



---

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSO MESTRADO EM  
BIOCIÊNCIA ANIMAL**

**RAPHAEL CAMPOS QUINTEIRO**

**AVALIAÇÃO MOLECULAR DA EXCREÇÃO DO HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 1  
(BoHV-1) NO SÊMEN DE TOUROS DO ESTADO DE MATO GROSSO**

---

Cuiabá, MT  
2016

**RAPHAEL CAMPOS QUINTEIRO**

**AVALIAÇÃO MOLECULAR DA EXCREÇÃO DO HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 1  
(BoHV-1) NO SÊMEN DE TOUROS DO ESTADO DE MATO GROSSO**

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, MT  
2016

**FICHA CATALOGRÁFICA**  
**Dados Internacionais para Catalogação na Publicação (CIP)**

Q78a      Quinteiro, Raphael Campos.  
            Avaliação molecular da excreção do herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) no sêmen de touros do Estado de Mato Grosso / Raphael Campos Quinteiro. – Cuiabá, MT, 2016.  
            52 f. ; il.

            Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Biociência Animal, Universidade de Cuiabá.  
            Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Michele Lunardi.

            Inclui lista de tabelas e imagens

            1. Medicina Veterinária. 2. Doenças dos Animais. 3. Doenças dos bovinos. 4. Herpesvírus bovino 1. I. Título

CDU 591.2:636.2(817.2)

**Normalização e Ficha Catalográfica**

Valéria Oliveira dos Anjos  
CRB1/1713

**RAPHAEL CAMPOS QUINTEIRO**

**AVALIAÇÃO MOLECULAR DA EXCREÇÃO DO HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 1  
(BoHV-1) NO SÊMEN DE TOUROS DO ESTADO DE MATO GROSSO**

Dissertação apresentada à UNIC no Mestrado em Biociência Animal, área de concentração em Saúde Animal como requisito para obtenção do Título de Mestre conferida pela Banca Examinadora formada pelos seguintes professores:

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Michele Lunardi - UNIC  
Orientadora

---

Prof. Dr. Marcelo Diniz dos Santos- UNIC

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Michelle Igarashi - UFMT

Cuiabá, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2016.

Conceito Final: \_\_\_\_\_

A minha querida mãe Marília Auciliadora Corrêa Campos Quinteiro (*In memoriam*) e ao meu grande pai Juscelino da Silva Quinteiro que me ensinaram o prazer pelo conhecimento, e que nunca estão distantes de minha alma.

A minha esposa Silvana Crestani Mendes e minha filha Alícia Rafaela Crestani Quinteiro pelo amor, segurança e incentivo em momentos importantes.

A minha irmã Iza Karol Campos Quinteiro, com quem posso contar.

A Professora Dr<sup>a</sup> Michele Lunardi pela oportunidade de aprender sob uma orientação segura e entusiasta, pelo espírito de equipe exemplificado pelo sentimento humanitário que lhe é espontâneo.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela vida, oportunidade de viver cada segundo, pelos dons de perseverança, coragem e determinação para concluir este curso.

Aos meus pais e irmã Marília Auciliadora Corrêa Campos Quinteiro (*In memoriam*), Juscelino da Silva Quinteiro e Iza Karol Campos Quinteiro pelo amor presente em todos os momentos desta etapa acadêmica a me fortalecer e incentivar.

À minha esposa e companheira Silvana Crestani Mendes que, desde o primeiro pensamento sobre mestrado na Universidade de Cuiabá (UNIC), me confortou com suas palavras de apoio e carinho, tão importantes na minha vida.

À minha querida orientadora Professora Dr<sup>a</sup> Michele Lunardi pelo seu expressivo significado na minha vida. A sua gentileza e atenção desde minha chegada a Universidade, a compreensão de minha inexperiência a respeito da Biociência Animal, a segurança e seriedade na condução de minha aprendizagem, o entusiasmo em fazer ciência, a bondade e a alegria em mostrar a beleza do conhecimento de Biologia Molecular em si mesma são características de sua personalidade, as quais foram alavancas no decorrer deste nível acadêmico. Professora, meu reconhecimento, gratidão e sincera amizade.

