as well as the established high prevalence in neighboring states, highlighting the risk of transmission in susceptible animals, maybe through venereal.

Keywords: BVDV; infection nature; RT-PCR; semen.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Organização do genoma do vírus da Diarreia Viral Bovina.

Figura 2 - Regiões codificadas.

Figura 3 - Efeito do estágio de gestação no momento da infecção de fêmeas gestantes suscetíveis.

Figura 4- Mapa com os municípios de e a localização dos rebanhos destinados a avaliação da presença do BVDV, de acordo com as divisões das 7 macrorregiões de Mato Grosso.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E UNIDADES

% = Porcentagem

BDV = Vírus da Doença das Fronteiras

BVD = Diarreia Viral Bovina – *Bovine Viral Diarrhea*

BVDV = Vírus da Diarreia Viral Bovina – *Bovine Viral Diarrhea Virus*

cDNA = Ácido desoxirribonucleico complementar

CP = Citopatogênico

CSFV = Vírus da Peste Suína Clássica

DEPC = Diethyl Pirocarbonato

DM = Doença das Mucosas

DNA = Ácido desoxirribonucleico

dNTP = Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

kbp = Quilo Pares de Bases

MDBK = *Madin Darby Bovine Kidney*

Min = Minuto

mL = Mililitro

mM = Milimolar

NCP = Não Citopatogênico

nm = Nanometros

°C = Grau Celsius

OIE = Organização Mundial de Saúde Animal

ORF = *Open Reading Frame*

pb = Pares de base

PCR = Reação em cadeia pela polimerase

pH = Potencial Hidrogeniônico

PI = Persistentemente Infectado

RNA = Ácido Ribonucléico

RT = Transcrição reversa

RT-PCR = Transcrição reversa – Reação em Cadeia pela Polimerase

SFB = Soro Fetal Bovino

TBE = TBE é constituído pela mistura do Tris / Borato /EDTA,

UV= Ultravioleta

V = Voltagem

µL = Microlitro

Sumário

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 HISTÓRICO E ETIOLOGIA (BVDV)	18
2.1.1 Morfologia e propriedades biológicas	19
2.1.2 Genótipos, biótipos e diversidade antigênica.....	23
2.2 PATOGENIA E QUADRO CLÍNICO.....	27
2.2.1 Infecção subclínica.....	27
2.2.2 Infecção clínica aguda.....	28
2.2.3 Infecção clínica hiperaguda.....	29
2.2.4 Síndrome hemorrágica e trombocitopenia.....	30
2.3 INFECÇÃO VENÉREA	30
2.3.1 Infecção congênita	31
2.3.2 Infecção durante o período embrionário (0-45 dias de gestação).....	32
2.3.3 Infecção após o período embrionário entre 45-125 dias de gestação	33
2.3.4 Infecção durante o período fetal entre 125 e 175 dias de gestação (defeitos congênitos).....	33
2.3.5 Infecção no último terço de gestação (entre os 180 dias e o final da gestação).....	34
2.3.6 Animais Persistentemente Infectados (PI)	34
2.4. DOENÇA DAS MUCOSAS (DM)	35
2.4.1 Doença das Mucosas: forma aguda.....	36
2.4.2 Doença das Mucosas: forma crônica.....	37
2.5 IMUNOSSUPRESSÃO	37
2.6 TRANSMISSÃO	38
2.6.1 Transmissão Horizontal	39
2.6.2 Transmissão Vertical.....	40
2.7 DIAGNÓSTICO	40
2.7.1 Diagnóstico Diferencial	41
2.8 PROFILAXIA E CONTROLE.....	42
REFERÊNCIAS	43
3 - OBJETIVOS	56
3.1 OBJETIVO GERAL	56

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	56
4 – ARTIGO	57
RESUMO.....	58
ABSTRACT.....	59
INTRODUÇÃO	60
MATERIAL E MÉTODOS	61
RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
CONCLUSÃO	68
REFERÊNCIAS.....	68
APÊNDICE.....	74
APÊNDICE 1- PROTOCOLO: TRIzol LS Reagente.....	75
APÊNDICE 2- FORMULÁRIO EPIDEMIOLÓGICO	77

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um país com características propícias para o desenvolvimento do agronegócio, em face de suas diversidades, como o clima e o solo, possuindo áreas agricultáveis altamente férteis e algumas ainda inexploradas. Esses fatores fazem do país um lugar de vocação natural para a agropecuária e os demais negócios relacionados a seus diferentes setores (MAPA, 2011).

O aumento da demografia mundial e sua consequente demanda por produtos alimentícios demonstra que o Brasil poderá alcançar o patamar de líder mundial no fornecimento de alimentos e *commodities* ligados ao agronegócio, fortalecendo sua economia e elevando seu crescimento. Neste cenário, o agronegócio é um dos mais relevantes setores da economia brasileira, o mesmo representa em torno de um terço do Produto Interno Bruto-PIB do país e é base de muitos segmentos relacionados à indústria e logística (BACHA, 2012).

O Brasil possui inúmeros produtos agropecuários com valor estratégico significativo em nossa economia, sendo os principais o álcool, açúcar, café, soja, fruticultura, produtos florestais, produtos de origem bovina, suína e de aves. O país constitui um dos principais fornecedores de proteínas no mercado internacional de alimentos, destinando o excedente de sua produção a 215 destinos mundiais. A bovinocultura é um dos principais destaques do agronegócio brasileiro no cenário internacional, sendo que o país atende a cerca de 30% do consumo de carne bovina mundial (MAPA, 2011).

O rebanho bovino no Brasil corrobora com o desenvolvimento de dois relevantes segmentos, sendo o segundo maior exportador de carne bovina e o terceiro maior produtor de leite, os quais possuem um valor bruto da produção em R\$ 67 bilhões, evidenciando sua importância econômica para o país (ABIEC, 2014; ABPL, 2014).

No Estado de Mato Grosso, o rebanho bovino aumentou 564% nas últimas três décadas, bem acima do índice nacional que dobrou no mesmo período (MAPA, 2011). Entretanto, o mesmo é estimado em 28.670 milhões de cabeças, diante de 29.193 milhões existentes em 2011, o que apresenta uma retração do rebanho bovino. Segundo dados do Instituto de Defesa Agropecuária do Estado de Mato Grosso-INDEA-MT (2014) e o Instituto Mato Grossense de Economia Agropecuária-

IMEA (2015), isso se dá em virtude da diminuição das áreas ocupadas com pastagem e com o aumento do abate de fêmeas.

Visto a relevância do rebanho bovino em seus diversos aspectos, torna-se imprescindível a atenção quando o assunto é sanidade do rebanho, em particular relacionada às infecções que direta ou indiretamente comprometem o trato reprodutivo das fêmeas, dos machos e o embrião e/ou feto, destacando-se como um importante elemento de interferência na eficiência reprodutiva dos rebanhos (JUNQUEIRA; ALFIERI, 2006).

Várias são as enfermidades que afetam o desempenho reprodutivo dos bovinos. Dentre as quais, as doenças infecciosas de origem bacteriana, viral ou parasitária, são mais representativas, pois afetam o aparelho reprodutivo de machos e fêmeas, impedindo a fecundação, causando abortos, repetições deaios, o nascimento de animais com porte inferior à média, disfunções hormonais, entre outros, inclusive a perda da função reprodutiva (JUNQUEIRA; ALFIERI, 2006).

As causas de distúrbios reprodutivos com maior ocorrência no rebanho brasileiro, relacionados com doenças infecto-contagiosas, são as bactérias *Brucella abortus*, *Leptospira spp*, *Campilobacter fetus* e o *Ureaplasma spp*; os protozoários *Tritrichomonas foetus* e *Neospora caninum*; e os vírus herpesvírus bovino 1 (BoHV-1) e o vírus da diarreia viral bovina (BVDV), os quais possuem a via oronasal como principal via de transmissão, podendo também, em algumas situações, ser transmitido por contato venéreo. Tais agentes etiológicos vem se difundindo em vários rebanhos, ocasionando grandes perdas econômicas em animais de corte e leite em todo o mundo (GROOMS; BAKER; AMES, 2006; JUNQUEIRA; ALFIERI, 2006; GIVENS; MARLEY, 2008).

Com base em análises filogenéticas, o BVDV é classificado em duas diferentes espécies BVDV1 e BVDV2 (LIU et al., 2009; RIDPATH, 2003, 2010), havendo ainda, subdivisões. Na espécie BVDV-1, 12 subgenótipos (BVDV-1a – BVDV-1l) já foram identificados, enquanto na espécie BVDV2, pelo menos dois subgenótipos (BVDV-2a e BVDV-2b) são reconhecidos (VILCEK et al., 2001; FLORES et al., 2002).

Contudo, Liu et al. (2009) sugerem que seja feita uma nova classificação, considerando a existência de um outro genótipo denominado BVDV-3, o qual foi isolado inicialmente de soro fetal bovino proveniente do Brasil e, posteriormente, a partir de soro fetal bovino, de um búfalo e de animais persistentemente infectados de

regiões da América do Sul e do sudeste asiático (SCHIRRMIEIER et al., 2004; STALDER et al., 2005; LIU et al., 2009).

O vírus também pode ser classificado em dois biótipos: citopático (CP) e não-citopático (NCP), que se diferenciam, respectivamente, pela capacidade de causarem, ou não, efeito nas células infectadas ao se replicarem. Enquanto o biótipo citopático é encontrado principalmente em bovinos com doenças das mucosas, o não-citopático é o responsável pela circulação permanente do BVDV nos rebanhos, pois na infecção, uma pequena proporção (1 a 2%) dos animais nascidos pode ser constituída por animais persistentemente infectados (PI) e a presença desses animais é a principal forma de transmissão e manutenção do vírus no rebanho (HAMERS et al., 2001; LINDENBACH; RICE, 2001; DIAS et al., 2001).

Evidencia-se que a patogenia do vírus sobre a reprodução não está limitada apenas a abortos ou malformações congênitas, estando também vinculada a falhas antes mesmo da concepção, durante a fecundação e nos primeiros dias de vida do embrião (JUNQUEIRA; ALFIERI, 2006), ocasionadas pelo tropismo do vírus por células germinativas de ambos os sexos (BROWNLIE, 2005).

Frente às consequências evidenciadas pela infecção do BVDV, o mesmo passou a ser considerado um dos agentes virais mais importantes na bovinocultura, o qual desperta crescente interesse de produtores, técnicos, pesquisadores, autoridades sanitárias, de laboratórios produtores de vacinas e, portanto, torna-se de fundamental importância a condução de estudos que visem, como um passo inicial, averiguar a presença deste agente viral e a provável diversidade em genótipos e subgenótipos associados aos rebanhos Mato Grossenses.

Além disso, a realização de avaliação da importância da forma de transmissão venérea da infecção pelo BVDV, nos touros empregados na reprodução, permitirá que, futuramente, possam ser implementadas estratégias de controle e prevenção adequadas e direcionadas às formas de manejo de uso rotineiro nos rebanhos do estado.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 HISTÓRICO E ETIOLOGIA (BVDV)

O BVDV teve seu primeiro registro em 1946 por pesquisadores do *New York State Veterinary College*, da Universidade de Cornell. O isolamento do patógeno se deu após um surto de diarreia e lesões erosivas no trato digestivo de bovinos nos Estados Unidos (OLAFSON; MCCALLUM; FOX, 1946; BAKER, 1995), e no Canadá (CHILDS, 1946). A doença foi caracterizada por leucopenia, febre, apatia, diarreia, anorexia, erosões gastrointestinais e hemorragias. Anos depois, em 1957 foi isolado o agente etiológico viral e denominado BVDV (LEE; GILLESPIE, 1957).

No Brasil, em 1974 foi descrito o primeiro isolamento do BVDV (VIDOR, 1974). Estudos posteriores confirmaram a presença do agente no rebanho bovino brasileiro, sendo as amostras isoladas do vírus oriundas de fetos abortados, de bezerras (provavelmente PIs), de rebanhos com problemas reprodutivos e casos de doença gastroentérica (FLORES et al., 2005).

O BVDV é um patógeno que exerce relevante efeito sobre a espécie bovina e encontra-se distribuído mundialmente. Este vírus promove perdas econômicas significativas em explorações de corte e leite, sendo responsável por extensa gama de manifestações clínicas, que variam desde infecções brandas ou subclínicas até doença aguda e, por vezes, fatal. Apesar de produzir efeitos deletérios em diversos sistemas do organismo dos hospedeiros, seu impacto na função reprodutiva é notadamente o mais importante (BAKER, 1995; GROOMS, 2004; HOUE; LINDBERG; MOENNIG, 2006).

O isolamento deste agente patogênico já se deu em animais selvagens, como coelhos, búfalos, alpacas, girafas, camelos e antílopes da África e América e até em animais domésticos com ovinos, suínos e caprinos (EVERMANN; BARRINGTON, 2005; RIDPATH, 2005a; GONDIM, 2006; GROOMS; BAKER; AMES, 2006; VILCEK; NETTLETON, 2006; PASSLER et al., 2007; KAHN, 2008), porém os bovinos são considerados seus hospedeiros naturais. Estudos confirmaram a soropositividade para BVDV em suínos (ROEHE et al., 1998), caprinos (CASTRO et al., 1994), ovinos (BRUM et al., 2002), bubalinos (PITUCO; DEL FAVA, 1998) e javalis cativos (FLORES et al., 2005), porém a relevância epidemiológica da infecção em outras espécies de animais domésticos e silvestres

ainda permanece incerta. *In vitro*, há replicação viral em células de cultivo de diversas espécies, inclusive a humana (FLORES, 2007).

O agente está classificado na família *Flaviviridae*, gênero *Pestivirus*, juntamente com outros dois vírus relacionados: o vírus da doença da fronteira (“*border disease virus* - BDV”) que infecta ovinos, caprinos e cervídeos; e o vírus da peste suína clássica (Classical swine fever vírus – CSFV) que infecta suínos domésticos e silvestres (HORZINEK, 1991; LINDENBACH; RICE, 2001; RIDPATH, 2005a). Na classificação destes vírus, três critérios são utilizados: hospedeiro de origem, características antigênicas e reatividade sorológica cruzada e, por último, o critério mais seguro para diferenciar as espécies, a homologia das sequências genômicas (RIDPATH, 2005a). Os pestívirus possuem características únicas dentro da família *Flaviviridae*, tais como: presença dos genes que codificam a proteína não estrutural Npro, uma autoprotease, e a Erns, uma glicoproteína com atividade de ribonuclease (RIDPATH, 2003, 2005a).

2.1.1 Morfologia e propriedades biológicas

O genoma do BVDV é constituído por uma molécula de RNA linear (RNA vírus), cadeia simples, de polaridade positiva e, portanto, infeccioso quando introduzido em células permissivas (RIDPATH; BOLIN; DUBOVI, 1994). Os vírions do gênero *pestivirus* são caracterizados por partículas esféricas com 40 a 60 nanômetros de diâmetro (nm), genoma com extensão aproximada de 12,3 quilo pares de bases (kpb) (FLORES, 2003; RIDPATH, 2005a; VILCEK; NETTLETON, 2006), e organizado em uma longa “*open reading frame*” (janela aberta de leitura - ORF), que codifica uma poliproteína de aproximadamente 4.000 aminoácidos (DONIS, 1995; RIDPATH, 2005a).

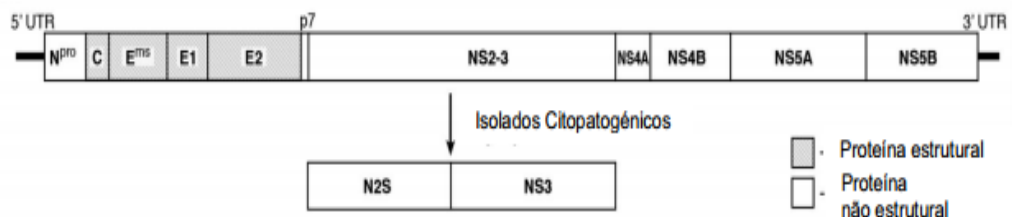
As proteínas estruturais estão codificadas na extremidade 5’ do genoma, enquanto as proteínas não estruturais encontram-se codificadas na extremidade 3’. A replicação do RNA se dá no citoplasma da célula hospedeira. As partículas virais são agregadas e envolvidas em membranas intracelulares, transportadas em vesículas citoplasmáticas pelo percurso secretor, sendo libertadas por exocitose (RIDPATH, 2005a).

Dentre as regiões do genoma, a 5’UTR contém duas estruturas em forma de grampo que são importantes para a replicação e um sítio para o reconhecimento pelos ribossomos (IRES), importante para o início da tradução, que ocorre

independente do *cap*. Essa região também é a mais conservada entre os pestivírus e, portanto, importante para o diagnóstico (RIDPATH, 2005a). Na região 3'UTR também estão presentes estruturas primárias e secundárias importantes, que provavelmente atuam em *cis* para iniciar a síntese da fita antígenômica durante a replicação do vírus (GONG et al., 1996).

A poliproteína viral é traduzida via IRES e é clivada durante e após a tradução por proteases virais e celulares, gerando 11 ou 12 proteínas maduras funcionais (não-estruturais e estruturais) (BAKER, 1995; GOENS, 2002; RIDPATH, 2005a). Segundo Donis (1995), as proteínas não-estruturais do genoma do BVDV (Npro, P7, NS2/3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B) estão envolvidas no processo de replicação viral. As proteínas estruturais C, Erns, E1 e E2 exercem funções importantes no revestimento protetor do RNA viral e permitem a entrada e saída das partículas virais das células infectadas, descritas na figura 1.

Figura 1 - Organização do genoma do vírus da Diarreia Viral Bovina.



Fonte: Adaptado de Ridpath (2005a).

A primeira proteína traduzida é a Npro (protease amino-terminal), uma proteína não estrutural com função de autoprotease do tipo serina protease que se autocliva da poliproteína assim que é traduzida. A clivagem ocorre em um sítio bem conservado, entre uma cisteína e uma serina (STARK et al., 1993). A Npro possui homologia com proteínas de outros representantes do gênero Pestivirus como o CSFV, mas não com outros membros da família *Flaviviridae*. A função atribuída a ela é de interferir nas defesas celulares do hospedeiro, sendo dispensável para a replicação, com exceção de parte da região N-terminal, cuja sequência codificante faz parte do IRES (BEHRENS et al., 1998).

Neste processo a proteína Core (C), é a subsequente, sendo uma pequena proteína estrutural que compõe o capsídeo, carregada positivamente, interage com o RNA genômico para formar o nucleocapsídeo, porém parece não ser essencial para

a montagem dos vírions (IVANYIN-AGY et al., 2008). A proteína C também apresenta um alto grau de conservação entre os pestivírus (DONIS, 1995).

Depois segue as três glicoproteínas estruturais que participam da composição do envelope: Erns, E1 e E2. A Erns é clivada por sinalases celulares no retículo endoplasmático. Neste processo, ela perde a sua região hidrofóbica e mantém sua porção hidrofílica, apontando assim para uma possível perda da associação com o envelope. É secretada das células infectadas em grande quantidade, e também é encontrada associada ao vírion (WEILAND et al., 1999).

A glicoproteína E1 é uma proteína estrutural e, junto a glicoproteína E2, forma o principal complexo proteico do envelope viral, essencial para a penetração viral (RONECKER et al., 2008). A sua heterodimerização com a Erns também é essencial para a replicação viral (WEGELT et al., 2009).