Aos técnicos responsáveis pelo laboratório onde realizaram as pesquisas. Muito obrigado pela atenção à minha pessoa e sua bondade.

A todos os alunos que chegaram depois e que compõem hoje a equipe da Dr<sup>a</sup> Michele Lunardi.

Ao Professor Dr<sup>o</sup> Marcelo Diniz dos Santos, Coordenador Mestrado em Biociência Animal e Professora Dr<sup>a</sup> Michelle Igarashi por aceitarem gentil e prontamente o convite de participarem da Banca Examinadora desta defesa de dissertação de mestrado.

Aos inúmeros amigos que fiz ao longo da minha estada no Programa de Pós-Graduação, por entender a importância deste trabalho, contribuindo assim para a sua conclusão.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade de Cuiabá pela excelente qualidade do programa na avaliação do CAPES.

A todos presentes na minha defesa do mestrado e aqueles tantos que contribuíram de forma indireta na minha formação, muito obrigado.

E, aqueles que não foram citados, perdoem-me, mas são muitos aqui a serem lembrados e a memória é curta, mas que foram muito importantes para mim.

"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.

QUINTEIRO, R. C. **Avaliação molecular da excreção do herpesvírus bovino Tipo 1 (BoHV-1) no sêmen de touros do Estado de Mato Grosso**. 2016. 52 f. Dissertação (Mestrado em Biociência Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Cuiabá, Cuiabá, 2016.

## RESUMO

O Herpesvírus Bovino tipo 1 (BoHV-1) encontra-se amplamente disseminado em rebanhos bovinos. O BoHV-1 pode ser encontrado no sêmen de touros, independente do desenvolvimento de anticorpos neutralizantes. A infecção pelo BoHV-1 afeta principalmente os tratos respiratório e genital dos bovinos e pode ser subdividida em duas entidades clínicas denominadas Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR) e Vulvovaginite/Balanopostite Pustular Infecciosa (IPV/IPB). A transmissão do BoHV-1 ocorre por meio de contato direto através de secreções nasais, oculares, genitais, sêmen e anexos fetais de animais infectados, além da transmissão indireta que ocorre principalmente pela inseminação artificial, sendo o contato direto de maior relevância epidemiológica da doença. A infecção pelo BoHV-1 pode ocasionar problemas reprodutivos nas vacas, como endometrite, infertilidade, absorção embrionária e abortos. Animais infectados tornam-se portadores vitalícios do BoHV-1 e podem apresentar episódios intermitentes de excreção viral. O objetivo desse estudo foi avaliar a excreção do BoHV-1 em sêmen de touros de algumas propriedades do Estado de Mato Grosso por meio da técnica molecular de detecção PCR. Touros provenientes de rebanhos distintos, cujas propriedades estão localizadas em seis das sete macrorregiões que dividem o Estado, tiveram o sêmen examinado quanto à excreção do BoHV-1. O diagnóstico conclusivo somente é possível pela identificação do BoHV-1 diretamente em amostras clínicas. Para isso, um total de 99 amostras de sêmen *in natura* foram submetidas a técnica da reação em cadeia pela polimerase (PCR) do genoma do BoHV-1, usando os *primers* B1 e Bcon. Entre os touros avaliados, foram observadas idades variando de 28 meses a 120 meses. De acordo com os resultados da PCR, 21 apresentaram amostras de sêmen positivas para detecção molecular do BoHV-1, observando que a maior proporção de animais infectados foi observada nas propriedades da macrorregião Centro Sul, com idades entre 36 a 48 meses. Contudo os resultados dos controles positivos e negativos foram satisfatórios, validando a técnica empregada no presente estudo. Atualmente a técnica da PCR está sendo universalmente adotada no diagnóstico de diversas viroses, inclusive da causada pelo BoHV-1.

**Palavras-chave:** Bovinos. Diagnóstico molecular. Herpesvírus Bovino Tipo 1. PCR.



QUINTEIRO, R. C. **Molecular evaluation of bovine herpesvirus 1 (BoHV-1) shedding in semen samples of bulls from Mato Grosso State.** 2016. 52 f. Dissertation (Master Science in Animal Bioscience) - Faculty of Veterinary Medicine, University of Cuiaba, Cuiaba, 2016.