Já a glicoproteína E2 está envolvida na ligação dos vírions aos receptores celulares e apresenta-se com caráter imunodominante, induzindo anticorpos neutralizantes em altos níveis. Por esse motivo, é alvo de inúmeras estratégias nas vacinais de subunidades e de DNA. A E2 contém uma região hipervariável N-terminal onde se localizam os epítomos neutralizantes que são responsáveis pela variação antigênica da E2 entre os isolados de BVDV (DONIS, 1995). Essas variações são de grande relevância para controle e diagnóstico, implicadas nas falhas de proteção vacinal (RIDPATH, 2003, 2005a).

Dando sequência ao processo, segue-se a proteína não-estrutural p7, uma pequena proteína conservada que forma canais iônicos, e que pode participar do transporte, maturação e liberação das partículas infecciosas (ELBERS et al., 1996; HARADA; TAUTZ; THIEL, 2000).

A NS2-3 é a próxima proteína a ser traduzida. A NS2 possui função de cisteína protease e é responsável pelo processamento da NS2-3. A NS2 sozinha também participa na regulação da replicação, limitando a replicação no início da infecção juntamente com um cofator celular (Jiv). Esse controle parece ser essencial para manutenção do fenótipo NCP (LACKNER et al., 2005). A região da NS3 tem função de serina protease e, junto com a NS4A, que atua como cofator faz a clivagem de todas as proteínas seguintes. A NS3 também possui atividade de helicase e NTPase, necessárias para a replicação viral. A proteína NS2-3 também tem participação regulatória na síntese de RNA e morfogênese dos vírions maduros (AGAPOV et al., 2004; LACKNER et al., 2004). A proteína NS2-3 tem sido muito

estudada, por causa da porção NS3 presente nos vírus CP, além de ser uma proteína imunogênica, mas que não induz resposta imune protetora (DONIS, 1995; LAMBOT et al., 1997).

A NS4A é uma proteína altamente conservada que atua como cofator na atividade de protease da NS3, interagindo com a porção N-terminal da NS3. Também parece ter um papel essencial para a replicação eficiente do RNA (TAUTZ; KAISER; THIEL, 2000; GRASSMANN et al., 2001).

Já a NS4B é uma fosfoproteína que se associa com as membranas celulares como as do retículo endoplasmático, e também pode ter participação na atenuação da citopatogenicidade (QU; MCMULLAN; RICE, 2001). A última proteína codificada pelo genoma é a replicase viral, também dividida em duas: NS5A e NS5B. A NS5A interage com a subunidade alfa do fator de iniciação da elongação eucariótico podendo participar da replicação do genoma viral (JOHNSON et al., 2001).

A NS5B é a polimerase de RNA, dependente de RNA, responsável pela replicação do genoma viral, e é capaz de iniciar a síntese do RNA viral dependente ou independente de sequências iniciadoras (ZHONG; GUTSHALL; DEL VECCHIO, 1998; CHOI et al., 2004). Também participa no direcionamento do RNA recém-sintetizado para a encapsidação (ANSARI et al., 2004).

Dentre as diversas características dos pestivírus, a mais marcante é o seu elevado grau de variabilidade antigênica observado, principalmente, entre as amostras de BVDV (ROEHE et al., 1998). As regiões que refletem maior variabilidade na partícula viral encontram-se nas glicoproteínas do envelope, especialmente a glicoproteína E2 apresentada anteriormente, cujos epítomos possuem uma região de hipervariabilidade ou *Hot Spot* responsáveis pela alta frequência de mutações e recombinações genéticas observada no vírus (BAKER, 1995; DONIS, 1995). Deste modo, as taxas de mutação estão na ordem de 0,03 a 2% por nucleotídeo/ano, sendo frequentemente observadas em RNA-vírus e superam em um milhão de vezes as taxas descritas em DNA-vírus (GOENS, 2002).

Neste sentido, a criação de um número relevante de variantes genéticas e antigênicas do BVDV sofre efeito da alta frequência de mutações, a propensão à recombinação e a pressão seletiva pela resposta imune estimulada por infecções naturais ou por vacinação, o que tem levado à ocorrência de grande número de variantes genéticas e antigênicas do BVDV (BROCK; GROOMS; GIVENS, 2005; GONDIM, 2006). Os genótipos principais já foram identificados: BVDV tipo 1 e BVDV

tipo 2 (FLORES, 2003; HOUE, 2003; EVARMANN; BARRINGTON, 2005; FLORES et al., 2005; VALLE et al., 2005; GROOMS; BAKER; AMES, 2006; PASSLER et al., 2007; KAHN, 2008; OIE, 2008).

2.1.2 Genótipos, biótipos e diversidade antigênica

Com base nas características genéticas e antigênicas, os isolados de BVDV podem ser divididos em dois genótipos BVDV-1 e BVDV-2, tornando assim a região 5'UTR do genoma, fundamental no processo de classificação, pelo fato de ser altamente conservada quando comparada as demais regiões. No entanto, outras regiões também são utilizadas como a Npro, Erns, C e NS3 (RIDPATH; BOLIN; DUBOVI, 1994; BECHER et al., 2003; XIA et al., 2007; LIU et al., 2009; MINAMI et al., 2011).

Os isolados de BVDV podem ser divididos ainda, pela análise fenotípica utilizando anticorpos monoclonais (Mabs) contra a glicoproteína E2, envolvida na indução de anticorpos neutralizantes contra o vírus (RIDPATH, 2003; FLORES et al., 2005).

As cepas consideradas “clássicas” são designadas como BVDV-1, responsáveis por infecções de caráter brando a moderado, enquanto as do tipo 2 são comumente associadas com uma síndrome hemorrágica grave (RIDPATH; BOLIN; DUBOVI, 1994), as quais foram identificadas em surtos de BVD aguda e doença hemorrágica no Canadá, em 1993 e 1994, porém incluem também isolados de virulência baixa ou moderada. Desse modo a síndrome hemorrágica grave somente foi reportada como sendo causada por BVDV-2, no entanto estas cepas são a minoria dentro deste genótipo e a maioria das cepas de BVDV-2 apresentam virulência semelhante as do genótipo BVDV-1 (RIDPATH; FULTON, 2009).

Além destas espécies citadas, ainda existem alguns pestivírus de origem bovina isolados na última década que ainda não estão classificados. Esses vírus são conhecidos como pestivirus “atípicos”, sugerindo uma possível nova espécie definida como BVDV-3 ou *HoBi*-like vírus (STAHL et al., 2007; LIU et al., 2009). Com isso Botton et al. (1998), evidencia a necessidade de se destacar que essa diversidade antigênica entre cepas isoladas de BVDV possuem importantes implicações para a epidemiologia, diagnóstico, escolha das estratégias de imunização e controle da enfermidade.

Além da classificação em genótipos, os BVDV também foram subdivididos em subgenótipos. Para autores como Vilcek et al. (2001, 2005), Becher et al. (2003), Liu et al. (2010), o BVDV-1 é subdividido em onze subgenótipos 1a-1k e o BVDV-2 em dois 2a e 2b.

Ao mesmo tempo, outros autores incorporam um novo subgenótipo ao BVDV-1 intitulado 1l, enquanto o BVDV-2 é dividido de dois a quatro subgenótipos diferentes, designados de 2a-2d (GIANGASPERO; HARASAWA, 2007; JACKOVA et al., 2008; KADIR et al., 2008; NAGAI et al., 2008; HORNBERG et al., 2009).

A subdivisão dos genótipos, bem como o seu significado biológico, ainda permanecem em constante discussão (RIDPATH, 2005b). Alguns anos após a sua identificação, o BVDV-2 ainda era considerado um vírus novo e altamente virulento. Entretanto, ele tem sido mais frequentemente isolado de várias condições clínicas moderadas ou subclínicas do que necessariamente de casos graves ou hemorrágicos, embora ainda existam tentativas de correlacionar o BVDV-1 e o BVDV-2 com a virulência (FULTON et al., 2000; GUNN; STOTT; HUMPHRY, 2004).

Apesar do BVDV-2 ter sido descrito em 1994, a caracterização de cepas de BVDV isoladas entre os anos de 1981 e 1994 demonstrou que este genótipo ocorria nos EUA desde o início da década de 80. Além disso, foi concluído que a sua primeira descrição consistiu em uma cepa isolada a partir de suíno em 1979 na Europa, depois de realizadas comparações com amostras de BVDV-2. Nessa época, a cepa foi denominada como atípica do CSFV (RIDPATH, 2005b).

Posteriormente, vários pesquisadores acreditavam que o BVDV-2 era uma variante recente do BVDV-1, decorrente da pressão seletiva resultante de programas de vacinação, mas não existiram evidências sugestivas da ocorrência de mutações que diferenciasssem os isolamentos do BVDV-1 e do BVDV-2. As diferenças existentes entre os dois genótipos sugerem que o BVDV-2 existe na natureza assim como o BVDV-1 e, desta forma, é bem mais provável que o BVDV-2 represente um grupo de vírus identificados anteriormente e não um novo grupo de vírus (FLORES et al., 2002; RIDPATH, 2005b).

Em relação aos diferentes biótipos do BVDV, sabe-se que o biótipo CP é gerado a partir do NCP por mutações, durante esse processo uma proteína a mais é expressa, a NS3, como resultado da clivagem de NS2-3 (TAUTZ; MEYERS; THIEL, 1998). Dentre os vírus presentes na natureza, a grande maioria é NCP, por outro lado as ocorrências do CP são isoladas quase que exclusivamente de animais

acometidos pela DM ou de surtos de doença pós-vacinal (PASSLER et al., 2007; RIDPATH; FLORES, 2007; KAHN, 2008; OIE, 2008).

Destacando que os biótipos são grupos de vírus com a mesma constituição genética, porém possuem diferenças na indução de alterações microscópicas visíveis (vacuolização e lise) em cultivos celulares epiteliais *in vitro* (KELLING, 1996). O fato de um dos biótipos não ser CP não significa que o mesmo não seja patogênico e somente cause infecções subclínicas nos animais. Portanto, os biótipos são classificados pela habilidade em causar alterações visíveis em culturas celulares epiteliais e não quanto à capacidade de causar enfermidade no animal (DEREGT; LOEWEN, 1995). Sendo assim, é relevante destacar que somente o biótipo NCP atravessa a placenta, invade o feto e estabelece nele uma infecção persistente, gerando assim o principal mecanismo de permanência e propagação do vírus no rebanho (FLORES, 2007a).

A citopatogenicidade em cultivos celulares não está correlacionada à virulência em infecções agudas *in vivo*, pois todos os vírus altamente virulentos, até então estudados, eram NCP (RIDPATH, 2005a). No entanto, os biótipos se comportam diferentemente *in vivo*. As cepas NCP apresentam tropismo por leucócitos, órgãos linfóides e pelo trato respiratório, enquanto as estirpes CP estão restritas ao trato digestório (HAMERS et al., 2001). Observa-se que a maioria das estirpes do BVDV isoladas no campo são NCP, e se mantém na população pela geração de novos animais persistentemente infectados (PI). Enquanto as estirpes CP constituem uma minoria e são isolados, em sua maioria, a partir de animais com surtos de doença pós-vacinal ou pela Doença das Mucosas (FLORES; SCHUCH, 2007; FRAY; RIDPATH, FLORES, 2007).

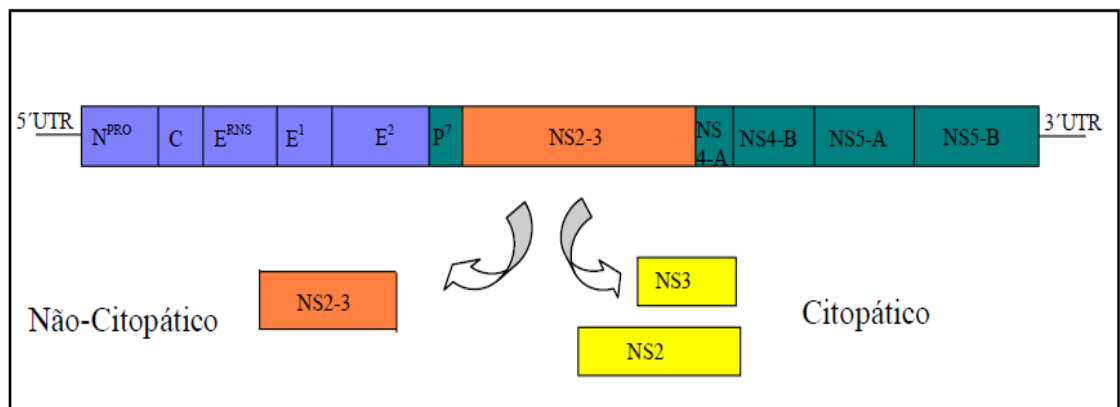
Assim, vírus CP são os biótipos de eleição para uso em vacinas e diagnóstico laboratorial pela sua facilidade de manipulação. Por outro lado, em virtude de apenas o vírus NCP estabelecer infecções persistentes, este biótipo é com frequência utilizado para vacinas vivas modificadas, testes e pesquisas diagnósticas (RIDPATH, 2005b; GONDIM, 2006). O biótipo NCP é tido como responsável pela extensa variedade de doenças congênitas, entéricas e reprodutivas. Em culturas celulares, o vírus CP causa sérios prejuízos as células, dentre eles a vacuolização celular, destruindo-as completamente em 48-72 horas; por sua vez, o vírus NCP causa pequena ou nenhuma mudança citopatogênica

visível, permanecendo as células infectadas sem alterações morfológicas significativas (DEREGT; LOEWEN, 1995; ANDREWS, 2004).

A detecção dos biótipos do BVDV não é distinguível sorologicamente. Entretanto, em nível molecular, evidenciou-se que a partir de células infectadas, o vírus citopatogênico produz uma proteína adicional, não observada em células infectadas com o vírus não citopatogênico. A partir desta descoberta, a proteína NS3 ou p80 passou a ser considerada o marcador molecular para os vírus CP e implicada na indução de citopatogenicidade (TAUTZ; MEYERS; THIEL, 1998).

A NS3 é originária de alterações no biótipo NPC que podem ocorrer como resultado de inserções, em nível celular, de material genético, duplicações, recombinações ou deleções de genes virais. Tais alterações são decorrentes de interações entre os diferentes biótipos do BVDV (RNA homólogo ou heterólogo) ou ainda, entre o RNA viral e o da célula hospedeira, resultando na ocorrência de um novo sítio de clivagem interna. A NS2/3 (ou p125) - proteína não-estrutural presente em todas as células infectadas por BVDV (BAKER, 1995; DEREGT; LOEWEN, 1995; DONIS, 1995; RADOSTITS et al., 2002). A representação das regiões codificantes para as proteínas estruturais e não-estruturais do vírus, e a demonstração de como pode ocorrer a alteração do biótipo citopático para não-citopático, estão descritas na Figura 2.

Figura 2 - Regiões codificadas.



Fonte: Adaptada de Ridpath e Flores (2007).

Desse modo para Baker (1995), a expressão da proteína NS3 causa modificações na fisiologia da célula infectada que podem ser responsáveis pelo aumento da replicação viral. Adicionalmente, o acúmulo de proteínas virais no

citoplasma e o aumento da atividade biológica celular causam danos celulares irreversíveis que culminam com a morte da célula. A existência da proteína NS3 e o biótipo citopatogênico é, evidentemente, o resultado de alterações genéticas no biótipo NCP. Assim existe uma forte indicação que o vírus CP derive do vírus NCP através de mutação (DEREGT; LOEWEN, 1995; KAHN, 2008).

Contudo, para Ridpath et al. (2006), ainda pode existir um terceiro biótipo para o BVDV, definido como linfocitopatogênico, que não causa morte celular em cultivo de células epiteliais, mas causa morte de células em cultivo linfóide. O significado prático do biótipo linfocitopatogênico estaria relacionado com a virulência *in vivo*, e o cultivo de células linfóides seria de grande importância no estudo dos efeitos da infecção do BVDV no sistema imune do animal.

2.2 PATOGENIA E QUADRO CLÍNICO

O quadro clínico após a infecção pelo BVDV é bastante complexo, sendo influenciado por múltiplos fatores relacionados com o hospedeiro, como a idade, estado de gestação, a idade fetal no período da infecção, imunocompetência, presença de estresse ambiental e a possível presença de outros patógenos associados. Além disso, a diversidade genética, a variação antigênica e diferenças na virulência entre as cepas de BVDV também possuem relação direta com a manifestação de quadros clínicos (GROOMS; BAKER; AMES, 2006). Vale ressaltar que a maioria dos isolados de ambas as espécies virais (BVDV-1 e BVDV-2) apresenta baixa virulência e causa infecção com doença branda ou subclínica.

2.2.1 Infecção subclínica

O BVDV geralmente penetra no hospedeiro pela via oro-nasal, sendo que o epitélio do trato respiratório superior, orofaringe e o tecido linfóide regional são considerados os sítios primários de replicação viral após infecção. Após essa replicação primária, verifica-se viremia associada a leucócitos, a qual contribui para a disseminação para outros órgãos. Além disso, o vírus pode apresentar tropismo por tecidos epiteliais e linfóides, sendo também responsável pela imunossupressão observada nas infecções agudas (BOLIN; GROOMS, 2004; BROCK, 2004b).

O vírus também possui tropismo pelas células das linhagens germinativas de ambos os sexos, sendo encontrado no sêmen e em folículos ovarianos, e por

tecidos em constante divisão, logo as placas de Peyer e o feto são os principais locais de multiplicação do BVDV (GROOMS, 2004).

De acordo com Bolin e Grooms, (2004), Brock (2004b), Evermann e Barrington (2005), estima-se que 70 a 90% das infecções causadas pelo vírus ocorrem sem manifestação de quadros clínicos. Nestes casos, os animais desenvolvem hipertermia moderada, leucopenia e produzem anticorpos neutralizantes. As infecções subclínicas explicam os títulos de soroneutralização positiva para BVDV encontrados na maioria dos bovinos não vacinados, como também a diminuição da produção leiteira em vacas, que tem sido associada a infecções subclínicas (EVERMANN; BARRINGTON, 2005; GONDIM, 2006; GROOMS; BAKER; AMES, 2006).

Os bovinos com infecção subclínica podem persistir virêmicos de 4-15 dias após a infecção e desenvolver anticorpos séricos contra a infecção em 2- 4 semanas após o contágio (GONDIM, 2006).

2.2.2 Infecção clínica aguda

A infecção aguda pelo BVDV é frequentemente definida como doença clínica que ocorre em bovinos imunocompetentes, que não são animais PI (EVERMANN; BARRINGTON, 2005; LIEBLER-TENORIO, 2005). A ocorrência desta síndrome se dá em bovinos com idades compreendidas entre seis a 24 meses, (EVERMANN; BARRINGTON, 2005; GONDIM, 2006; GROOMS; BAKER; AMES, 2006).

Nesta síndrome o período de incubação da fase aguda oscila de 5 a 7 dias, tendo por sinais clínicos: febre, leucopenia, depressão, anorexia, respiração rápida, corrimentos oculares e nasais, erosões e ulcerações orais, diarreia e redução na produção leiteira nas vacas (EVERMANN; BARRINGTON, 2005; FLORES et al., 2005; GONDIM, 2006; GROOMS; BAKER; AMES, 2006).

Evidencia-se, em alguns casos, erosões epiteliais no espaço interdigital, banda coronária, tetos e vulva (EVERMANN; BARRINGTON, 2005). A viremia pode persistir por até 15 dias, período este em que o vírus é eliminado em pequenas quantidades. Contudo, a duração dos sinais clínicos é variável e depende da duração da viremia, virulência do vírus infectante, presença de infecções secundárias e capacidade regenerativa dos tecidos afetados (EVERMANN; BARRINGTON, 2005; GROOMS; BAKER; AMES, 2006).