### **ABSTRACT**

The Bovine Herpesvirus type 1 (BoHV-1) is widespread in cattle herds. Bovine herpesvirus type 1 can be found in the semen of bulls, with or without the concomitant development of neutralizing antibodies. The BoHV-1 primarily affects the respiratory and genital tracts of cattle and can be subdivided into two clinical outcomes called Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR) and Infectious Pustular Vulvovaginitis / Balanoposthitis (IPV/IPB). Infected animals become lifelong carriers of BoHV-1 and may have intermittent episodes of viral shedding. Transmission of BoHV-1 occurs through direct contact via nasal, ocular and genital discharge, semen and fetal membranes of infected animals, as well as indirect transmission primarily by artificial insemination. Direct contact is epidemiologically more relevant for transmission of the infection. Additionally, reproductive problems such as endometriosis, infertility, embryonic absorption and abortions, as well as severe inflammation of the penis and prepuce may occur as a result of infection. Bulls from different herds, located at six of the seven geographical regions that divide the Mato Grosso state, had the semen examined for excretion of BoHV-1. The definitive diagnosis is possible only by BoHV-1 identification directly from clinical specimens. To evaluate this, a total of 99 samples of semen *in natura* were submitted to polymerase chain reaction (PCR) technique to identify the genome of BoHV-1, using the primers B1 and Bcon. Among the evaluated bulls, their ages ranged from 28 months to 120 months and according to the PCR results, 21 showed positive semen samples for molecular detection of BoHV-1. The highest proportion of infected animals was obtained in the Macro-region South Centre and in animals aging 36-48 months. In addition, the results for the positive and negative controls in the PCR assay were satisfactory, validating the employed technique in this study. Currently, PCR assays are being universally adopted in the diagnosis of several viral infections, including infections by BoHV -1.

**Keywords:** Cattle. Molecular diagnosis. Bovine herpesvirus type 1. PCR.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Organização do genoma de BoHV-1 incluindo as duas sequências únicas, uma longa (UL) e uma Curta (US). .....17
- Figura 2 - Ciclo Reprodutivo dos Alfaherpesvírus .....18
- Figura 3 - Municípios e localização dos rebanhos destinados a avaliação da presença do BoHV-1, de acordo com as divisões das 7 macrorregiões de Mato Grosso.....44

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Distribuição das frequências de touros infectados por Herpesvírus Bovino Tipo 1 (BoHV-1) por Macrorregião do Estado de Mato Grosso.....46
- Tabela 2 - Distribuição por faixa etária das frequências de touros positivos para Herpesvírus Bovino Tipo 1 (BoHV-1) em bovinos das seis Macrorregiões do Estado de Mato Grosso.....48

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E UNIDADES

%	Porcentagem
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CP	Citopatogênico
DM	Doença das Mucosas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Trifosfatados
kbp	Quilo Pares de Bases
MDBK	<i>Madin Darby Bovine Kidney</i>
Min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
NCP	Não Citopatogênico
nm	Nanometros
°C	Grau Celsius
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia pela polimerase
pH	Potencial Hidrogenionico
PI	Persistentemente Infectado
RNA	Ácido Ribonucleico
RT	Transcrição reversa
RT-PCR	Transcrição reversa seguida da reação em Cadeia pela Polimerase
SFB	Soro Fetal Bovino
SN	Soroneutralização
TBE	Tampão a base de Tris/Borato/EDTA
UV	Ultravioleta
V	Voltagem
µL	Microlitro