Dentre os animais, as fêmeas imunocompetentes fornecem imunidade colostrar às suas crias, protegendo-as contra a viremia nos primeiros 2-4 meses de vida, dependendo da qualidade e quantidade de colostro consumido (EVERMANN; BARRINGTON, 2005; THURMOND, 2005). No entanto, a infecção viral em bovinos jovens sem imunidade passiva apropriada ou suficiente pode resultar em doença secundária causada pelos efeitos imunossupressores da doença (GROOMS; BAKER; AMES, 2006; OIE, 2008).

A doença, quando manifestada em sua forma leve, raramente leva à apresentação de lesões macroscópicas. Entretanto, os casos graves de doença aguda por BVDV em bovinos infectados são causados por lesões no tecido epitelial gastrointestinal, tegumentar e do sistema respiratório (KAHN, 2008).

O trato respiratório e as tonsilas são os primeiros tecidos a serem infectados. A partir destes, o BVDV dissemina-se para as superfícies do epitélio e tecido linfóide, distribuindo-se pelo organismo através dos leucócitos (EVERMANN; BARRINGTON, 2005; GONDIM, 2006; GROOMS; BAKER; AMES, 2006; KAHN, 2008). Em 24 horas pós-infecção, a viremia pode ser detectada, sendo identificada a presença do vírus na urina 48 horas pós-infecção. O curso da viremia e a presença do vírus na urina são dependentes da presença ou ausência de anticorpos colostrais (EVERMANN; BARRINGTON, 2005).

2.2.3 Infecção clínica hiperaguda

Em sua manifestação hiperaguda a BVD determina grande morbidade e alta mortalidade em todas as faixas etárias, sendo geralmente causada por cepas de BVDV-2 NCP. Os surtos de infecção hiperaguda têm alta incidência de abortos (EVERMANN; BARRINGTON, 2005; FLORES et al., 2005; GROOMS; BAKER; AMES, 2006; OIE, 2008). As lesões macroscópicas são semelhantes em aparência às da DM, não sendo normalmente possível diferenciar entre as duas formas, apenas com base histopatológica (DEREGT; LOEWEN, 1995; EVERMANN; BARRINGTON, 2005). Nesta forma clínica da doença, evidenciam-se os gânglios linfáticos aumentados de tamanho, erosões e ulcerações do trato gastrointestinal, hemorragias petequiais e equimóticas nas superfícies serosas das vísceras e depleção extensiva de linfócitos. Nesta forma, a pneumonia deverá ser o quadro clínico mais óbvio. A duração da doença pode variar de 3 a 7 dias (KAHN, 2008).

2.2.4 Síndrome hemorrágica e trombocitopenia

A síndrome hemorrágica pode ser causada por infecções agudas pelo BVDV, que por sua vez podem ser caracterizadas clinicamente por uma trombocitopenia marcada, diarreia sanguinolenta, hemorragias petequiais e equimóticas da conjuntiva, esclera e membrana nictitante, epistaxe, hemorragia nas superfícies mucosas da boca e vulva, hemorragia anormal nos locais de injeção, desidratação, leucopenia e morte (EVERMANN; BARRINGTON, 2005; GROOMS; BAKER; AMES, 2006; KAHN, 2008; OIE, 2008).

A síndrome hemorrágica parece estar associada a cepas NCP de BVDV- 2, resultando em broncopneumonia multifocal, atrofia da medula óssea vermelha, e necrose e erosões da membrana mucosa do trato gastrointestinal (EVERMANN; BARRINGTON, 2005; FLORES et al., 2005; GROOMS; BAKER; AMES, 2006; GONDIM, 2006; OIE, 2008). Fêmeas expostas ao vírus durante o estro podem apresentar baixas taxas de fertilização após a inseminação artificial ou a monta natural, devido às falhas ou atrasos na ovulação provocados pela atividade do patógeno no tecido ovariano (GROOMS, 2004).

Neste sentido, a patogenia da hemorragia relaciona-se com a trombocitopenia induzida pelo vírus, mas o seu mecanismo ainda não está totalmente esclarecido (EVERMANN; BARRINGTON, 2005; LIEBLER-TENORIO, 2005). No entanto, acredita-se que a trombocitopenia induzida pela infecção viral pode ser devido ao efeito direto do vírus nas plaquetas, resultando na sua destruição ou sequestro, e na diminuição da produção plaquetária (DEREGT; LOEWEN, 1995; EVERMANN; BARRINGTON, 2005; OIE, 2008). Ademais, altas taxas de mortalidade foram relatadas nesse tipo de infecção, principalmente pela invasão do organismo do hospedeiro por patógenos oportunistas que provocam infecções secundárias debilitantes (BAKER, 1995; FLORES, 2007b).

2.3 INFECÇÃO VENÉREA

A presença do vírus no sêmen de touros está relacionada a infecções persistentes, mas também a infecções agudas transitórias pós-natal, podendo ocorrer a deterioração na qualidade do sêmen caracterizada normalmente pela redução da concentração e mobilidade espermática, assim como aumento de

anomalias morfológicas dos espermatozoides, fato que resulta na redução da fertilidade, apesar dos indivíduos estarem clinicamente saudáveis (GROOMS, 2004; EVERMANN; BARRINGTON, 2005; FLORES et al., 2005; OIE, 2008). Em relação à quantidade de vírus no sêmen, o título viral observado nesta secreção em touros com infecção aguda é inferior à quantidade verificada no sêmen de touros PI (LARSON, 2005).

Contudo, em outras circunstâncias, o sêmen e as taxas de gestação de descendentes de touros PI imunotolerantes podem ser normais, sendo que os espermatozoides de um animal infectado não contêm necessariamente o vírus. Assim como, mesmo após o período de viremia de touros imunocompetentes e soronegativos com infecções agudas, pode haver a eliminação do vírus pelo sêmen (EVERMANN; BARRINGTON, 2005; LIEBLER-TENORIO, 2005; OIE, 2008).

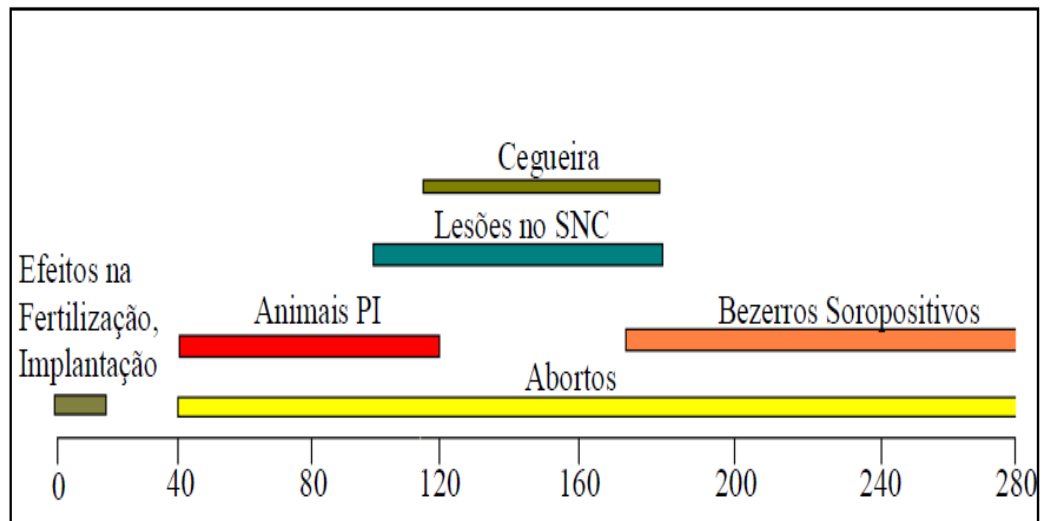
2.3.1 Infecção congênita

O BVDV causa perdas reprodutivas expressivas em fêmeas gestantes não imunes, uma vez que após a infecção o vírus é capaz de atravessar a placenta e infectar o concepto (GUNN; STOTT; HUMPHRY, 2004; EVERMANN; BARRINGTON, 2005; FLORES et al., 2005; LIEBLER-TENORIO, 2005; KAHN, 2008). Posteriormente, a infecção pode levar a falhas na fertilização, reabsorção embrionária (com retorno ao estro em intervalos regulares ou irregulares), abortos, mumificação fetal, natimortalidade, nascimento de animais fracos e inviáveis que morrem precocemente ou têm crescimento retardado, ou nascimento de animais PI (FLORES, 2003; GREISER-WILKE; GRUMMER; MOENNIG, 2003; GROOMS; BAKER; AMES, 2006; OIE, 2008).

As implicações decorrentes da infecção fetal são comumente observadas desde o início da gestação podendo, por muitas vezes, serem verificadas após esse período, no caso do nascimento desses animais, as quais são determinadas pela fase da gestação em que a fêmea foi infectada, pelo biótipo (CP/NCP) e pela cepa viral (FLORES et al., 2005; LIEBLER-TENORIO, 2005; GONDIM, 2006).

O BVDV causa falhas reprodutivas em animais suscetíveis durante as seguintes fases do ciclo reprodutivo (Figura 3):

Figura 3 - Efeito do estagio de gestação no momento da infecção de fêmeas gestantes suscetíveis.



Fonte: Adaptada de Ridpath e Flores (2007).

2.3.2 Infecção durante o período embrionário (0-45 dias de gestação)

Infecções naturais de novilhas soronegativas quatro dias após a inseminação provocam viremia entre 8 a 17 dias e as taxas de concepção e de gestação diminuem, comparativamente com novilhas não infectadas (ANDREWS et al., 2004; BROCK, 2004b; FLORES et al., 2005; LIEBLER- TENORIO, 2005; GONDIM, 2006; KAHN, 2008). As infecções embrionárias ocorridas durante os primeiros 45 dias de gestação resultam em atraso no crescimento fetal, defeitos congênitos, morte embrionária ou fetal seguida de absorção, mumificação ou abortamento. O intervalo entre a infecção do conceito e a ocorrência do abortamento pode variar de 10 dias até alguns meses, por isso é comum encontrar abortamentos de fetos edemaciados ou autolisados (GREISER-WILKE; GRUMMER; MOENNIG, 2003; ANDREWS et al., 2004; EVERMANN; BARRINGTON, 2005; GROOMS; BAKER; AMES, 2006).

Somente em animais não imunizados o vírus é capaz de invadir os placentomas e se replicar no trofoblasto atingindo, assim, o feto. Macroscopicamente, observa-se esplenomegalia, hepatomegalia, linfadenopatia e lesões necrosantes no miocárdio e pulmões. Achados histológicos caracterizam-se por infiltrado mononuclear no miocárdio, baço, linfonodos e na região periportal do fígado (POTGIETER, 2004).

2.3.3 Infecção após o período embrionário entre 45-125 dias de gestação

As consequências relacionadas à infecção dependem do período de desenvolvimento fetal, apesar do risco ser relativamente maior no início da gestação. A infecção do feto entre os 50 e 100 dias de gestação pode, também, provocar morte e aborto em questão de dias ou meses após a infecção fetal (EVERMANN; BARRINGTON, 2005; FLORES et al., 2005; LIEBLER- TENORIO, 2005; KAHN, 2008; OIE, 2008).

Se a infecção das matrizes ocorrer entre os 45 a 120 dias de gestação, por um isolado NCP do BVDV, resultará no nascimento de bezerros PI, visto que durante o referido período o sistema imunológico fetal está em formação e só estará concluído por volta do 125º dia do período gestacional. Consequentemente, ocorre um reconhecimento errôneo das proteínas virais como sendo próprias ao organismo e o sistema imune do hospedeiro não forma anticorpos contra BVDV, tornando os animais infectados imunotolerantes ao vírus infectante (CASTRUCCI et al., 1991; DEREGT; LOEWEN, 1995; FLORES, 2003; ANDREWS et al., 2004; BROCK, 2004a; EVERMANN; BARRINGTON, 2005; LARSON, 2005; GROOMS; BAKER; AMES, 2006; GROOMS, 2006; KAHN, 2008).

2.3.4 Infecção durante o período fetal entre 125 e 175 dias de gestação (defeitos congênitos).

Quando a infecção do feto acontece aproximadamente entre os 125 e 175 dias de gestação, pode acarretar defeitos congênitos, o que normalmente é muito comum em rebanhos positivos (BROCK, 2004a; FLORES et al., 2005; GONDIM, 2006; GROOMS; BAKER; AMES, 2006; GROOMS, 2006). Este período de desenvolvimento corresponde ao período final da organogênese do sistema nervoso e do desenvolvimento do sistema imune do feto, podendo resultar na produção de uma resposta inflamatória frente ao BVDV. Neste estágio de gestação, a infecção pelo BVDV pode inibir o crescimento ou a diferenciação celular ou causar lise celular (EVERMANN; BARRINGTON, 2005; LIEBLER-TENORIO, 2005; GROOMS; BAKER; AMES, 2006).

Quanto aos defeitos congênitos, os mais comuns caracterizam-se por malformações no sistema nervoso central (microcefalia, hidrocefalia, hipoplasia cerebelar, hipomielinogênese) e microftalmia com displasia da retina, configura-se em vários graus de cegueira após o nascimento e deficiências oculares, tais como

atrofia da retina, neurite do nervo óptico, cataratas. Animais nascidos com hipoplasia cerebelar são incapazes de andar normalmente após o parto. Verifica-se também, braquignatismo, alopecia, hipotricose, artrogripose, deformações músculo-esqueléticas, restrição ao crescimento, hipoplasia pulmonar e aplasia tímica (ANDREWS et al., 2004; BROCK, 2004a; EVERMANN; BARRINGTON, 2005; LARSON, 2005; LIEBLER-TENORIO, 2005; GROOMS, 2006; FLORES, 2007a; OIE, 2008).

2.3.5 Infecção no último terço de gestação (entre os 180 dias e o final da gestação)

Infecções ocorridas após 150 dias de gestação resultam em animais imunocompetentes, capazes de desenvolver uma resposta efetiva contra o vírus e eliminá-lo do organismo. Logo, esses bezerros nascem com anticorpos contra BVDV, ou seja, soropositivos, mas livres do vírus. Os efeitos da infecção em estágios gestacionais tardios ainda não foram bem documentados, entretanto, abortamentos e nascimentos de animais fracos ou inviáveis já foram relatados, apesar destes serem mais comuns no primeiro trimestre da gestação. Para detectar este tipo de infecção, o soro deve ser colhido antes da ingestão do colostro (BROCK, 2004a; EVERMANN; BARRINGTON, 2005; LIEBLER-TENORIO, 2005; GROOMS; BAKER; AMES, 2006; GROOMS, 2006; OIE, 2008).

2.3.6 Animais Persistentemente Infectados (PI)

Os animais persistentemente infectados pelo BVDV podem parecer clinicamente saudáveis, no entanto, mesmo sendo soronegativos, são portadores e eliminam o vírus continuamente em secreções e excreções (POTGIETER, 2004; FLORES, 2007a). Estima-se que 2 a 5% dos fetos infectados durante a vida intra-uterina permaneçam persistentemente infectados (FLORES et al., 2005).

A imunotolerância dos bovinos PI é específica para a cepa NCP de BVDV infectante, sendo assim, estes animais podem responder imunologicamente tanto as cepas virais heterólogas quanto a outros patógenos. A maioria dos bezerros PI nasce fraca e debilitada, em geral com o aparecimento de problemas respiratórios, apresentam crescimento retardado, malformações congênitas e morrem no primeiro ano de vida. Contudo, existem diversos relatos de animais nessa condição que

sobrevivem até a idade adulta e são capazes de se reproduzir, gerando progênes PI (FLORES et al., 2005; GONDIM, 2006; FLORES, 2007a).

A manutenção do BVDV na população bovina pode ser oriunda de uma linha familiar PI, na qual fêmeas produzem crias com estas características (FRAY; PATON; ALENIUS, 2000; GROOMS; BAKER; AMES, 2006; KAHN, 2008). Contudo, estudos efetuados por Wittum et al. (2001) afirmam que a maioria dos bezerros PI são oriundos de processos infecciosos de genitoras infectadas durante a gestação. Dentre estes, observa-se uma taxa de mortalidade de 50% nos 12 primeiros meses de vida e acredita-se que menos de 10% das novilhas PI repostas no rebanho atingem a lactação. Os bezerros PI podem nascer com tamanho abaixo do normal e apresentar taxa de crescimento retardada, alterações reprodutivas e morte precoce (LIEBLER-TENORIO, 2005; GONDIM, 2006; KAHN, 2008).

Dentre os animais PI que atingem a idade reprodutiva, as fêmeas podem apresentar perdas embrionárias e fetais, enquanto os machos podem apresentar alteração na qualidade do sêmen (FLORES et al., 2005). Por outro lado, alguns animais PI estão predispostos a infecções resultando em pneumonia e enterite, as quais podem se tornar crônicas e não responder ao tratamento (GONDIM, 2006; KAHN, 2008). A doença subclínica que, eventualmente, se torna clínica (agudiza) ou imunossupressora, permitindo o aparecimento de infecções bacterianas secundárias, pode explicar a mortalidade destes bovinos, as lesões *post-mortem*, como a glomerulite e a encefalite, que também foram observadas em animais PI (GROOMS; BAKER; AMES, 2006).

Gondim (2006) discorre que algumas constatações histológicas da infecção são apresentadas por alguns animais, como nefrite intersticial mononuclear, hepatite portal mononuclear, necrose focal e infiltrado mononuclear do epitélio do esôfago e da língua, encefalite mononuclear e hiperplasia linfóide peribronquiolar. Evidencia-se dessa forma, que bovinos PI têm maior probabilidade de desenvolver a DM, de contrair outras doenças e com isso possuem menor tempo de vida (FLORES et al., 2005; KAHN, 2008).

2.4. DOENÇA DAS MUCOSAS (DM)

A DM acomete, exclusivamente, animais PI imunotolerantes ao biótipo NCP de BVDV, que sofrem uma superinfecção com estirpe homóloga do biótipo CP do vírus. O vírus CP é, geralmente, originado a partir de mutações ou recombinações genéticas do biótipo NPC do próprio animal. Fontes virais externas, como a aplicação de vacinas vivas modificadas ou infecção com o vírus CP decorrente da transmissão por outros animais, também podem resultar na manifestação da doença (FLORES et al., 2005; FLORES, 2007b). A DM ocorre principalmente em animais entre seis meses e dois anos de idade e possui baixa morbidade e mortalidade próxima dos 100%, podendo apresentar diferentes cursos evolutivos. A DM apresenta diferentes formas clínicas. As diferenças de linhagem entre os biótipos NCP e CP dos vírus podem ser responsáveis pelas variações na resposta clínica (ANDREWS et al., 2004; LIEBLER- TENORIO, 2005; EVERMANN; BARRINGTON, 2005; GROOMS; BAKER; AMES, 2006; KAHN, 2008; OIE, 2008).

2.4.1 Doença das Mucosas: forma aguda

A forma aguda da doença caracteriza-se por um período de incubação de 10 a 14 dias seguido de febre, anorexia, taquicardia, polipnéia, erosões na mucosa oral e nas narinas, desidratação e diarreia aquosa profusa, que pode ser acompanhada com estrias de sangue, coágulos de fibrina e odor fétido. Outros sinais clínicos incluem corrimento nasal mucopurulento e ocular, opacidade da córnea, salivação excessiva, redução na ruminação e timpanismo. Outras alterações também observadas são infecção bacteriana secundária, originando pneumonias, mamites ou metrites, inflamação do espaço interdigital e faixa coronária e a, em alguns casos, laminite. Os bovinos infectados geralmente morrem dentro de poucos dias após o início da sintomatologia clínica (FLORES et al., 2005; GONDIM, 2006; GROOMS; BAKER; AMES, 2006; FLORES, 2007b; KAHN, 2008).

Na necropsia podem ser constatadas alterações no trato gastrointestinal, especialmente nas placas de Peyer – lesões necróticas e hemorrágicas. Observa-se uma enterite catarral ou hemorrágica com conteúdo intestinal de cor escura e consistência aquosa. Exames histopatológicos ainda revelam uma extensa necrose dos tecidos linfóides como no baço, linfonodos e placas de Peyer (BIELEFELDT-OHMANN, 1995). A taxa de mortalidade na DM aguda aproxima-se dos 100%, sendo que os animais que sobrevivem a esta fase desenvolvem a forma crônica da

doença (EVERMANN; BARRINGTON, 2005; GONDIM, 2006; GROOMS; BAKER; AMES, 2006).

2.4.2 Doença das Mucosas: forma crônica

Animais que sobrevivem à forma aguda desenvolvem a DM crônica, cujos sinais clínicos são inespecíficos. Os quais não se desenvolvem e podem apresentar constantemente fezes amolecidas ou diarreia intermitente, timpanismo crônico, redução no apetite, perda de peso, apatia progressiva, erosões interdigitais e lesões erosivas crônicas na mucosa oral e na pele não-cicatrizáveis, corrimentos nasais e oculares persistentes, que levam o animal ao óbito dentro de alguns meses após a infecção (BROCK, 2004a; EVERMANN; BARRINGTON, 2005; GROOMS; BAKER; AMES, 2006; FLORES, 2007b). Na pele podem-se desenvolver áreas de alopecia e hiperqueratinização, tipicamente na região do pescoço. Um longo período de claudicação pode aparecer devido à laminite, necrose interdigital ou deformação dos cascos (EVERMANN; BARRINGTON, 2005; FLORES et al., 2005; KAHN, 2008).

2.5 IMUNOSSUPRESSÃO

Existem evidências de que as infecções pós-natais pelo BVDV possam causar imunossupressão e estimular o desenvolvimento de outras doenças infecciosas, e de ser o fator crucial na patogenia das doenças de etiologia múltipla, como pneumonias e enterites. Contudo, esta evidência é controversa e deve ter em conta os mecanismos imunes dos bovinos PI, comparados aos animais com infecção primária (RADOSTITS et al., 2002).

Neste sentido, a patogenia da imunossupressão envolve vários aspectos do sistema imunológico, pois o vírus tem uma afinidade por células de defesa e a consequência da infecção é a destruição de algumas destas células e o prejuízo funcional das células sobreviventes. Os linfócitos e macrófagos constituem um importante alvo para a replicação do BVDV (EVERMANN; BARRINGTON, 2005; GONDIM, 2006; GROOMS; BAKER; AMES, 2006). As lesões provocadas pelo BVDV nos animais sugerem imunossupressão, devido à depleção linfóide e neutropenia. A infecção aguda com o BVDV também causa uma redução em linfócitos T CD4+ e CD8+, assim como redução de linfócitos B e de neutrófilos,

embora o número absoluto de linfócitos permaneça relativamente normal (LIEBLER-TENORIO, 2005; GONDIM, 2006).

A importância da imunossupressão induzida pelo BVDV se deve ao fato de aumentar a suscetibilidade do hospedeiro a outros agentes patogênicos e de poder aumentar a patogenicidade de microrganismos co-infectantes. O estresse do hospedeiro no momento da infecção pelo BVDV também irá aumentar a imunossupressão induzida pelo vírus e também pode ter como resultado indireto a produção de prostaglandinas pelas células infectadas (GROOMS; BAKER; AMES, 2006).

2.6 TRANSMISSÃO

Ao tratar da entrada do BVDV nos rebanhos, deve-se considerar aspectos relevantes descritos por Flores et al. (2012), como sendo: introdução de animais PI, introdução de fêmeas gestando fetos PI, introdução de animais durante o período de infecção aguda e contato entre animais de rebanhos vizinhos, considerando que o último aspecto possui relevância restringida.

Deste modo, a entrada ou o nascimento de animais PI no rebanho, resulta no avanço, em poucos meses, na transmissão do vírus aos bovinos suscetíveis, contudo, se a única fonte de transmissão do BVDV constituir os animais que apresentam a infecção aguda, essa transmissão ocorrerá de maneira mais gradual (GROOMS; BAKER; AMES, 2006).

Frequentemente os bovinos jovens apresentam maior sensibilidade à infecção pelo BVDV, quando comparados a animais adultos, no entanto a gravidade da infecção está ligada a virulência da cepa infectante. O mesmo se aplica aos animais vacinados inadequadamente, não vacinados ou que estão com a imunidade debilitada, deixando-os sujeitos a desenvolver infecções e posteriormente à doença clínica. Os animais, mesmo vacinados, estão sujeitos a infecções, ao considerar a grande diversidade de cepas circulantes (RADOSTITS et al., 2002). Por fim, a transmissão pode ocorrer de forma vertical e horizontal (HOUE, 1995; POTIGIETER, 2004).

2.6.1 Transmissão Horizontal

A transmissão horizontal para Flores et al. (2012) pode ser descrita como sendo direta (focinho-focinho, coito e mucosa-mucosa) ou indireta (focinho-secreções/excreções, focinho-feto abortado/placenta e contato com secreções/excreções).

Na transmissão horizontal direta, a maneira mais comum de ocorrer, a infecção ocorre por meio da ingestão ou inalação do vírus. A transmissão por aerossóis é considerada quando se trata de curtas distâncias, pois o vírus pode ter a infectividade mantida em distâncias curtas, entre 1,5 a 10 metros de distância (EVERMANN; BARRINGTON, 2005; LARSON, 2005), diminuindo progressivamente à medida que esta distância aumenta (KELLING, 2004; LARSON, 2005; GROOMS; BAKER; AMES, 2006). O BVDV já foi isolado de descargas nasais, aerossóis, saliva, lágrimas, fezes, urina, fluidos uterinos e leite (ANDREWS et al., 2004; LARSON, 2005; THURMOND, 2005; GONDIM, 2006). Desse modo, a transmissão que ocorre através do contato de animais suscetíveis com animais PI, ou por meio de seus fluidos corporais, também se caracteriza como direta, sendo este meio eficaz para transmissão do BVDV em condições naturais (POTGIETER, 2004; GONDIM, 2006).

Na transmissão indireta, fômites contaminados pelo patógeno caracterizam-se como veículos para transmissão do vírus de animais infectados a animais suscetíveis, apresentando variável estabilidade do vírus fora do hospedeiro. Evidencia-se que o vírus mostrou-se estável em laboratório quando submetido a temperaturas abaixo de 10°C e em pH entre 3 e 9 (HOUE, 1995; POTGIETER, 2004). Outro veículo de transmissão conhecido é o mecânico, caracterizado pela utilização de materiais contaminados como luvas de palpação anteriormente utilizadas, agulhas e material cirúrgico, espéculos nasais, uso de vacinas vivas ou contaminadas (EVERMANN; BARRINGTON, 2005; FLORES et al., 2005; GROOMS; LIEBLER-TENORIO, 2005; THURMOND, 2005; BAKER; AMES, 2006; KAHN, 2008).

Também pode ocorrer transmissão indireta através do uso de sêmen de touros PI, agudamente infectados ou com infecção transitória, nos procedimentos de inseminação artificial de vacas suscetíveis, por conseguinte o uso de sêmen contaminado estabelece relação direta com infecção dos rebanhos (HOUE, 1999; KELLING, 2004). Sendo assim, quando a infecção se estabelece no rebanho, a disseminação pode ocorrer através de um ciclo secundário de transmissão

provocado pelas novilhas que foram infectadas pelo sêmen (HOUE, 1999; FLORES et al., 2005; THURMOND, 2005; GROOMS; BAKER; AMES, 2006).

2.6.2 Transmissão Vertical

Caracteriza-se como transmissão vertical a que ocorre de uma geração para outra. Podendo, desse modo, evidenciar que os bovinos PI, são determinados por um transmissão vertical, no entanto se observa que na maior parte dos casos, esta é precedida da transmissão horizontal da mãe ou infecção transplacentária do feto (POTGIETER, 2004; GONDIM, 2006; GROOMS; BAKER; AMES, 2006).

Há também a transmissão do BVDV para o feto, no momento da transferência embrionária se a fêmea doadora ou receptora apresentar infecção aguda ou persistente, ou se o embrião não foi adequadamente lavado (THURMOND, 2005). Outro modo de transmissão é caracterizado pela utilização de sêmen coletado de touros PI ou durante o período de infecção aguda para posterior inseminação artificial (FLORES et al., 2012).

2.7 DIAGNÓSTICO

A diversidade de sinais clínicos determinados pelo BVDV dificulta o diagnóstico definitivo da doença. Conseqüentemente, para determinar a relação desses sinais com a presença do BVDV, se faz necessário à observação dos sinais clínicos apresentados, dos achados *post-mortem* juntamente com a anamnese (SANDVIK, 1999; GOYAL, 2005). Porém, o diagnóstico definitivo depende ainda do auxílio de testes laboratoriais, os quais são baseados na verificação de resposta imunológica do hospedeiro à infecção ou na detecção do vírus ou dos componentes virais, juntamente com informações sobre epidemiologia, característica da infecção e manejo vacinal. Assim os métodos são classificados em indiretos, quando investigam anticorpos contra o vírus, e diretos quando da detecção do vírus, antígenos ou ácidos nucléicos virais (GOENS, 2002; RIDPATH; FLORES, 2007).

Os métodos de diagnóstico molecular são muito utilizados também para a detecção do RNA viral. Esses testes geralmente têm como alvo a região genômica 5'UTR, visto ser uma região extremamente conservada entre as diferentes espécies do gênero *Pestivirus* (SCHMITT et al., 1994; VILCEK et al., 1994; RIDPATH; BOLIN,

1998). Estes ensaios permitem a identificação, a diferenciação e a quantificação viral, além de identificar variantes virais (CANAL et al., 2003; HOFFMANN et al., 2006; STAHL et al., 2009). Este método inclui a RT-PCR que é uma técnica altamente sensível para detecção de animais PI, a partir de amostras biológicas individuais ou em *pools* de soros sanguíneos e de tanques de leite. Essa técnica baseia-se na amplificação de parte do genoma viral (TAJIMA; DUBOVI, 2005; DRISKELL; RIDPATH, 2006; EDMONDSON et al., 2007), por ter como característica a rapidez na obtenção dos resultados, detectando partículas tanto infecciosas como não infecciosas. Além disso, mostra-se muito específica e sensível quando é adequadamente padronizada (TAKIUCHI et al., 2005), podendo desse modo ser utilizada em larga escala no diagnóstico de indivíduos ou rebanhos (PILZ et al., 2007; HOFFMANN et al., 2009).

2.7.1 Diagnóstico Diferencial

Por conta da ampla sintomatologia da doença causada pelo BVDV, juntamente com as suspeitas de infecções associadas, evidencia-se a necessidade da realização de outros tipos de diagnósticos com intuito de diferenciá-la de outras doenças etiológicamente distintas. Por isso a prevalência e epidemiologia dessas enfermidades devem ser ponderadas no momento do diagnóstico, em seguida deve-se observar os achados clínicos e patológicos de diferentes doenças, nos quais a variação dependerá da região analisada (RADOSTITS et al., 2002).

Assim, o diagnóstico diferencial deverá ser solicitado de acordo com a sintomatologia observada em cada caso, a título de exemplo, se a sintomatologia principal é a diarreia, sugere-se a realização de testes a fim de identificar o agente causador da infecção (EVERMANN; BARRINGTON, 2005). Além disso, esse diagnóstico é essencial ao se considerar a possibilidade de ocorrer outras doenças, tendo em vista que grande parte dos animais infectados apresenta a imunossupressão (POTIGIETER, 2004). Já quanto aos casos de doença das mucosas, tem-se a necessidade de diagnóstico diferencial especialmente para a febre aftosa, visto que fazem parte do complexo de doenças vesiculares e erosivas (FLORES et al., 2005).

Em ocorrências de diarreia profusa deve-se realizar o diagnóstico diferencial para desenterias de inverno, salmoneloses, coccidioses, helmintoses e intoxicações por arsênio e molibdênio, concomitante com uma deficiência por cobre. A sintoma-

tologia respiratória da BVD assemelha-se àquelas apresentadas pela Rinotraqueíte Infecciosa Bovina e pela pneumonia por *Pasteurella* spp. (RADOSTITS et al., 2002).

2.8 PROFILAXIA E CONTROLE

Como evidenciado anteriormente, o BVDV ocasiona variadas complicações aos animais infectados, principalmente relacionadas ao campo reprodutivo, decorrendo em abortamentos, diminuição das taxas de fertilidade e morte de neonatos. Desse modo, é indispensável à implementação de uma série de medidas de controle e monitoramento da infecção, sendo estas, essenciais para o sucesso de um programa de controle e prevenção contra o BVDV (RADOSTITS et al., 2002).

Atualmente, o modelo padrão é baseado na combinação de três medidas profiláticas, sendo a primeira a adoção sistemática de medidas de biossegurança, que possuiu papel central no controle do BVDV a fim de evitar a entrada do vírus nos rebanhos. Segundo, a detecção e eliminação dos animais PI, reduzindo com isso a circulação do vírus no rebanho, já que estes são considerados os principais disseminadores, e como terceira à vacinação, que têm sido muito utilizada no controle e prevenção, e extremamente indicada para animais livres que estão em áreas que apresentam a doença endêmica, tendo o finalidade de prevenir a infecção fetal, evitando a consequente produção de bezerros PI. Desta maneira, essas medidas preventivas tornam-se constituintes vitais dos programas de controle do BVDV (FLORES, 2003; LINDBERG, 2003; BROCK et al., 2005; LAUREYNS; RIBBENS; KRUIF, 2010; STAHL; ALENIUS, 2011).

Os programas de controle do BVDV, que estão obtendo sucesso na Europa, têm demonstrado a relevância epidemiológica dos animais PI, corroborando assim, a necessidade de eliminação desses animais dos rebanhos, para com isso, tentar conter efetivamente a infecção (RIDPATH, 2003; KALAICYOGLU, 2007; LAUREYNS; RIBBENS; KRUIF, 2010).

Além dessas medidas, práticas adequadas de biossegurança tem se tornado ferramentas importantes nesse processo. Entendendo que a maneira mais comum do vírus ser introduzido no rebanho se dá pela entrada de animais infectados, sobretudo fêmeas prenhes, é recomendado o exame desses animais antes de ingressarem ao rebanho, para se assegurar que não estão persistentemente

infectados ou com a doença aguda. De maneira similar, os bezerros devem ser examinados ao nascer para certificar que não são PI (BROCK et al., 2005; LARSON, 2005; GROOMS; BAKER; AMES, 2006; SMITH et al., 2009). Adicionalmente, é necessário a realização de um período de quarentena, caracterizada como a base de todos os procedimentos de biossegurança, prevenindo assim eventual entrada de animais com infecções transitórias (BROCK et al., 2005).

De acordo com autores como Radostits et al. (2002) e Moennig, Houe e Lindberg (2005), outra importante estratégia para conter o BVDV é a vacinação, sendo esta normalmente recomendada as fêmeas antes do início da estação de monta, com o intuito de os animais terem tempo suficiente para produzir resposta imunológica consistente. Igualmente indicada para bezerros de rebanhos confinados, objetivando prevenir doenças respiratórias e digestivas graves (FULTON et al., 2002; DEREGT et al.; 2005). Também é indicada a vacinação de animais em propriedades de alto risco, sendo mantida até a remoção total dos animais PI, e/ou até a redução da incidência dessa infecção, deste modo diminuindo o risco de reintrodução do vírus no rebanho (HOUE; LINDBERG; MOENNIG, 2006; LAUREYNS; RIBBENS; KRUIF, 2010).

Diante disso, evidencia-se a presença de dois principais tipos de vacinas contra o BVDV disponíveis no mercado. A primeira é a vacina inativada, indicada para imunização de vacas prenhes, por normalmente não promover a infecção fetal a partir de vírus vacinal e não apresentar reversão de virulência. Porém, este tipo de vacina necessita de grandes quantidades de antígeno, necessidade de revacinação periódica e normalmente a resposta imunológica é incompleta (FLORES, 2003; KELLING, 2004).

A segunda é a vacina atenuada que, ao contrário da anterior, necessita de menor quantidade de antígeno, uma vez que o vírus replica, apresenta a capacidade de induzir uma resposta imune satisfatória humoral e celular, e ainda necessita de apenas uma ou duas vacinações. Todavia, como desvantagem tem-se a possibilidade de transmissão viral via transplacentária e infecção fetal, o que por sua vez restringe o uso desse tipo de vacina em fêmeas gestantes (VAN OIRSCHOT; BRUSCHKE; VAN RIJN, 1999; KELLING, 2004).

REFERÊNCIAS

ABIEC - Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne – **Estatísticas**. Disponível em: <<http://www.abiec.com.br/estatisticas.asp>>. Acesso em: 25 nov. 2014.

ABPL – Associação Brasileira dos Produtores de Leite – **Release**. Disponível em: <<http://www.leitebrasil.org.br/release.htm>>. Acesso em 20 nov. 2014.

AGAPOV, E. V.; MURRAY, C. L.; FROLOV, I.; QU, L.; MYERS, T. M.; RICE, C. M. Uncleaved NS2-3 is required for production of infectious bovine viral diarrhea virus. **Journal of Virology**, v. 78, n. 5, p. 2414-25, 2004.

ANDREWS, A. H.; BLOWEY, R. W.; BOYD, H.; EDDY, R. G. **Bovine Medicine: Diseases and Husbandry of Cattle**. 2ª ed. Oxford, UK: Blackwell Science, 2004.

ANSARI, I. H.; CHEN, L. M.; LIANG, D.; GIL, L. H.; ZHONG, W.; DONIS, R. O. Involvement of a bovine viral diarrhea virus NS5B locus in virion assembly. **Journal of Virology**, v. 78, n. 18, p. 9612-23, 2004.

ARENHART, S.; BAUERMANN, F. V.; OLIVEIRA, S. A. M.; WEIBLEN, R.; FLORES, E. F. Excreção e transmissão do vírus da diarréia viral bovina por bezerros persistentemente infectados. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 9, p. 736-42, 2009.

BACHA, C. J. C. **Economia e Política Agrícola no Brasil**, 2ª ed. São Paulo, Brasil: Atlas Editora, 2012, p. 264.

BAKER, J. C. The clinical manifestations of Bovine Viral Diarrhea infection. **Veterinary Clinics of North América: Food Animal Practice**, v. 11, n. 3, p. 425-45, 1995.

BECHER, P.; RAMIREZ, R. A.; ORLICH, M.; ROSALES, S. C.; KONIG, M.; SCHWEIZER, M.; THIEL, H. J. Genetic and antigenic characterization of novel Pestivirus genotypes: implications for classification. **Virology**, v. 311, n. 1, p. 96-104, 2003.

BEHRENS, S. E.; GRASSMANN, C. W.; THIEL, H. J.; MEYERS, G.; TAUTZ, N. Characterization of an autonomous subgenomic pestivirus RNA replicon. **Journal of Virology**, v. 72, n. 3, p. 2364-72, 1998.