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 1 (BOHV-1).....</b>	<b>15</b>
2.1	GENOMA.....	17
2.2	CICLO REPLICATIVO BOHV-1 .....	17
2.3	EPIDEMIOLOGIA .....	18
2.4	LATÊNCIA .....	20
2.5	EXCREÇÃO VIRAL NO SÊMEN .....	22
2.6	RESISTÊNCIA DO VÍRUS NO SÊMEN.....	23
2.7	INFECÇÃO EM TOUROS DE CENTRAIS DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL (IA).....	24
2.8	SINAIS CLÍNICOS .....	25
2.9	DIAGNÓSTICO.....	27
2.10	CONTROLE E PREVENÇÃO .....	28
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>30</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>38</b>
3.1	OBJETIVO GERAL.....	38
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
<b>4</b>	<b>ARTIGO 1.....</b>	<b>39</b>
	<b>AVALIAÇÃO MOLECULAR DA EXCREÇÃO DO HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 1 (BOHV-1) NO SÊMEN DE TOUROS DO ESTADO DE MATO GROSSO .....</b>	<b>39</b>
	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>42</b>
	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>43</b>
	AMOSTRAS.....	43
	EXTRAÇÃO DE DNA.....	45
	REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR).....	45
	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>45</b>
	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>48</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>49</b>
	<b>APÊNDICE .....</b>	<b>51</b>
	<b>APÊNDICE 1- FORMULÁRIO EPIDEMIOLÓGICO .....</b>	<b>52</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um país continental e possui o maior rebanho bovino comercial do mundo com aproximadamente 212,3 milhões de animais. Produtos oriundos da exploração pecuária bovina brasileira são exportados para diversos países. Um produto adicional na realidade do agronegócio nacional é a exportação e importação de material genético superior, na forma de sêmen e embriões. Em 2015 o Produto Interno Bruto (PIB) do agronegócio brasileiro representou entre 22% e 23% no PIB total do País, somente a pecuária foi responsável por cerca de 30% do PIB do agronegócio. Grande parte do rebanho bovino brasileiro é de origem zebuína e seus cruzamentos, estudos de desempenho produtivo, seleção racial e características desejáveis como menor susceptibilidade a endo e ectoparasitas, adaptação ao clima tropical, precocidade sexual e fertilidade são preocupações e despertam o interesse dos setores comercial e científico brasileiros, visto o aumento internacional da comercialização do material genético bovino brasileiro (MINISTÉRIO..., 2015).

O Estado de Mato Grosso é considerado como o maior produtor de bovino do país, com aproximadamente 29,2 milhões de animais (INSTITUTO..., 2015).

O processo de modernização com adoção de modelos mais eficientes de gestão na produção tem sido fundamental para o sucesso dos setores que compõem a cadeia da pecuária (MINISTÉRIO..., 2014).

O BoHV-1 pertence à família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*, gênero *Varicellovirus* e pode ser classificado ainda nos subtipos BoHV-1.1 e BoHV-1.2 (D'ARCE et al., 2002). O BoHV-1 é responsável por perdas significativas para a exploração pecuária sendo que a infecção pode resultar em uma grande variabilidade de sinais clínicos, associados à enfermidade respiratória, conhecida como rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), além de conjuntivite, vulvovaginite pustular infecciosa (IPV), balanopostite pustular infecciosa (IPB), reabsorção embrionária, abortamento, infertilidade temporária, nascimento de animais fracos e infecção multissistêmica fatal dos neonatos (VIEIRA et al., 2003).

Apesar da grande similaridade, o BoHV-1 e o BoHV-5 podem ser diferenciados por análise de restrição enzimática do genoma, pelo perfil de polipeptídeos virais produzidos em células de cultivo, pelo perfil de reatividade com alguns anticorpos monoclonais (AcMs) e por PCR (D'ARCE et al., 2002; ENGEL, 1996; METZLER; SCHUE; ENGEL, 1986; ROEHE et al., 1997). Por meio dessas

técnicas, isolados respiratórios de herpesvírus tem sido classificados como BoHV-1.1 e isolados de doença genital como BoHV-1.2 (D'ARCE et al., 2002; METZLER et al., 1986). Os isolados de doença neurológica, anteriormente classificados como BHV-1.3, por suas diferenças moleculares e antigênicas, foram posteriormente reclassificados como BoHV-5 (ROIZMAN et al., 1992).

Uma característica importante do BoHV é a capacidade de estabelecer latência em gânglios de nervos sensoriais, principalmente os gânglios trigêmeo e sacral. Reativação viral pode ocorrer quando os animais são submetidos a fatores estressantes, que diminuem a resistência imunológica. Uma vez infectado, o animal será portador e fonte de infecção, assegurando a permanência do vírus na população bovina (VIEIRA et al., 2003).