BIELEFELDT OHMANN, H. The pathologies of bovine viral diarrhea virus infection. A window on the pathogenesis. **Veterinary Clinics of North América: Food Animal Practice**, v. 11, n. 3, p. 447-76, 1995.

BOLIN, S. R. Control of bovine viral diarrhea infection by use of vaccination. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 11, n. 3, p. 615-25, 1995.

BOLIN, S. R.; GROOMS, D. L. Origination and consequences of bovine viral diarrhea virus diversity. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 20, n. 1, p. 51-68, 2004.

BOTTON, S. A.; GIL, L. H. V. G.; SILVA, A. M.; FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; PITUCO, E. M.; ROEHE, P. M.; MOOJEN, V.; WENDELSTEIN, A. C. Caracterização preliminar de amostras do vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV) isoladas no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 18, n. 2, p. 83-90, 1998.

BROCK, K. V. The many faces of bovine viral diarrhoea virus. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 20, n. 1, p. 1-3, 2004a.

BROCK, K. V. Strategies for the control and prevention of bovine viral diarrhoea virus. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 20, n. 1, p. 171-80, 2004b.

BROCK, K. V.; GROOMS, D. L.; GIVENS, M. D. Reproductive Disease and Persistent Infections. In: GOYAL, S. M.; RIDPATH, J. F. **Bovine Viral Diarrhoea Virus: Diagnosis, Management and Control**. 1ª ed. Oxford, UK: Blackwell Publishing, 2005, p. 145-56.

BROWNLIE, J. **Bovine virus diarrhoea virus**. In: BVDV SYMPOSIUM. Wellington, p. 1-19, 2005.

BROWNLIE, J. The pathogenesis of bovine viral diarrhoea virus infections. **Revue Scientifique et Technique- OIE**, v. 9, n. 1, p. 43-59, 1990.

BRUM, M. C. S.; WEIBLE, R.; FLORES, E. F.; TOBIAS, F. L.; PITUCO, E. M.; WINKELMANN, E. R. Proteção fetal frente a desafio com o Vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV) em ovelhas prenhes imunizadas com duas amostras de vírus atenuadas experimentalmente. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 22, n. 2, p. 64-72, 2002.

CANAL, C. W.; ROCHA, S. L. D. S.; LEÃO, J. A.; FALLAVENA, L. C. B.; OLIVEIRA, S. D. D.; BELTRÃO, N. Detecção de *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR). **Ciência Rural**, v. 33, n. 2, p.377-379, 2003.

CARMAN, S.; VAN DREUMEL, T.; RIDPATH, J.; HAZLETT, M.; ALVES, D.; DUBOVI, E.; TREMBLAY, R.; BOLIN, S.; GODKIN, A.; ANDERSON, N. Severe acute bovine viral diarrhoea in Ontario, 1993-1995. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 10, n. 1, p. 27-35, 1998.

CASTRO, R. S.; SILVA, F. A.; FRUTUOSO, E. M.; NASCIMENTO, S. A. Anticorpos contra Pestivirus e Herpesvirus em caprinos leiteiros no Estado de Pernambuco. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 46, n. 5, p. 577-78, 1994.

CASTRUCCI, G.; FRIGERI, F.; FERRARI, M.; TRALDI, V. The vaccination and challenge with bovine viral diarrhoea virus (BVDV) of calves previously infected with a non-cytopathic BVDV. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 14, n. 1, p. 31-38, 1991.

CHILDS, T. X Disease of cattle- Saskatchewan. **Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science**, v. 10, n. 11, p. 316-19, 1946.

CHOI, K. H.; GROARKE, J. M.; YOUNG, D. C.; KUHN, R. J.; SMITH, J. L.; PEVEAR, D. C.; ROSSMANN, M. G. The structure of the RNA-dependent RNA polymerase from bovine viral diarrhoea virus establishes the role of GTP in de novo initiation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-PNAS**, v. 101, n. 13, p. 4425-30, 2004.

DEREGT, D.; DUBOVI, E. J.; JOLLEY, M. E.; NGUYEN, P.; BURTON, K. M.; GILBERT, S. A. Mapping of two antigenic domains on the NS3 protein of the pestivirus bovine viral diarrhoea virus. **Veterinary Microbiology**, v. 108, n. 1- 2, p. 13-22, 2005.

DEREGT, D.; JACOBS, R. M.; CARMAN, P. S.; TESSARO, S. V. Attenuation of a virulent type 2 bovine viral diarrhoea virus. **Veterinary Microbiology**, v. 100, n. 3-4, p. 151-61, 2004.

DEREGT, D.; LOEWEN, K.G. Bovine viral diarrhoea virus - biotypes and disease. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 36, n. 6, p. 371-78, 1995.

DONATE, J.; MAZZUCHELLI, F. Actualización en diarrea vírica bovina. **Medicina Veterinaria**, v. 12, n. 9, p. 486-500, 1995.

DONIS, R. O. Molecular biology of bovine viral diarrhoea virus and its interactions with the host. **The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 11, n. 3, p. 393- 423, 1995.

DRISKELL, E. A.; RIDPATH, J. F. A survey of bovine viral diarrhoea virus testing in diagnostic laboratories in the United States from 2004 to 2005. **Journal of veterinary diagnostic investigation**, v. 18, n. 6, p. 600- 605, 2006.

EDMONDSON, M. A.; GIVENS, M. D.; WALZ, P. H.; GARD, J. A.; STRINGFELLOW, D. A.; CARSON, R. L. Comparison of tests for detection of bovine viral diarrhoea virus in diagnostic samples. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 19, n. 4, p. 376-81, 2007.

EDWARDS, S.; WOOD, L.; BROCKMAN, S.; IBATA, G. Clinical and virological observations of a mucosal disease outbreak with persistently-infected seropositive survivors. **Archives of Virology**, v. 3, p. 125- 132, 1991.

ELBERS, K.; TAUTZ, N.; BECHER, P.; STOLL, D.; RÜMENAPF, T.; THIEL, H. J. Processing in the pestivirus E2-NS2 region: identification of proteins p7 and E2p7. **Journal of Virology**, v. 70, n. 6, p. 4131-35, 1996.

EVERMANN, J. F.; BARRINGTON, G. M. Clinical features. In: GOYAL, S. M.; RIDPATH, J. F. **Bovine Viral Diarrhoea Virus: Diagnosis, Management and Control**. 1ª ed. Oxford, UK: Blackwell Publishing, 2005, p. 105-19.

FLORES, E. F. Diarréia Viral Bovina. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L.; LEMOS, R. A. A.; BORGES, J. R. J. (Org.). **Doenças de ruminantes e equídeos**. 3ª ed. Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil: Editora Pallotti, 2007a, p. 81-93.

FLORES, E. F. **Virologia Veterinária**. 1ª ed. Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil: Editora da UFSM, 2007b, p. 435-62.

FLORES, E. F. Vírus da diarreia viral bovina (BVDV). **Biológico**, v. 65, n.1-2, p. 3-9, 2003.

FLORES, E. F.; RIDPATH, J. F.; WEIBLEN, R.; VOGEL, F. S.; GIL, L. H.V. Phylogenetic analysis of Brazilian bovine viral diarrhea virus type 2 (BVDV-2) isolates: evidence for a subgenotype within BVDV-2. **Virus Research**, v. 87, n. 1, p. 51-60, 2002.

FLORES, E. F.; WEIBLEN R.; VOGEL, F. S. F.; ROEHE, P. M.; ALFIERI, A. A.; PITUCO, E. M. 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 –34, 2005.

FLORES, E. F.; BAUERMANN, F.; RIDPATH, J. Flaviviridae. In: FLORES, E. F. **Virologia Veterinária**. 2ª ed. Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil: Editora da UFSM, 2012, v. 1, p. 657-90.

FRANCKI, R. I. B.; FAUQUET, C. M.; KNUDSON, D. L.; BROWN, F. **Classification and Nomenclature of Viruses: Fifth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses**. 1ª ed. Red Lion, PA, U.S.A: Springer-Verlag Wien - Archives of Virology. Suplementação, 1991.

FRAY, M. D.; PATON, D. J.; ALENIUS, S. The effects of bovine viral diarrhea virus on cattle reproduction in relation to disease control. **Animal Reproduction Science**, v. 60, p. 615-27, 2000.

FREDERIKSEN, B.; PRESS, C. M.; SANDVIK, T.; ODEGAARD, S. A.; LOKEN, T. Detection of viral antigen in placenta and fetus of cattle acutely infected with bovine viral diarrhea virus. **Veterinary Pathology**, v. 36, n. 4, p. 267-75, 1999.

FULTON, R. W.; RIDPATH, J. F.; SALIKI, J. T.; BRIGGS, R. E.; CONFER, A. W.; BURGE, L. J.; PURDY, C. W.; LOAN, R. W.; DUFF, G. C.; PAYTON, M. E. Bovine viral diarrhea virus (BVDV) 1b: predominant BVDV subtype in calves with respiratory disease. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 66, n. 3, p. 181-90, 2002.

FULTON, R. W.; SALIKI, J. T.; CONFER, A. W.; BURGE, L. J.; D'OFFAY, J. M.; HELMAN, R. G.; BOLIN, S. R.; RIDPATH, J. F.; PAYTON, M. E. Bovine viral diarrhea virus cytopathic and noncytopathic biotypes and type 1 and 2 genotypes in diagnostic laboratory accessions: clinical and necropsy samples from cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.12, n. 1, p. 33-8, 2000.

GIANGASPERO, M.; HARASAWA, R.; ZECCONI, A.; LUZZAGO, C. Genotypic characteristics of Bovine viral diarrhea virus 2 strains isolated in northern Italy. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 63, n. 9, p. 1045-49, 2001.

GIANGASPERO, M.; HARASAWA, R. Numerical taxonomy of the genus Pestivirus based on palindromic nucleotide substitutions in the 5 untranslated region. **Journal of Virological Methods**, v. 146, n. 1-2, p. 375–88, 2007.

GIVENS, M. D.; MARLEY, M. S. Infectious causes of embryonic and fetal mortality. **Theriogenology**, v. 70, n. 3, p. 270-85, 2008.

GOENS, S. D. The evolution of Bovine Viral Diarrhea: a review. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 43, n. 12, p. 946-54, 2002.

GONDIM, A. C. L. O. **Diarréia viral bovina**. 2006, Curso de Pós-Graduação "Latu Sensu" em Produção e Reprodução de Bovinos, Universidade Castelo Branco- UCB. Brasília, Brasil, 2006.

GONG, Y.; TROWBRIDGE, R.; MACNAUGHTON, T. B.; WESTAWAY, E. G.; SHANNON, A. D.; GOWANS, E.J. Characterization of RNA synthesis during a one-step growth curve and of the replication mechanism of bovine viral diarrhoea virus. **Journal of General Virology**, v. 77, n.11, p. 2729-36, 1996.

GOYAL, S. M. Diagnosis. In: GOYAL, S. M.; RIDPATH, J. F. **Bovine Viral Diarrhoea Virus: Diagnosis, Management and Control**. 1ª ed. Oxford, UK: Blackwell Publishing, 2005, p. 197-209.

GRASSMANN, C. W.; ISKEN, O.; TAUTZ, N.; BEHRENS, S. E. Genetic analysis of the Pestivirus nonstructural coding region: defects in the NS5A unit can be complemented intrans. **Journal of Virology**, v. 75, n. 17, p. 7791-7802, 2001.

GREISER-WILKE, I.; GRUMMER, B.; MOENNIG, V. Bovine viral diarrhoea eradication and control programmes in Europe. **Biologicals**, v. 31, n. 2, p. 113-18, 2003.

GROOMS, D. L. Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhoea virus. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 20, n. 1, p. 5-19, 2004.

GROOMS, D. L. Reproductive losses caused by bovine viral diarrhoea virus and leptospirosis. **Theriogenology**, v. 66, n. 3, p. 624-28, 2006.

GROOMS, D. L.; BAKER, J. C.; AMES, T. R. Doenças causadas pelo vírus da diarréia viral bovina. In: SMITH, B. P. **Medicina Interna de Grandes Animais**. 3ª ed. São Paulo, Brasil: Editora Manole Biomedicina, 2006, p. 707-14.

GROOMS, D. L.; BROCK, K. V.; PATE, J. L.; DAY, M. L. Changes in ovarian follicles following acute infection with bovine viral diarrhoea virus. **Theriogenology**, v. 49, n. 3, p. 595-605, 1998.

GUNN, G. J.; STOTT, A. W.; HUMPHRY, R. W. Modelling and costing BVD outbreaks in beef herds. **The Veterinary Journal**, v. 167, n. 2, p.143-49, 2004.

HAMERS, C.; DEHAN, P.; COUVREUR, B.; LETELLIER, C.; KERKHOFS, P.; PASTORET, P. P. Diversity among bovine pestiviruses. **The Veterinary Journal**, v. 161, n. 2, p. 112-22, 2001.

HARADA, T.; TAUTZ, N.; THIEL, H. J. E2-p7 region of the bovine viral diarrhoea virus polyprotein: processing and functional studies. **Journal of Virology**, v. 74, n. 20, p. 9498-506, 2000.

HOFFMANN, B.; BEER, M.; REID, S. M.; MERTENS, P.; OURA, C. A. L.; VAN RIJN, P. A.; SLOMKA, M. J.; BANKS, J.; BROWN, I. H.; ALEXANDER, D. J.; KING, D. P. 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.

HOFFMANN, B.; DEPNER, K.; SCHIRRMIEIER, H.; BEER, M. A universal heterologous internal control system for duplex real-time RT-PCR assays used in a detection system for pestiviruses. **Journal of Virological Methods**, v. 136, n. 1-2, p. 200-09, 2006.

HORNBERG, A.; FERNÁNDEZ, S. R.; VOGL, C.; VILCEK, S.; MATT, M.; FINK, M.; KOFER, J.; SCHOPF, K. Genetic diversity of pestivirus isolates in cattle from Western Austria. **Veterinary Microbiology**, v. 135, n. 3-4, p. 205-13, 2009.

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

HOUE, H. Economic impact of BVD infection in dairies. **Biologicals**, v. 31, n. 2, p.137-43, 2003.

HOUE, H. Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections. **Veterinary Microbiology**, v. 64, n. 2- 3, p. 64- 89, 1999.

HOUE, H. Epidemiology of bovine viral diarrhoea virus. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 11, n. 3, p. 521-47, 1995.

HOUE, H.; LINDBERG, A.; MOENNIG, V. Test strategies in bovine viral diarrhoea virus control and eradication campaigns in Europe. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 18, n. 5, p. 427–36, 2006.

IMEA- Instituto Mato Grossense de Economia Agropecuária-IMEA–**Publicações**. Disponível em:

<<http://www.imea.com.br/publicacoes.php?categoria=2&subcategoria=2>>. Acesso em 12 mar. 2015.

INDEA- Instituto de Defesa Agropecuária-INDEA-MT – **Notícias**. Disponível em: <<http://www.indea.mt.gov.br/noticias>>. Acesso em 14 dez. 2014.

IVANYI-NAGY, R.; LAVERGNE, J. P.; GABUS, C.; FICHEUX, D.; DARLIX, J. L. RNA chaperoning and intrinsic disorder in the core proteins of *Flaviviridae*. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. 3, p. 712-25, 2008.

JACKOVA, A.; NOVACKOVA, M.; PELLETIER, C.; AUDEVAL, C.; GUENEAU, E.; HAFFAR, A.; PETIT, E.; REHBY, L.;VILCEK, S. The extended genetic diversity of BVDV-1: Typing of BVDV isolates from France. **Veterinary Research Communications**, v. 32, n. 1, p. 7- 11, 2008.

JOHNSON, C. M.; PEREZ, D. R.; FRENCH, R.; MERRICK, W. C.; DONIS, R. O. The NS5A protein of bovine viral diarrhoea virus interacts with the α subunit of translation elongation factor-1. **Journal of General Virology**, v. 82, n. 12, p. 2935-43, 2001.

JUNQUEIRA, J. R.; ALFIERI, A. A. Falhas da reprodução na pecuária bovina de corte com ênfase para causas infecciosas. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 27, n. 2, p. 289-98, 2006.

KADIR, Y.; CHRISTINE, F.; BARBARA, B. W.; ZEKI, Y.; FERAY, A.; AYKUT, O.; IBRAHIM, B.; SIBILINA CEDILLO, R.; HEINZ-JÜRGEN, T.; MATTHIAS, K. Genetic heterogeneity of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates from Turkey: Identification of a new subgroup in BVDV-1. **Veterinary Microbiology**, v. 130, n. 3-4, p. 258-67, 2008.

KAHN, C. M. **Manual Merck de Veterinária**. 9ª ed. São Paulo, Brasil: Editora Roca, 2008, p. 2336.

KALAYCIOGLU, A. T. Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) diversity and vaccination: A review. **Veterinary Quarterly**, v. 29, n. 2, p. 60-67, 2007.

KEELING, C. L. Planning bovine viral diarrhoea virus vaccination programs. **Veterinary Medicine**, v. 91, n. 9, p. 873-77, 1996.

KELLING, C. L. Evolution of bovine viral diarrhoea virus vaccines. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 20, n. 1, p. 115-29, 2004.

LACKNER, T.; MÜLLER, A.; KÖNIG, M.; THIEL, H. J.; TAUTZ, N. Persistence of bovine viral diarrhoea virus is determined by a cellular cofactor of a viral autoprotease. **Journal of Virology**, v. 79, n. 15, p. 9746-55, 2005.

LACKNER, T.; MULLER, A.; PANKRAZ, A.; BECHER, P.; THIEL, H. J.; GORBALENYA, A. E.; TAUTZ, N. Temporal modulation of an autoprotease is crucial for replication and pathogenicity of an RNA virus. **Journal of Virology**, v. 78, n. 19, p. 10765-775, 2004.

LAMBOT, M.; DOUART, A.; JORIS, E.; LETESSON, J. J.; PASTORET, P. P. Characterization of the immune response of cattle against non-cytopathic and cytopathic biotypes of bovine viral diarrhoea virus. **Journal of General Virology**, v. 78, n. 5, p. 1041-47, 1997.

LARSON, R. L. Management Systems and Control Programs. In: GOYAL, S. M.; RIDPATH, J. F. **Bovine Viral Diarrhoea Virus: Diagnosis, Management and Control**. 1ª ed. Oxford, UK: Blackwell Publishing, 2005, p. 223-38.

LAUREYNS, J.; RIBBENS, S.; KRUIF, A. Control of bovine virus diarrhoea at the herd level: Reducing the risk of false negatives in the detection of persistently infected cattle. **The Veterinary Journal**, v. 184, n. 1, p. 21-6, 2010.

LEE, K. M.; GILLESPIE, J. H. Propagation of virus diarrhoea virus of cattle in tissue culture. **American Journal of Veterinary Research**, v. 18, n. 69, p. 952-53, 1957.

LIEBLER-TENORIO, E. M. Pathogenesis. In: GOYAL, S. M., RIDPATH, J. F. **Bovine Viral Diarrhea Virus: Diagnosis, Management and Control**. 1^a ed. Oxford, UK: Blackwell Publishing, 2005, p. 121-43.

LINDBERG, A. L. Bovine viral diarrhea virus infections and its control: A review. **Veterinary Quarterly**, v. 25, n.1, p. 1- 16, 2003.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Flaviviridae: the viruses and their replication. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; GRIFFIN, D. E. **Fields Virology**. Philadelphia, PA, USA. Lippincot Williams e Williams, 2001, p. 991-1042.

LIU, L.; XIA, H.; WAHLBERG, N.; BELÁK, S.; BAULE, C. Phylogeny, classification and evolutionary insights into pestiviruses. **Virology**, v. 385, n. 2, p. 351-57, 2009.

LIU, L.; XIA, H.; BAULE, C.; BELAK, S.; WAHLBERG, N. Effects of methodology and analysis strategy on robustness of pestivirus phylogeny. **Virus Research**, v. 147, n. 1, p. 47-52, 2010.

MAPA- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Plano Agrícola e Pecuário 2011-2012 / Ministério da Agricultura, Pecuária e bastecimento**. Secretaria de Política Agrícola. – Brasília: Mapa/SPA, 2011.

MINAMI, F.; NAGAI, M.; ITO, M.; MATSUDA, T.; TAKAI, H.; JINKAWA, Y.; AKASHI, H. Reactivity and prevalence of neutralizing antibodies against Japanese strains of bovine viral diarrhea virus subgenotypes. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 34, n. 1, p. 35-9, 2011.

MOENNIG, V.; HOUE, H.; LINDBERG, A. BVD control in Europe: current status and perspectives. **Animal Health Research Reviews**, v. 6, n. 1, p. 63-74, 2005.

NAGAI, M.; HAYASHI, M.; ITOU, M.; FUKUTOMI, T.; AKASHI, H.; KIDA, H.; SAKODA, Y. Identification of new genetic subtypes of bovine viral diarrhea virus genotype 1 isolated in Japan. **Virus Genes**, v. 36, n. 1, p. 135-39. 2008.

NETTLETON, P. F.; ENTRICAN, G. Ruminant pestiviruses. **British Veterinary Journal**, v. 151, n. 6, p. 615-42, 1995.

OIE – World Organization for Animal Health. Chapter 2.4.8. – Bovine Viral Diarrhea. In: Terrestrial Animal Health Code. **OIE Terrestrial Manual**. 2008, p. 698-711.

OLAFSON, P.; MCCALLUM, A.; FOX, F. An apparently new transmissible disease of cattle. **The Cornell Veterinarian**, v. 36, p. 205-13, 1946.

PASSLER, T.; WALZ, P. H.; DITCHKOFF, S. S.; GIVENS, M. D.; MAXWELL H. S.; BROCK K. V. Experimental persistent infection with bovine viral diarrhea virus in white-tailed deer. **Veterinary Microbiology**, v. 122, n. 3-4, p. 350-56, 2007.

PELLERIN, C.; VAN DEN HURK, J.; LECOMTE, J.; TIJSSEN, P. Identification of a new group of bovine viral diarrhea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. **Virology**, v. 203, n. 2, p. 260-68, 1994.

PETERHANS, E.; SCHWEIZER, M. Pestiviruses: How to outmaneuver your hosts. **Veterinary Microbiology**, v. 142, n. 1-2, p. 18-25, 2010.

PILZ, D.; ALFIERI, A. F.; LUNARDI, M.; ALFIERI, A. A. RT-PCR em pools de soro sanguíneos para o diagnóstico da infecção aguda e de animais persistentemente infectados pelo vírus da diarreia viral bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n.1, p. 1-7, 2007.

PITUCO, E. M.; DEL FAVA, C. Situação do BVDV na América do Sul. In: Simpósio Internacional sobre Herpesvírus Bovino (tipo 1 e 5), 1998, Santa Maria. **Anais do Simpósio Internacional sobre Herpesvírus Bovino (tipo 1 e 5)**. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria- UFSM, 1998, p. 49-57.

POTGIETER, L. N. D. Bovine viral diarrhea and mucosal disease. In: COETZER, J. A. W.; TUSTIN, R. C. **Infectious Diseases of Livestock**. 2ª ed. Cape Town: Orford University Press, 2004, p. 946-69.

QU, L.; McMULLAN L. K.; RICE, C. M. Isolation and characterization of noncytopathic pestivirus mutants reveals a role for nonstructural protein NS4B in viral cytopathogenicity. **Journal of Virology**, v. 75, n. 22, p. 10651-662, 2001.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. **Clínica Veterinária: Um tratado de Doenças dos Bovinos, Ovinos, Suínos, Caprinos e Equinos**. 9ª ed. Rio de Janeiro, Brasil: Editora Guanabara Koogan, 2002, p.406.

RIDPATH, J. F. Bovine viral diarrhea virus: global status. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 26, n. 1, p. 105-21, 2010.

RIDPATH, J. F. BVDV genotypes and biotypes: practical implications for diagnosis and control. **Biologicals**, v. 31, n.2, p. 127-31, 2003.

RIDPATH, J. F. Classification and Molecular Biology. In: GOYAL, S. M., RIDPATH, J. F. **Bovine Viral Diarrhea Virus: Diagnosis, Management and Control**. 1ª ed. Oxford, UK: Blackwell Publishing, 2005a, p. 65-80.

RIDPATH, J. F. Practical significance of heterogeneity among BVDV strains: impact of biotype and genotype on U.S. control programs. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 72, n. 1, p. 17-30, 2005b.

RIDPATH, J. F.; BENDFELDT, S.; NEILL, J. D.; LIEBLER TENORIO, E. Lymphocytopathogenic activity in vitro correlates with high virulence in vivo for BVDV type 2 strains: Criteria for a third biotype of BVDV. **Virus Research**, v. 118, n. 1-2, p. 62-9, 2006.

RIDPATH, J. F.; BOLIN, S. R. Differentiation of types 1a, 1b and 2 bovine viral diarrhea virus (BVDV) by PCR. **Molecular and Cellular Probes**, v. 12, n. 2, p. 101-6, 1998.

RIDPATH, J. F.; FLORES, E. F. Flaviviridae. In: FLORES, E. F. (Org) **Virologia Veterinária**. 1ª ed. Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil: Editora da UFSM, 2007, p. 563-92.

RIDPATH, J. F.; FULTON, R. W. Knowledge gaps impacting the development of bovine viral diarrhoea virus control programs in the United States. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 235, n. 10, p. 1171-79, 2009.

RIDPATH, J. F.; GOYAL, S. M. Conclusions and Future Research. In: GOYAL, S. M., RIDPATH, J. F. **Bovine Viral Diarrhoea Virus: Diagnosis, Management and Control**. 1ª ed. Oxford, UK: Blackwell Publishing, 2005, p. 239-43.

RIDPATH, J. F.; BOLIN, S. R.; DUBOVI, E. J. Segregation of bovine viral diarrhoea virus into genotypes. **Virology**, v. 205, n. 1, p. 66-74, 1994.

ROEHE, P. M.; OLIVEIRA, E. A. S.; OLIVEIRA, L. G.; MUNOZ, J. C. P. A. A situação do vírus da Diarréia Viral Bovina no País. In: Simpósio Internacional sobre Herpesvírus Bovino (tipo 1 e 5), 1998, Santa Maria. **Anais do Simpósio Internacional sobre Herpesvírus Bovino (tipo 1 e 5)**. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria- UFSM, 1998, p. 39- 48.

RONECKER, S.; ZIMMER, G.; HERRLER, G.; GREISER-WILKE, I.; GRUMMER, B. Formation of bovine viral diarrhoea virus E1–E2 heterodimers is essential for virus entry and depends on charged residues in the transmembrane domains. **Journal of General Virology**, v. 89, n. 9, p. 2114-21, 2008.

SANDVIK, T. Laboratory diagnostic investigations for bovine viral diarrhoea virus infections in cattle. **Veterinary Microbiology**, v. 64, n. 2-3, p. 123–34, 1999.

SCHIRRMIEIER, H.; STREBELOW, G.; DEPNER, K.; HOFFMANN, B.; BEER, M. Genetic and antigenic characterization of an atypical pestivirus isolate, a putative member of a novel pestivirus species. **Journal of General Virology**, v. 85, n. 12, p. 3647–52, 2004.

SCHMITT, B. J.; LOPEZ, O. J.; RIDPATH, J. F.; GALEOTAWHEELER, J.; OSORIO, F. A. Evaluation of PCR for diagnosis of bovine viral diarrhoea virus in tissue-homogenates. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 6, n. 1, p. 44-7, 1994.

SMITH, R. L.; SANDERSON, M. W.; RENTER, D. G.; LARSON, R. L.; WHITE, B. J. A stochastic model to assess the risk of introduction of bovine viral diarrhoea virus to beef cow-calf herds. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 88, n. 2, p. 101-8, 2009.

STAHL, K.; ALENIUS, S. BVDV control and eradication in Europe - an update. **Japanese Journal of Veterinary Research**, v. 60, n. 4, p. 31-9, 2012.

STAHL, K.; BEER, M.; SCHIRRMIEIER, H.; HOFFMANN, B.; BELÁK, S.; ALENIUS, S. Atypical 'HoBi'-like pestiviruses - recent findings and implications thereof. **Veterinary microbiology**, v. 142, n. 1, p. 90-3, 2010

STAHL, K.; KAMPA, J.; ALENIUS, S.; PERSSON WADMAN, A.; BAULE, C.; AIUMLAMAI, S.; BELÁK, S. 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, n. 3, p. 517-23, 2007.

STALDER, H. P.; MEIER, P. H.; PFAFFEN, G.; WAGECK-CANAL, C.; RUFENACHT, J.; SCHALLER, P.; BACHOFEN, C.; MARTI, S.; VOGT, H. R.; PETERHANS, E. Genetic heterogeneity of pestiviruses of ruminants in Switzerland. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 72, n. 1–2, p. 37–41, 2005.

STARK, R.; MEYERS, G.; RÜMENAPF, T.; THIEL, H. J. Processing of pestivirus polyprotein: cleavage site between autoprotease and nucleocapsid protein of classical swine fever virus. **Journal of virology**, v. 67, n. 12, p. 7088-95, 1993.

TAJIMA, M.; DUBOVI, E.J. Genetic and clinical analyses of bovine viral diarrhea virus isolates from dairy operations in the United States of America. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 17, n. 1, p. 10–15, 2005.

TAJIMA, M.; FREY, H. R.; YAMATO, O.; MAEDE, Y.; MOENNIG, V.; SCHOLZ, H.; GREISER-WILKE, I. Prevalence of genotypes 1 and 2 of bovine viral diarrhea virus in Lower Saxony, Germany. **Virus Research**, v. 76, n. 1, p. 31- 42, 2001.

TAKIUCHI, E.; MÉDICI, K. C.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Bovine herpesvirus type 1 abortions detected by a semi nested-PCR in Brazilian cattle herds. **Research in Veterinary Science**, v. 79, n. 1, p. 85- 88, 2005.

TAUTZ, N.; KAISER, A.; THIEL, H. J. NS3 serine protease of bovine viral diarrhea virus: characterization of active site residues, NS4A cofactor domain, and protease-cofactor interactions. **Virology**, v. 273, n. 2, p. 351-63, 2000.

TAUTZ, N.; MEYERS, G.; THIEL, H. J. Pathogenesis of mucosal disease, a deadly disease of cattle caused by a pestivirus. **Clinical and Diagnostic Virology**, v.10, n. 2-3, p. 121-27,1998.

THURMOND, M. C. Virus Transmission. In: GOYAL, S. M., RIDPATH, J. F. **Bovine Viral Diarrhea Virus: Diagnosis, Management and Control**. 1^a ed. Oxford, UK: Blackwell Publishing, 2005, p. 91-104.

VALLE, P. S.; SKJERVE, E.; MARTIN, S. W.; LARSEN, R. B.; OSTERAS, O.; NYBERG, O. Ten years of bovine virus diarrhea virus (BVDV) control in Norway: a cost-benefit analysis. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 72, n. 1-2, p. 189-207, 2005.

VAN OIRSCHOT, J. T.; BRUSCHKE, C. J. M.; VAN RIJN, P. A. Vaccination of cattle against bovine viral diarrhea. **Veterinary Microbiology**, v. 64, n. 2-3, p. 169-83, 1999.

VIDOR, T. Isolamento e identificação do vírus da Doença das Mucosas no Rio Grande do Sul. **Boletim do Instituto de Pesquisas Veterinárias (Supl. Esp.)**, v. Esp., n. 2, p. 51-8, 1974.

VILCEK, S.; HERRING, A. J.; HERRING, J. A.; NETTLETON, P. F.; LOWINGS, J. P.; PATON, D. J. Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. **Archives of Virology**, v. 136, n. 3-4, p. 309-23, 1994.

VILCEK, S.; NETTLETON, P. F. Pestiviruses in wild animals. **Veterinary Microbiology**, v. 116, n. 1, p. 1–12, 2006.

VILCEK, S.; PATON, D. J.; DURKOVIC, B.; STROJNY, L.; IBATA, G.; MOUSSA, A.; LOITSCH, A.; ROSSMANITH, W.; VEGA, S.; SCICLUNA, M. T.; PALFI, V. Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups. **Archives of Virology**, v. 146, n. 1, p. 90-115, 2001.

VILCEK, S.; RIDPATH, J. F.; VAN CAMPEN, H.; CAVENDER, J. L.; WARG, J. Characterization of a novel pestivirus originating from a pronghorn antelope. **Virus Research**, v. 108, n. 1-2, p. 187-93, 2005.

VOGEL, F. S. F.; SCHERER, C. F. C.; FLORES E. F.; WEIBLEN, R.; LIMA, M.; KUNRATH, C. F. Resposta sorológica e avaliação de proteção fetal em ovelhas prenhes vacinadas contra o vírus da diarréia viral bovina (BVDV). **Ciência Rural**, v. 31, n. 5, p. 831-38, 2001.

VOGES, H.; HORNER, G. W.; ROWE, S.; WELLENBERG, G. J. Persistent bovine pestivirus infection localized in the testes of an immune-competent, non-viraemic bull. **Veterinary Microbiology**, v. 61, n. 3, p.165-75, 1998.

WEGELT, A.; REIMANN, I.; ZEMKE, J.; BEER, M. New insights into processing of bovine viral diarrhoea virus glycoproteins Erns and E1. **Journal of General Virology**, v. 90, n. 10, p. 2462-67, 2009.

WEILAND, F.; WEILAND, E.; UNGER, G.; SAALM, A.; THIEL, H. J. Localization of pestiviral envelope proteins Erns and E2 at the cell surface and on isolated particles. **Journal of General Virology**, v. 80, n. 5, p. 1157-65, 1999.

WITTUM, T. E.; GROTELUESCHEN, D. M.; BROCK, K. V.; KVASNICKA, W. G.; FLOYD, J. G.; KELLING, C. L.; ODDE, K. G. Persistent bovine viral diarrhoea virus infection in US beef herds. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 49, n. 1-2, p. 83-94, 2001.

XIA, H.; LIU, L.; WAHLBERG, N.; BAULE, C.; BELÁK, S. Molecular phylogenetic analysis of bovine viral diarrhoea virus: A Bayesian approach. **Virus Research**, v. 130, n. 1-2, p. 53-62, 2007.

ZHONG, W.; GUTSHALL, L. L.; DEL VECCHIO, A. M. Identification and characterization of an RNA-dependent RNA polymerase activity within the nonstructural protein 5B region of bovine viral diarrhoea virus. **Journal of Virology**, v. 72, n. 11, p. 9365-69, 1998.

3 - OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a presença do vírus da diarreia viral bovina no sêmen de touros no Estado de Mato Grosso pela técnica da RT-PCR.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer o diagnóstico etiológico e molecular por meio da técnica RT-PCR para infecção por BVDV nos touros avaliados;
- Classificar o biótipo das cepas virais identificadas;
- Sequenciar os produtos obtidos anteriormente por meio da PCR;
- Correlacionar à ocorrência da eliminação do BVDV através do sêmen; com a idade dos touros comprovadamente infectados.

4 – ARTIGO

AVALIAÇÃO DA EXCREÇÃO DO VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA (BVDV) NO SÊMEN DE TOUROS DE REBANHOS DO ESTADO DE MATO GROSSO POR MEIO DA RT-PCR

RESUMO

COSTA, S. R. Avaliação da excreção do vírus da diarreia viral bovina (BVDV) no sêmen de touros de rebanhos do Estado de Mato Grosso por meio da RT-PCR. 2015. Dissertação (Mestrado Biociência Animal) – Universidade de Cuiabá, Cuiabá, 2015.

Devido às consequências causadas pela infecção do BVDV, o mesmo passou a ter relevante destaque no cenário da bovinocultura, evidenciando a necessidade de um melhor entendimento da forma de transmissão venérea. Nesse sentido, é fundamental verificar o papel do touro como disseminador do vírus para fêmeas, por meio do sêmen, para que, futuramente, possam ser implementadas estratégias de controle e prevenção adequadas e direcionadas às formas de manejo nos rebanhos do Estado. Deste modo, a pesquisa teve como objetivo investigar a presença do vírus da diarreia viral bovina no sêmen de touros do Estado de Mato Grosso. Para isso, um total de 64 amostras de sêmen *in natura* de touros, provenientes de rebanhos distintos no Estado de Mato Grosso, foram submetidas à RT-PCR para amplificação da região 5'UTR do genoma do BVDV, utilizando os primers 324 e 326. Todas as amostras foram diluídas em água DEPC a 50% (v/v), ainda, foram empregados controles positivo e negativo em todo o processo. Os resultados dos controles positivos e negativos citados anteriormente foram satisfatórios, fato que validou os procedimentos empregados no diagnóstico molecular estabelecido no presente trabalho. Deste modo, a ausência de excreção do BVDV no sêmen dos touros avaliados neste estudo pode ser explicada pelo fato de todos os animais estudados serem provenientes de rebanhos com manejo extensivo. Tais rebanhos eram, em sua maioria, caracterizados pela baixa rotatividade de animais e também pela reprodução por meio da monta natural. Portanto, estudos mais abrangentes deveriam ser conduzidos nestas e outras regiões, devido à identificação prévia do vírus no Estado, assim como a prevalência estabelecida nos Estados vizinhos, em níveis elevados, evidenciando o risco de transmissão aos animais suscetíveis, inclusive por via venérea.

Palavras-chave: BVDV; infecção natural; RT-PCR; sêmen.

EVALUATION OF EXCRETION OF BOVINE VIRAL DIARRHEA VIRUS (BVDV) IN SEMEN OF BULLS FROM CATTLE HERDS FROM MATO GROSSO STATE THROUGH RT-PCR

ABSTRACT

COSTA, S. R. Evaluation of excretion of bovine viral diarrhea virus (BVDV) in semen of bulls from cattle herds from Mato Grosso State through RT-PCR. 2015. Dissertation (Master Science in Animal Bioscience) - University of Cuiaba, Cuiaba, 2015.

Due to the consequences caused by BVDV infection, this viral agent became relevant to cattle industry, suggesting a need for better understanding of the form of venereal transmission. In this sense, evaluating the potential of the bulls as disseminators of the virus to females through semen is critical for the future, allowing implementation of appropriate control and prevention strategies and targeted forms of management in state herds. Thus this research aimed to investigate the presence of bovine viral diarrhea virus in the semen of bulls from State of Mato Grosso. A total of 64 samples of semen *in natura* from bulls from different herds in Mato Grosso underwent RT-PCR for amplification of the 5'UTR region of the genome of BVDV, using the primers 324 and 326. All samples were previously diluted (50%, v/v) in DEPC water, and positive and negative controls were used in the whole process. The results of positive and negative controls mentioned above were satisfactory, validating all procedures used in this work. Thus the absence of BVDV excretion in the semen of bulls evaluated in this study may be explained by the fact that all studied animals came from herds with extensive management. Such herds were mostly characterized by low turnover of animals and also for reproduction through natural mating. Therefore more comprehensive studies should be conducted in these and other regions, due to previous confirmation of circulation of the virus in the state, as well as the established high prevalence in neighboring states, highlighting the risk of transmission in susceptible animals, maybe through venereal.