O BoHV-1 é um patógeno de distribuição mundial, com exceção de alguns países europeus que erradicaram a infecção (ACKERMANN; CILENTO et al., 2011; ENGELS, 2006; STEUKERS et al., 2011). Vários relatos demonstram que, no Brasil, este vírus está amplamente disseminado no rebanho bovino (BARBOSA; BRITO; ALFAIA, 2005; HOLZ et al., 2009; RISSI et al., 2007; SILVA; WEIBLEN; FLORES, 2007).

No Brasil, o controle da doença é realizado voluntariamente, sem qualquer exigência dos órgãos competentes. A vacinação não é uma prática difundida, sendo sua eficiência contestável conforme afirma Pituco (1999). Apesar de minimizar as manifestações clínicas da doença, elas não impedem o mecanismo de latência e não eliminam o vírus instalado. Segundo Lemaire, Pastoret e Thiry (1994) as vacinas que se encontram disponíveis para o comércio brasileiro não permitem a distinção entre animais vacinados dos infectados com o vírus.

Considerando a importância que a enfermidade possui dentro dos rebanhos bovinos, principalmente aqueles voltados à exploração de corte, juntamente aos poucos dados epidemiológicos da ocorrência de BoHV-1 nos rebanhos aliado a prática deficiente e/ou inexistente de sanidade nas propriedades e a ausência de programas de assistência técnica especializada, este trabalho teve por objetivo avaliar a excreção do BoHV-1 em sêmen de touros de algumas propriedades do Estado de Mato Grosso por meio da técnica molecular de detecção PCR.

## 2 HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 1 (BOHV-1)

O herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) pertence a família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*, apresenta partícula viral com diâmetro entre 70 a 110 nm, constituída por um capsídeo icosaédrico, envelope glicoproteico e genoma DNA linear de fita dupla (FENNER; BACHMANN; GIBBS, 1987). Este vírus é o agente etiológico da IBR/IPV (Rinotraqueite Infecciosa Bovina/Vulvovaginite Pustular Infecciosa), infecções virais contagiosas dos rebanhos bovinos, que afetam principalmente o trato respiratório e genital, podendo provocar abortos (KAHRS, 1977). O BoHV-1 causa também balanopostite pustular infecciosa, conjuntivite, encefalite, doença sistêmica do recém-nascido e enterite (FENNER; BACHMANN; GIBBS, 1987). A infecção pelo BoHV-1 está associada a perdas significativas na eficiência reprodutiva, produção de leite e conversão alimentar (KAHRS, 1977).

O envelope viral é composto por dez glicoproteínas, denominadas gB, gC, gD, gE, gI, gH, gL, gG, gK e gM. As glicoproteínas do BoHV-1 diferenciam-se em suas propriedades antigênicas, moleculares e função biológica nos processos de interação com a célula hospedeira e de replicação (SCHWYZER; ACKERMANN, 1996).

Três glicoproteínas do envelope, devido a sua localização e função biológica, possuem grande potencial imunogênico, sendo gB, gC e gD. A gB é a mais imunogênica e, durante a replicação viral, está envolvida nas etapas de adsorção, penetração e fusão celular (VAN DRUNEN LITTEL-VANDER HURK; HUGUES; BABIUK, 1990).

A gC é muito importante na indução de anticorpos neutralizantes, sendo-lhe atribuída a função de adsorção do vírus à célula hospedeira. O gene UL 44, encontrado no genoma do BoHV-1 codifica a gC (DELHON et al., 2003). É uma das principais glicoproteínas virais, sendo expressa em altos níveis no envelope viral e na superfície de células infectadas. Seu papel principal está relacionado à adsorção viral, ligando-se aos receptores de heparina na superfície das células alvo (OKAZAKI et al., 1987).

No vírion, a gC apresenta-se como um dímero de 508 aminoácidos (codificada por 1572 nucleotídeos). A região amino-terminal (N-terminal) concentra a maior parte das diferenças entre as gCs, enquanto que a região central e carboxi-terminal (C-terminal) apresentam-se mais conservadas (SCHWYZER;



ACKERMANN, 1996)

A gD é uma glicoproteína essencial para a replicação viral e sugere-se que também esteja envolvida na adsorção, penetração e fusão celular (FEHLER et al., 1992).

As glicoproteínas atuam em inúmeras etapas do ciclo de replicação viral (reconhecimento e ligação aos receptores celulares; fusão das membranas viral e celular; penetração do material viral no citoplasma; maturação e saída das partículas virais da célula), bem como muitas são importantes em estratégias de evasão da resposta imune do hospedeiro (KOPPERS-LALIC et al., 2001; WINKLER et al., 1999).

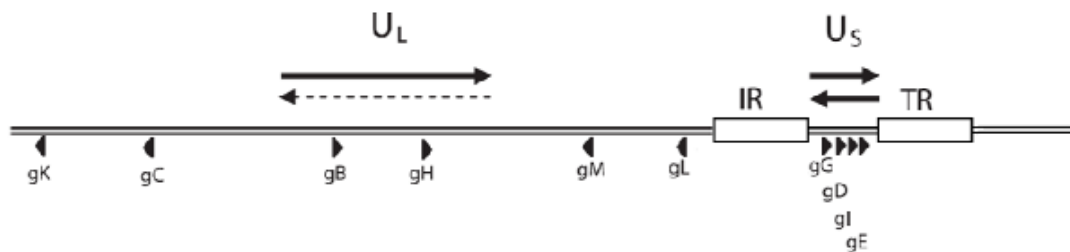
Outra proteína constituinte do BoHV-1 é a timidinaquinase. Embora esta enzima não seja de fundamental importância para a replicação do vírus em cultivo celular, atribui-se a ela o envolvimento no processo de reativação do BoHV-1 em estado de latência (SCHWYZER; ACKERMANN, 1996).

Por análises de restrição genômica (REA) e de reatividade com anticorpos monoclonais (AcMs), o BoHV-1 pode ser classificado em três subtipos: BoHV-1.1 (IBR “like”) está relacionado aos quadros com sintomatologia respiratória e problemas reprodutivos, como infertilidade e abortamentos; o subtipo BoHV-1.2a tem sido associado a uma vasta variedade de manifestações clínicas, que incluem transtornos reprodutivos (abortamento), doenças do trato genital tais como vulvovaginite pustular infecciosa e balanopostite pustular infecciosa (IPV e IPB) e problemas respiratórios; por sua vez, episódios de doença respiratória leve, IPV e IPB podem ser atribuídos ao subtipo BoHV-1.2b, sendo que a ocorrência de abortamentos nunca foi associada a este genótipo (FLORES, 2007). Porém, a base molecular do tropismo dos subtipos BoHV-1.1 e 1.2 pelo trato respiratório e genital, respectivamente, não está completamente elucidada; logo, a associação dos subtipos com cada quadro clínico pode não ser mutuamente exclusiva. Os isolados dos três subtipos apresentaram ainda elevada reatividade sorológica cruzada, o que pode dificultar a sua diferenciação em testes diagnósticos feitos por soroneutralização (SPILKI et al., 2004).

## 2.1 GENOMA

O genoma contém uma única molécula de DNA linear fita dupla com aproximadamente: 135.870 pares de bases (pb) nucleotídicas (BoHV-1), sendo em torno de 75% desta composição formada por bases GC (DELHON et al., 2003). É composto de duas sequências únicas: uma única longa ou “long” (UL) e uma única curta ou “short” (US), sendo esta última flanqueada por sequências terminais repetidos no genoma: a região repetida interna (IR) e a região repetida normal (TR) (Figura, 1) (SCHWYZER; ACKERMANN, 1996).

Figura 1 - Organização do genoma de BoHV-1 incluindo as duas sequências únicas, uma longa (UL) e uma Curta (US).