Keywords: BVDV; infection nature; RT-PCR; semen.

INTRODUÇÃO

O vírus da diarreia viral bovina (BVDV) é membro do gênero *Pestivirus*, o qual está classificado na família *Flaviviridae*, juntamente com o vírus da peste suína clássica (CSFV) e o vírus da doença das fronteiras (BDV) (POTIGIETER, 2004; RIDPATH, 2005; RIDPATH; FLORES, 2007).

A primeira descrição de quadros clínicos associados com sua infecção ocorreu em 1946 (OLAFSON; MCCALLUM; FOX, 1946). Durante os últimos 60 anos, ocorreram avanços no conhecimento de aspectos relacionados ao vírus e a enfermidade, tais como a determinação dos biótipos e genótipos do BVDV, a produção de anticorpos monoclonais utilizados nos estudos das cepas variantes, o sequenciamento do genoma viral, elucidação de mecanismos da ação imunossupressiva na infecção aguda, do desenvolvimento da infecção persistente e da doença das mucosas (DM) (BROCK, 2004; RIDPATH; GOYAL, 2005).

Com base em análises filogenéticas, o BVDV é classificado em duas diferentes espécies BVDV1 e BVDV2 (LIU et al., 2009; RIDPATH, 2003, 2010), havendo ainda, subdivisões. Na espécie BVDV1, 12 subgenótipos (BVDV1a – BVDV1l) já foram identificados, enquanto na espécie BVDV2, pelo menos dois subgenótipos (BVDV2a e BVDV2b) são reconhecidos (VILCEK et al., 2001; FLORES et al., 2002). Além disso, atualmente, considera-se a existência de um terceiro genótipo denominado BVDV3 ou HoBi-like vírus (LIU et al., 2009; DECARO et al., 2014; WEBER et al., 2014).

O vírus também pode ser classificado em dois biótipos: citopático (CP) e não-citopático (NCP), que se diferenciam, respectivamente, pela capacidade de causarem, ou não, efeito citopático nas células infectadas ao se replicarem (HAMERS et al., 2001; LINDENBACH; RICE, 2001; VOGEL et al., 2001).

Em relação aos aspectos patológicos do vírus sobre a reprodução, nota-se que não está limitada apenas a abortos ou malformações congênitas, estando também vinculada a falhas antes mesmo da concepção, durante a fecundação e nos primeiros dias de vida do embrião, ocasionadas pelo tropismo do vírus por células germinativas de ambos os sexos (JUNQUEIRA; ALFIERI, 2006).

Devido às consequências descritas pela infecção do BVDV, o mesmo passou a ter relevante destaque no cenário da bovinocultura, evidenciando a necessidade de um melhor entendimento da forma de transmissão venérea. Nesse

sentido, é fundamental verificar o papel do touro como disseminador do vírus para fêmeas, por meio do sêmen, para que, futuramente, possam ser implementadas estratégias de controle e prevenção adequadas e direcionadas às formas de manejo nos rebanhos do Estado. Deste modo, a presente pesquisa teve como objetivo investigar a presença do BVDV no sêmen de touros naturalmente infectados por meio da transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) no Estado de Mato Grosso.

MATERIAL E MÉTODOS

AMOSTRAS CLÍNICAS

Neste estudo, 64 touros provenientes de rebanhos distintos, cujas propriedades estão localizadas em quatro das sete macrorregiões que dividem o Estado, tiveram o sêmen examinados quanto à excreção do BVDV (Figura 1).

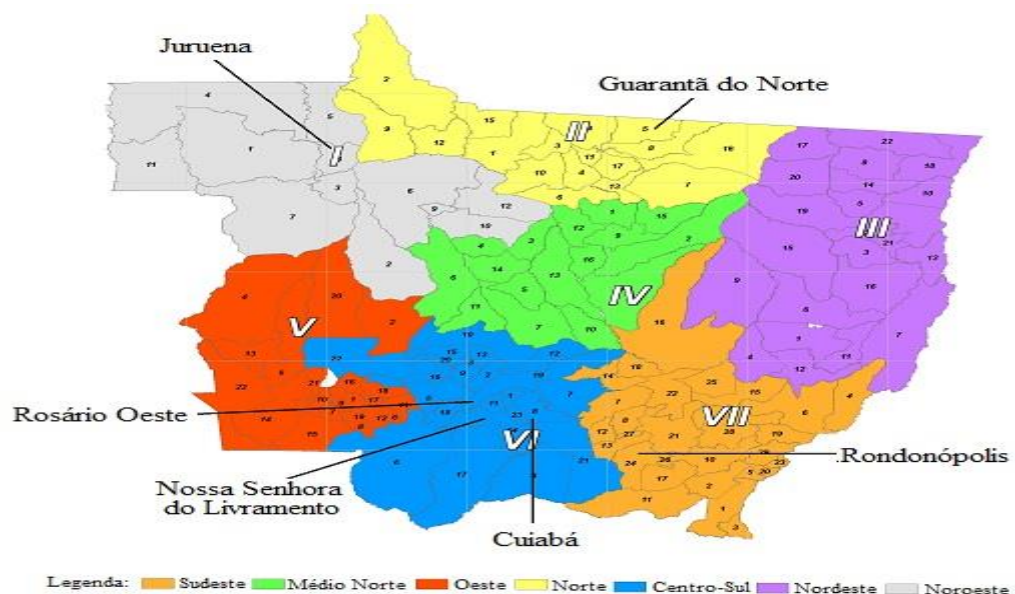


Figura 1- Municípios e localização dos rebanhos destinados a avaliação da presença do BVDV, de acordo com as divisões das sete macrorregiões de Mato Grosso.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os rebanhos avaliados são provenientes de seis diferentes propriedades, cuja principal atividade consiste na criação de gado de corte, localizadas nos municípios de Juruena, Guarantã do Norte, Rondonópolis, Cuiabá, Rosário Oeste e Nossa Senhora do Livramento, pertencentes respectivamente às macrorregiões Noroeste, Norte, Sudeste e Centro sul, do Estado de Mato Grosso.

Os touros que tiveram o sêmen avaliado foram selecionados aleatoriamente em cada rebanho incluído no estudo, sendo que o número de reprodutores selecionados variou de cinco a 15 animais por propriedade.

Dez animais foram selecionados da propriedade localizada no município de Nossa Senhora do Livramento, com idade variando de 28 a 33 meses, 15 animais do município de Rosário Oeste, com idade entre 28 a 39 meses, oito animais do município de Rondonópolis, com 28 a 48 meses de idade, seis animais do município de Cuiabá, com idade variando de 30 meses a 10 anos, cinco animais do município de Guarantã do Norte, com 10 anos de idade, 15 animais do município de Juruena, com idade entre 30 a 33 meses, e por fim, outra propriedade, também no município de Cuiabá, com cinco animais com 30 meses de idade. Todos os touros eram oriundos de rebanhos sem histórico de problemas reprodutivos e não vacinados contra o BVDV, com idade superior a 24 meses, sendo sexualmente maduros e, portanto, encontravam-se em plena atividade reprodutiva.

Para a avaliação molecular da presença do BVDV, foram coletadas alíquotas de sêmen *in natura*, por meio do emprego de eletroejaculador, seguindo rigorosamente protocolos de segurança e bem-estar animal, também assegurado pelo comitê de ética, ocorrido no período de 2014 e 2015. Posteriormente à coleta e identificação das amostras, foram preenchidos formulários com informações relevantes de cada animal. Por fim, 1 mL do sêmen *in natura* dos touros foram armazenadas imediatamente a -20°C, até a extração de RNA.

EXTRAÇÃO DE RNA

Inicialmente, as amostras de sêmen foram diluídas em água DEPC 50% (v/v). A extração do RNA total foi posteriormente realizada utilizando o TRIzol LS (Invitrogen), conforme recomendações do fabricante. Para tanto, o RNA total foi purificado a partir de alíquotas de 250µL de sêmen por meio de separação em fase líquida utilizando mistura de tiocianato de guanidina e fenol em solução monofásica. Após o procedimento da extração, alíquotas de 30µL de RNA foram mantidas a -20°C até a sua utilização na RT-PCR.

Alíquotas de 250 µL de água ultrapura estéril foram utilizadas como controle negativo e, como controle positivo foi utilizado 225µL de sêmen negativo para presença do BVDV, contaminado com 25µL da cepa viral NADL cultivada em células MDBK.

TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT)

Nas reações de RT foram empregados 9µL de RNA purificado e 20 pmol do *primer* com polaridade negativa (326), os quais foram submetidos à desnaturação a 97°C durante 4 minutos. Posteriormente, as reações foram mantidas em banho de gelo por 5 min. Após esta etapa foi adicionado 20µL do RT-mix, contendo 0,25 mM de cada dNTP (Invitrogen), 1x tampão de PCR (20 mM Tris-HCl pH 8,4 e 50 mM KCl), 1,5 mM MgCl₂, 60 U da enzima transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen) e água estéril ultrapura, ao RNA anteriormente desnaturado. A síntese do cDNA foi realizada em termociclador a 42°C por 30 minutos. Posteriormente a enzima M-MLV foi inativada a 95°C por 5 minutos. Posteriormente, o cDNA assim obtido foi mantido a -20°C, até a sua utilização na PCR.

PCR PARA A REGIÃO 5'UTR

A PCR foi realizada em uma solução contendo 5µL do cDNA anteriormente obtido e 45µL de PCR-mix, constituído por 20 pmol de cada um dos *primers* 326 (5'TCAACTCCATGTGCCATGTAC 3') e 324 (5'ATGCCCWTAGTAGGACTAGCA 3'), selecionados para amplificar um fragmento de 288 pb da região 5'UTR do genoma do BVDV (VILCEK et al., 1994), 0,2 mM de cada dNTP, 5µL do PCR-tampão 10x (20 mM Tris-HCl pH 8,4 e 50 mM de KCl), 1,5 mM MgCl₂, 0,5 U Platinum *Taq* DNA polimerase e 34µL H₂O ultrapura estéril para um volume final de 50µL.

A amplificação foi realizada em um termociclador, utilizando as seguintes condições de tempo e temperatura: (i) uma etapa de 4 minutos por 94°C, (ii) 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 30 segundos a 52°C, 1 minuto a 72°C e (iii) uma etapa de extensão final de 7 minutos a 72°C.

ANÁLISE DOS PRODUTOS DA RT-PCR

Alíquotas de 5µL dos produtos da RT-PCR foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL), em tampão TBE pH 8,4 (89 mM Tris-HCl; 89 mM ácido bórico; 2 mM EDTA), sob voltagem constante (90V) por aproximadamente 45 minutos. Os géis foram visualizados em transluminador sob luz ultravioleta e fotodocumentados em sistema digital.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta investigação, a excreção do BVDV no sêmen não foi verificada nos 64 touros avaliados, sendo que o genoma viral não pode ser amplificado, pela técnica da RT-PCR empregada, a partir das amostras de sêmen coletadas.

Entre as técnicas disponíveis para a realização do diagnóstico etiológico do BVDV, a técnica da RT-PCR, utilizando primers que anelam na região 5'UTR, tida como altamente conservada entre os representantes do gênero *Pestivirus*, tem se mostrado adequada para a detecção do agente a partir de diferentes amostras biológicas. Dentre elas, a amplificação utilizando o par de primers 324/326 é amplamente difundida (VILCEK et al., 1994). Diversos grupos de pesquisadores obtiveram êxito na amplificação de fragmentos parciais da região 5'UTR do genoma do BVDV, mesmo a partir de diferentes materiais biológicos como fragmentos de orelha (SANTOS et al., 2011), tecidos (PFEFFER et al., 2000), soro (LIU et al., 2013; LARSKA; KUTA; POLAK, 2013), sêmen (SHARIFZADEH; DOOSTI; DEHKORDI, 2011; ALTAMIRANDA et al., 2012), leite (RENSHAW; RAY; DUBOVI, 2000) e até mesmo blastocistos produzidos *in vitro* (GALUPPO et al., 2013).

Além do exposto acima, a técnica de RT-PCR foi empregada neste estudo também pelo fato de apresentar alta taxa de sensibilidade e especificidade, possibilitando a detecção de sequências virais mesmo em amostras com títulos muito baixos ou muito diluídas (PILZ et al., 2005, 2007).

Diante do fato das cepas virais caracterizadas a partir dos rebanhos brasileiros se apresentam com alta variabilidade genética e antigênica, tem-se uma consequente limitação no emprego das técnicas de diagnóstico sorológico para infecção pelo BVDV, havendo a possibilidade da obtenção de resultados falso-negativos quando da realização das mesmas (CORTEZ et al., 2006). Portanto, a utilização da técnica RT-PCR, empregando primers que anelam na região altamente conservada 5'UTR, para a identificação do vírus em diversos materiais biológicos torna-se imprescindível para evitar erros no diagnóstico dessas infecções.

Com o intuito de diminuir a ação de inibidores presentes no sêmen, as amostras de sêmen avaliadas nesta investigação foram previamente diluídas em água DEPC a 50% (v/v). A importância da interferência desses inibidores na capacidade de amplificação do RNA viral pela técnica de RT-PCR foi corroborada por pesquisadores como Givens et al. (2003). Ainda, acompanhando todas as

reações de RT-PCR, foi sempre empregado um controle positivo, assim como um controle negativo. Os resultados dos controles positivos e negativos citados anteriormente foram satisfatórios, fato que validou os procedimentos empregados no diagnóstico molecular estabelecido no presente trabalho.

A excreção do BVDV no sêmen de animais infectados tem sido verificada, de maneira satisfatória, por meio da RT-PCR, ou de variações dessa técnica, em várias regiões do mundo, sendo que esta técnica pode ser considerada como superior frente ao isolamento viral (GIVENS et al., 2003). Na Argentina, em rebanho de corte vacinado contra o vírus, apresentando perdas reprodutivas, nascimento de animais com defeitos congênitos e doença das mucosas, o BVDV foi amplificado tanto no sêmen de animais PIs quanto no sêmen comercial contaminado utilizado para a inseminação artificial do rebanho (ALTAMIRANDA et al., 2012). No sudoeste dos EUA, 558 touros com idade média de 24 meses, provenientes de 172 fazendas localizadas em quatro Estados diferentes, tiveram alíquota do sêmen testada por RT-nPCR e isolamento viral. A excreção do BVDV no sêmen dos animais avaliados não foi evidenciada por nenhuma das técnicas empregadas (GIVENS et al., 2003).

Diante das vantagens do uso da técnica, Sharifzadeh, Doosti e Dehkordi, no ano de 2011, avaliaram a presença do BVDV em amostras de sêmen de touros Iranianos naturalmente infectados e destinados a inseminação artificial (IA), utilizando a técnica molecular de RT-PCR para amplificar um fragmento na região 5' UTR. Deste modo, dentre os 172 reprodutores avaliados, foi demonstrada a excreção do BVDV no sêmen de 32 animais. Tais resultados mostraram a efetividade da técnica descrita, pela rapidez, eficiência e redução de custo para detecção destas infecções virais em bovinos. Outra contribuição deste estudo está na indicação de que a eliminação do vírus por meio do sêmen pode constituir importante via de transmissão da infecção para os rebanhos, destacando a necessidade de implementação de programas de controle e erradicação, tais como programas de vacinação, para prevenir e reduzir as perdas econômicas ocasionadas pela infecção em bovinos.

A circulação do BVDV nos rebanhos bovinos brasileiros, de diversos Estados e regiões geográficas, vem sendo confirmada tanto por diagnóstico etiológico (CORTEZ et al., 2006) como sorológico (DIAS et al., 2003). Várias investigações têm apontado para uma prevalência em bovinos variando de 22 a 70% e 58 a 90% para rebanhos (CANAL et al., 1998; POLETTO et al., 2004; THOMPSON

et al., 2006; QUINCOZES et al., 2007; FRANDOLOSO et al., 2008; BRITO et al., 2010). As três espécies virais ou genótipos (BVDV1, 2 e 3), assim como seus subgenótipos, já foram caracterizados a partir de animais infectados apresentando quadros respiratórios, gastroentéricos, falhas reprodutivas ou infecções persistentes de rebanhos nacionais (CORTEZ et al., 2006).

Considerando os dados sorológicos disponíveis, os índices oscilam entre 64% e 74% em diversas regiões (ALFIERI, 2004 apud FLORES et al., 2005) que fazem fronteira com o Estado de Mato Grosso, como Goiás (64%), Mato Grosso do Sul (74,5%), Rondônia (67,1%), sendo que o Mato Grosso apresenta índice de 68,4% de soropositivos. Esses dados atestam a circulação do vírus em regiões próximas ao Estado de Mato Grosso, o qual se destaca pela bovinocultura, ao possuir o maior rebanho bovino do Brasil. Além disso, a presença do BVDV foi confirmada anteriormente no Estado de Mato Grosso, através da amplificação por RT-PCR seguida de sequenciamento, que indicou a circulação de cepa viral pertencente ao subgenótipo 1a em caso de doença respiratória (CORTEZ et al., 2006).

Até o presente momento, não há relatos na literatura consultada sobre a investigação da excreção do BVDV, por meio da técnica RT-PCR, no sêmen de touros naturalmente infectados no Brasil, embora a técnica seja amplamente admitida como padrão internacional para avaliação da presença do BVDV.

Atualmente, sabe-se que o BVDV está associado a perdas econômicas tanto pela queda na produtividade de animais apresentando sinais clínicos como devido ao prejuízo no desempenho reprodutivo de animais infectados (GREGG et al., 2010). Adicionalmente, diversos trabalhos vêm indicando que touros infectados de forma aguda ou persistente eliminam o vírus por meio do sêmen, proporcionando, dessa maneira, uma via de transmissão eficiente para as fêmeas, através da monta natural ou por meio da IA (HOUE, 1999; KIRKLAND et al., 1991, 1994). Além disso, vários estudos têm apontado para a possibilidade de ocorrência de infecções testiculares persistentes em animais que sofreram infecções agudas, mesmo após a soroconversão e impossibilidade de recuperação do agente viral do sangue. Em um destes casos, a detecção do vírus no sêmen foi realizada durante toda a vida produtiva do touro (GIVENS et al., 2003; VOGES et al., 1998).

Por estas razões, o BVDV é considerado um agente patogênico que potencialmente interfere na aplicação segura de técnicas de reprodução assistida,

pois mesmo após a criopreservação ou processamento do sêmen para a IA, a capacidade infectante dos vírions pode permanecer preservada (GARD et al., 2007, 2009; GIVENS et al., 2006; WALZ et al., 2008; ALTAMIRANDA et al., 2012). Inclusive, a constatação da circulação de cepas virais apresentando o mesmo perfil genético em rebanhos bovinos pertencentes às regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil, levanta a hipótese de que a transmissão do BVDV poderia ter ocorrido pelo transporte de animais infectados ou até mesmo pela utilização de sêmen ou embriões infectados e criopreservados (CORTEZ et al., 2006). Diante destes fatos, fica demonstrada a necessidade incontestável de se verificar a importância da excreção do vírus por meio do sêmen em rebanhos bovinos não vacinados do Estado de Mato Grosso.

Mesmo diante do destaque do Estado de Mato Grosso no cenário nacional da bovinocultura, assim como do impacto negativo da infecção causada pelo BVDV na esfera reprodutiva, nota-se a ausência de pesquisas que visem a identificação do vírus no sêmen, associado diretamente a infecção venérea.

A ausência de excreção do BVDV no sêmen dos touros avaliados neste estudo pode ser explicada pelo fato de todos os animais estudados serem provenientes de rebanhos com manejo extensivo. Tais rebanhos eram, em sua maioria, caracterizados pela baixa rotatividade de animais e também pela reprodução por meio da monta natural. Em estudo conduzido em uma cooperativa do Rio Grande do Sul, caracterizada por propriedades leiteiras pequenas, a prática da IA assim como um grande número de bovinos nos rebanhos foram tidos como fatores de risco para a soroprevalência do BVDV nesta região (ALMEIDA et al., 2013). No caso da IA, acredita-se que o uso compartilhado de luvas de palpação retal, agulhas e instrumentos poderiam servir como fômites para a veiculação do vírus entre animais (LANG-REE et al., 1994; HOUE, 1999). Investigações conduzidas em outros países também classificam como fatores de risco a compra de animais sem a realização de teste laboratorial para verificar o estado frente a infecção, e o contato dos bovinos com outros rebanhos (LINDBERG; ALENIUS, 1999).

Por fim, destaca-se que os resultados deste estudo ainda são inconclusivos, devido ao número reduzido de animais avaliados. Portanto, estudos mais abrangentes deveriam ser conduzidos nestas e outras regiões do Estado, com o intuito de avaliar o potencial da excreção viral no sêmen de animais utilizados na

monta natural ou como touros de repasse em rebanhos com IATF implantada. A identificação prévia do vírus no Estado, assim como a prevalência estabelecida nos Estados vizinhos, em níveis elevados evidencia o risco de transmissão nos animais suscetíveis, inclusive por via venérea.

CONCLUSÃO

As amostras de sêmen avaliadas neste estudo se apresentaram como negativas para a presença do BVDV, resultado que pode ser associado ao número reduzido de animais avaliados, ao manejo extensivo aos quais os mesmos estavam submetidos, a baixa rotatividade de animais nos rebanhos avaliados do Estado e também pela forma de reprodução por meio da monta natural.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, L. L.; MIRANDA, I. C. S.; HEIN, H. E.; NETO, W. S.; COSTA, E. F.; MARKS, F. S.; RODENBUSCH, C. R.; CANAL, C. W.; CORBELLINI, L. G. Herd-level risk factors for bovine viral diarrhoea virus infection in dairy herds from Southern Brazil. **Research in Veterinary Science**, v. 95, n. 3, p. 901-7, 2013.
- ALTAMIRANDA, E. G.; KAISER, G. G.; WEBER, N.; LEUNDA, M. R.; PECORA, A.; MALACARI, D. A.; MORÁN, O.; CAMPERO, C. M.; ODEÓN, A. C. Clinical and reproductive consequences of using BVDV-contaminated semen in artificial insemination in a beef herd in Argentina. **Animal Reproduction Science**, v. 133, n. 3, p. 146-52, 2012.
- BRITO, W. M. E. D.; ALFAIA, B. T.; CAIXETA, S. P. M. B.; RIBEIRO, A. C. C.; MIRANDA, T. M. T.; BARBOSA, A. C. V. C.; BARTHASSON, D. L.; LINHARES, D. C.; FARIA, B. O. Prevalência da infecção pelo vírus da diarréia viral bovina (BVDV) no estado de Goiás, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 39, n. 1, p. 07-20, 2010.
- BROCK, K. V. Strategies for the control and prevention of bovine viral diarrhoea virus. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 20, n. 1, p. 171-80, 2004.
- CANAL, C. W.; STRASSER, M.; HERTIG, C.; MASUDA, A.; PETERHANS, E. Detection of antibodies to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and characterization of genomes of BVDV from Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 63, n. 2, p. 85-97, 1998.

- CORTEZ, A.; HEINEMANN, M. B.; CASTRO, A. M. M.; SOARES, R. M.; PINTO, A. M. V.; ALFIERI, A. A.; FLORES, E. F.; LEITE, R. C.; RICHTZENHAIN, L. J. Genetic characterization of Brazilian bovine viral diarrhea virus isolates by partial nucleotide sequencing of the 5'-UTR region. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n. 4, p. 211-16, 2006.
- DECARO, N.; LANAVE, G.; LUCENTE, M. S.; MARI, V.; VARELLO, K.; LOSURDO, M.; LAROCCA, V.; BOZZETTA, E.; CAVALIERE, N.; MARTELLA, V.; BUONAVOGLIA, C. Mucosal disease-like syndrome in a calf persistently infected by Hobi-like pestivirus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 8, p. 2946-54, 2014.
- DIAS, F. C.; SAMARA, S. Detecção de anticorpos contra o vírus da diarréia viral bovina no soro sanguíneo, no leite individual e no leite de conjunto em tanque de expansão de rebanhos não vacinados. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, n. 3, p. 161-68, 2003.
- FLORES, E. F. **Virologia Veterinária**. 1ª ed. Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil: Editora da UFSM, 2007, p. 435-62.
- FLORES, E. F.; RIDPATH, J. F.; WEIBLEN, R.; VOGEL, F. S.; GIL, L. H. V. Phylogenetic analysis of Brazilian bovine viral diarrhea virus type 2 (BVDV-2) isolates: evidence for a subgenotype within BVDV-2. **Virus Research**, v. 87, n. 1, p. 51-60, 2002.
- FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; VOGEL, F. S. F.; ROEHE, P. M.; ALFIERI, A. A.; PITUCO, E. M. A infecção pelo vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV) no Brasil - histórico, situação atual e perspectivas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, n. 3, p. 125-34, 2005.
- FRANDOLOSO, R.; ANZILIERO, D.; SPAGNOLO, J.; KUSE, N.; FIORI, C.; SCORTEGAGNA, G. T.; BARCELLOS, L. J. G.; KREUTZ, L. C. Prevalência de leucose enzoótica bovina, diarréia viral bovina, rinotraqueíte infecciosa bovina e neosporose bovina em 26 propriedades leiteiras da região nordeste do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 4, p. 1102-06, 2008.
- GALUPPO, A. G.; JUNIOR, N. B.; ARRUDA, N. S.; CORBELLINI, A. O.; CHIAPPETTA, C. M.; PAVÃO, D. L.; D'ANGELO, M.; CANAL, C. W.; RODRIGUES, J. L. Evaluation of the effectiveness of semen processing techniques to remove bovine viral diarrhea virus from experimentally contaminated semen samples. **Journal of Virological Methods**, v. 187, n. 2, p. 443-8, 2013.
- GARD, J. A.; GIVENS, M. D.; MARLEY, M. S.; GALIK, P. K.; RIDDELL, K. P.; STRINGFELLOW, D. A.; ZHANG, Y.; EDMONDSON, M. A. Bovine viral diarrhea virus (BVDV) associated with single in vivo-derived and in vitro-produced preimplantation bovine embryos following artificial exposure. **Theriogenology**, v. 71, n. 8, p. 1238-44, 2009.
- GARD, J. A.; GIVENS, M. D.; STRINGFELLOW, D. A. Bovine viral diarrhea virus (BVDV): epidemiologic concerns relative to semen and embryos. **Theriogenology**, v. 68, n. 3, p. 434-42, 2007.

GIVENS, M. D., HEATH, A. M., CARSON, R. L., BROCK, K. V., EDENS, M. S. D., WENZEL, J. G. W., STRINGFELLOW, D. A. Analytical sensitivity of assays used for detection of bovine viral diarrhoea virus in semen samples from the Southeastern United States. **Veterinary Microbiology**, v. 96, n. 2, p. 145-55, 2003.

GIVENS, M. D.; HEATH, A. M.; BROCK, K. V.; BRODERSEN, B. W.; CARSON, R. L.; STRINGFELLOW, D. A. Detection of bovine viral diarrhoea virus in semen after infection of seronegative, post-pubertal bulls. **American Journal of Veterinary Research**, v. 64, n. 4, p. 428-34, 2003.

GIVENS, M. D.; STRINGFELLOW, D. A.; RIDDELL, K. P.; GALIK, P. K.; CARSON, R. I.; RIDDELL, M. G. Normal calves produced after transfer of in vitro fertilized embryos cultured with an antiviral compound. **Theriogenology**, v. 65, n. 2, p. 344-55, 2006.

GREGG, K.; RIDDELL, K. P.; CHEN, S. H.; GALIK, P. K.; XIANG, T.; GUERRA, T.; MARLEY, M. S.; POLEJAEVA, I.; GIVENS, M. D. Risk and prevention of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) transmission through embryo production via somatic cell nuclear transfer (SCNT) using oocytes from persistently infected donors. **Theriogenology**, v. 74, n. 1, p. 1-10, 2010.

HAMERS, C.; DEHAN, P.; COUVREUR, B.; LETELLIER, C.; KERKHOFS, P.; PASTORET, P. P. Diversity among bovine pestiviruses. **The Veterinary Journal**, v. 161, n. 2, p. 112-22, 2001.

HOUE, H. Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections. **Veterinary Microbiology**, v. 64, n. 2-3, p. 64-89, 1999.

JUNQUEIRA, J. R.; ALFIERI, A. A. Falhas da reprodução na pecuária bovina de corte com ênfase para causas infecciosas. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 27, n. 2, p. 289-98, 2006.

KIRKLAND, P. D.; MACKINTOSH, S. G.; MOYLE, A. The outcome of widespread use of semen from a bull persistently infected with pestivirus. **The Veterinary Record**, v. 135, n. 22, p. 527-29, 1994.

KIRKLAND, P. D.; RICHARDS, S. G.; ROTHWELL, J. T.; STANLEY, D. F. Replication of bovine viral diarrhoea virus in the bovine reproductive tract and excretion of virus in semen during acute and chronic infections. **The Veterinary Record**, v. 128, n. 25, p. 587-90, 1991.

LANG-REE, J. R.; VATN, T.; KOMMISRUUD, E.; LØKEN, T. Transmission of bovine viral diarrhoea virus by rectal examination. **Veterinary Record**, v. 135, n. 17, p. 412-13, 1994.

LARSKA, M., KUTA, A., POLAK, M. P. Evaluation of diagnostic methods to distinguish between calves persistently and transiently infected with bovine viral diarrhoea virus in respect to the presence of maternal antibodies. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, v. 57, n. 3, p. 311-17, 2013.

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

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Flaviviridae: the viruses and their replication. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; GRIFFIN, D. E. **Fields Virology**. Philadelphia, PA, USA. Lippincot Williams e Williams, 2001, p. 991-1042.

LIU, L.; XIA, H.; WAHLBERG, N.; BELÁK, S.; BAULE, C. Phylogeny, classification and evolutionary insights into pestiviruses. **Virology**, v. 385, n. 2, p. 351-57, 2009.

LIU, Y.; CAO, J.; ZHANG, J.; HUANG, K.; QI, C. Influence of blood storage time on viral RNA extraction for the detection of bovine viral diarrhoea virus in persistently infected cattle. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v. 37, n. 2, p. 223-25, 2013.

OLAFSON, P.; MCCALLUM, A.; FOX, F. An apparently new transmissible disease of cattle. **The Cornell Veterinarian**, v. 36, p. 205-213, 1946.

PFEFFER, M.; VON FREYBURG, M.; KAADEN, O. R.; BEER, M. A universal one-tube 'RT-PCR protocol for amplifying isolates of bovine viral diarrhoea virus. **Veterinary Research Communications**, v. 24, n. 7, p. 491-503, 2000.

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, n. 2, p. 219-28, 2005.

PILZ, D.; ALFIERI, A. F.; LUNARDI, M.; ALFIERI, A. A. RT-PCR em pools de soro sanguíneos para o diagnóstico da infecção aguda e de animais persistentemente infectados pelo vírus da diarréia viral bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n.1, p. 1-7, 2007.

POLETTO, R.; KREUTZ, L. C.; GONZALES, C. J.; BARCELLOS, L. J. G. Prevalência de tuberculose, brucelose e infecções víricas em bovinos leiteiros do município de Passo Fundo, RS. **Ciência Rural**, v. 34, n. 2, 2004.

QUINCOZES, C. G.; FISCHER, G.; HÜBNER, S. O.; VARGAS, G. D.; VIDOR, T.; BROD, C. S. Prevalência e fatores associados à infecção pelo vírus da diarréia viral bovina na região Sul do Rio Grande do Sul. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 28, n. 2, p. 269-76, 2007.

RENSHAW, R. W.; RAY, R.; DUBOVI, E. J. Comparison of virus isolation and reverse transcription polymerase chain reaction assay for detection of bovine viral diarrhoea virus in bulk milk tank samples. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 12, n. 2, p. 184-86, 2000.

RIDPATH, J. F. Bovine viral diarrhoea virus: global status. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 26, n. 1, p. 105-21, 2010.

RIDPATH, J. F. BVDV genotypes and biotypes: practical implications for diagnosis and control. **Biologicals**, v. 31, n. 2, p. 127-31, 2003.

RIDPATH, J. F. Practical significance of heterogeneity among BVDV strains: impact of biotype and genotype on U.S. control programs. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 72, n. 1, p. 17- 30, 2005.

RIDPATH, J. F.; FLORES, E. F. Flaviviridae. In: FLORES, E. F. (Org) **Virologia Veterinária**. 1ª ed. Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil: Editora da UFSM, 2007, p. 563-92.

SANTOS, A. S.; ANTONIASSE, N. A. B.; BOABAID, F. M.; BITENCOURT, A. P.; ALMEIDA, L. L.; CANAL, C. W.; FLORES, E. F.; DRIEMEIER, D. Aspectos clínicos, patológicos, imuno-histoquímicos e virológicos em cinco bezerros persistentemente infectados com o vírus da diarreia viral bovina em uma propriedade do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 10, p. 885-92, 2011.

SHARIFZADEH, A.; DOOSTI, A.; DEHKORDI, P. G. Reverse Transcriptase PCR Assay for Detection of Bovine viral diarrhea virus (BVDV) Infection in Iranian Bull's Semen Samples. **Middle- East Journal of Scientific Research**, v. 9, n. 1, p. 132-9, 2011.

THOMPSON, J. A.; LEITE, R. D. M. H.; GONÇALVES, V. S. P.; LEITE, R. C.; BANDEIRA, D. A.; HERRMANN, G. P.; MOREIRA, E. C.; PRADO, P. E.; LOBATO, Z. I.; BRITO, C. P.; LAGE, A. P. 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, n. 3, p. 290-301, 2006.

VILCEK, S.; HERRING, A. J.; HERRING, J. A.; NETTLETON, P. F.; LOWINGS, J. P.; PATON, D. J. Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. **Archives of Virology**, v. 136, n. 3-4, p. 309-23, 1994.

VILCEK, S.; PATON, D. J.; DURKOVIC, B.; STROJNY, L.; IBATA, G.; MOUSSA, A.; LOITSCH, A.; ROSSMANITH, W.; VEGA, S.; SCICLUNA, M. T.; PALFI, V. Bovine viral diarrhea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups. **Archives of Virology**, v. 146, n. 1, p. 90-115, 2001.

VOGEL, F. S. F.; SCHERER, C. F. C.; FLORES E. F.; WEIBLEN, R.; LIMA, M.; KUNRATH, C. F. Resposta sorológica e avaliação de proteção fetal em ovelhas prenhes vacinadas contra o vírus da diarreia viral bovina (BVDV). **Ciência Rural**, v. 31, n. 5, p. 831-38, 2001.

VOGES, H.; HORNER, G. W.; ROWE, S.; WELLENBERG, G. J. Persistent bovine pestivirus infection localized in the testes of an immune-competent, non-viraemic bull. **Veterinary Microbiology**, v. 61, n. 3, p.165-75, 1998.

WALZ, P. H.; GIVENS, M. D.; COCHRAN, A.; NAVARRE, C. B. Effect of examethasone administration on bulls with a localized testicular infection with bovine viral diarrhea virus. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 72, n. 1, p. 56, 2008.

WEBER, M. N.; MÓSENA, A. C. S.; SIMÕES, S. V. D.; ALMEIDA, L. L.; PESSOA, C. R. M.; BUDASZEWSKI, R. F.; SILVA, T. R.; RIDPATH, J. F.; RIET-CORREA, F.;

DRIEMEIER, D.; CANAL, C. W. Clinical Presentation Resembling Mucosal Disease Associated with 'HoBi'-like Pestivirus in a Field Outbreak. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 61, p. 1-9, 2014.

APÊNDICE

APÊNDICE 1- PROTOCOLO: TRIzol LS Reagente

MATERIAIS NECESSÁRIOS PARA PURIFICAÇÃO DE RNA		
Clorofórmio	Água livre de RNase	Bloco de aquecimento seco
Álcool Isopropílico	Centrífuga que chega a 12.000 xg	-
Etanol a 75% (em água DPEC)	Eppendorfs 1,5mL	-

PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS	
ETAPA	PROCEDIMENTO
01	3 partes de TRIzol LS para 1 de amostra; Obs: Se o volume de amostra é baixo (menor que 250uL), ajuste para 250uL adicionando água livre de RNase.
02	Adicione 750uL de TRIzol LS para cada 250uL de amostra; Obs: Homogeneizar com a pipeta (pipetando e soltando várias vezes) e talvez diluir o sêmen 1:1 com água livre de RNase.
03	Incube o homogeneizado por 5 minutos a temperatura ambiente;
04	Adicione 200uL de clorofórmio por 750uL de TRIzol LS e feche o tubo agite o tubo vigorosamente na mão por 15 segundos;
05	Incube por 2-15 minutos em temperatura ambiente;
06	Centrifugue por 15 minutos (4°C) a 12.000 xg;
07	Recolha a fase aquosa superior (incolor) em um novo tubo; Obs: Evite aspirar material de qualquer das outras fases.
08	Adicione 500uL de isopropanol na fase aquosa, por 750uL de TRIzol LS;
09	Incube por 10 minutos na temperatura ambiente;
10	Centrifugue por 10 minutos (4°C) a 12.000 xg; Obs: O RNA é frequentemente invisível antes da centrifugação e forma um pellet de gel na lateral ou fundo do tubo.

11	Remova o sobrenadante do tubo, deixando apenas o pellet de RNA;
12	Lave o pellet com 1mL de etanol a 75%, por 750uL de TRIzol LS utilizado;
13	Vortex a amostra pra misturar;
14	Centrifugue a amostra por 5 min a 7.500 xg (4°C) e descarte o sobrenadante;
15	Seque o pellet por 5-10 minutos em tubo aberto; Obs: Não permita que o pellet seque completamente, pois ele pode perder solubilidade.
16	Ressuspenda o pellet em água livre de RNase (20-50uL); Obs: Sugando e soltando várias vezes com a ponteira da pipeta.
17	Incube em bloco seco ajustado a 55-60°C por 10-15 minutos;
18	Faça a RT-PCR ou congele em -70°C.



Universidade de Cuiabá

APÊNDICE 2- FORMULÁRIO EPIDEMIOLÓGICO

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DO VÍRUS DA DIARRÉIA BOVINA VIRAL (BVDV)
NO SÊMEN DE TOUROS NO ESTADO DE MATO GROSSO**

Nome do Proprietário: _____

Telefone do Proprietário: _____

Nome da Propriedade: _____

Município/Estado: _____

Tipo de exploração: _____

Manejo Reprodutivo com IATF? () Sim () Não

Data da Coleta do Sêmen e Sangue: _____

Médico Veterinário responsável: _____

Identificação do Animal no Tubo de Coleta: _____

Número ou Registro do Animal: _____

Raça: _____

Idade (anos): _____

Histórico de Problemas Reprodutivos? () Sim () Não

Se sim, quais? _____

Observações: _____