Adaptado de Muylkens et al. (2007)

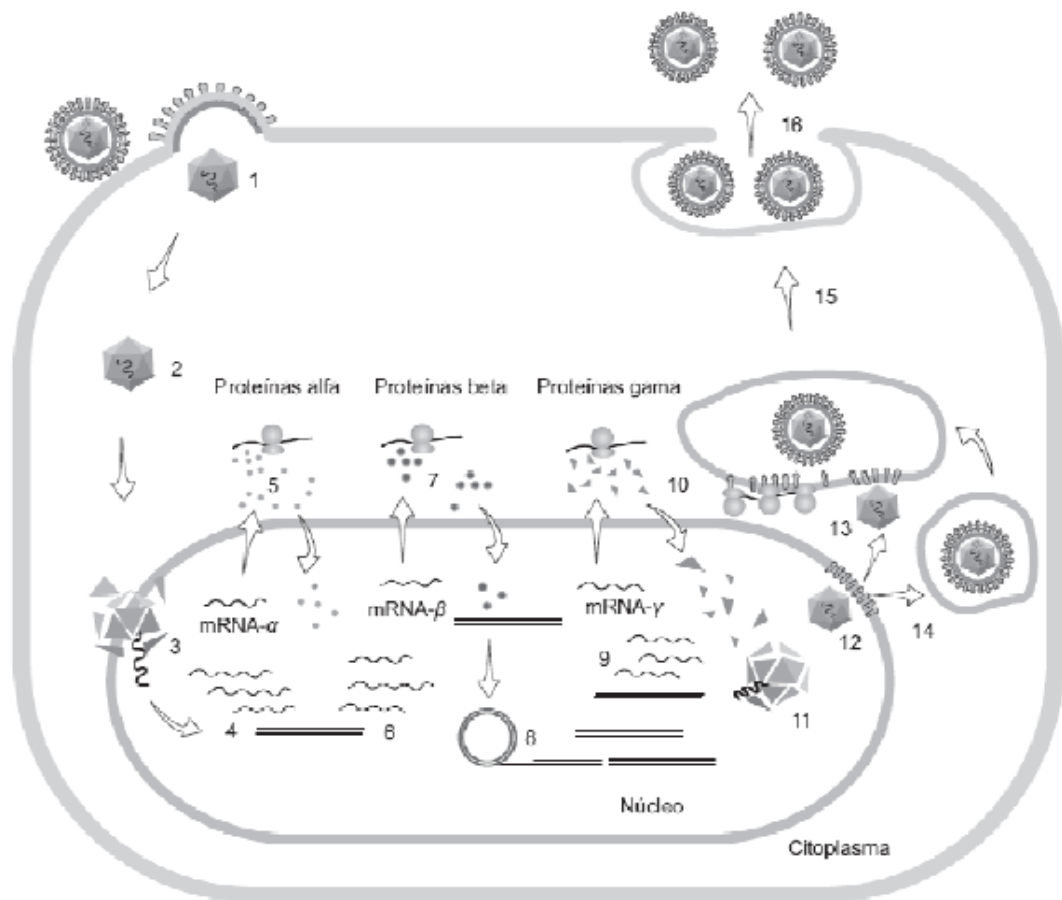
## 2.2 CICLO REPLICATIVO BOHV-1

O ciclo viral replicativo ou lítico ocorre em células permissivas à replicação e resulta na produção da progênie infecciosa, típico de infecção aguda. *In vivo*, a replicação de BoHV-1 ocorre na mucosa do trato respiratório ou na mucosa genital, variando de acordo com a via de infecção. O vírus penetra nas terminações nervosas periféricas e migra, via axônio, para os neurônios dos gânglios trigêmeo ou sacral, onde estabelece infecções latentes (ROIZMAN et al., 1995).

O vírus da família *Herpesviridae* replica o seu genoma no núcleo da célula hospedeira utilizando fatores virais e celulares. O ciclo reprodutivo lítico dos alfa herpesvírus se inicia com a penetração por fusão do envelope com a membrana plasmática. Em seguida ocorre o transporte do nucleocapsídeo até os poros nucleares, ao passar pelos poros a desnaturação e liberação do genoma no interior do núcleo se inicia, ocorrendo a transcrição dos genes alfa, tradução das proteínas alfa, seguido pela transcrição dos genes beta e tradução das proteínas beta.

Posteriormente, ocorrem a replicação do genoma, transcrição dos genes gama, tradução das proteínas gama e início da morfogênese. A aquisição do envelope ocorre por brotamento através da membrana nuclear ou no aparelho de Golgi. Finalmente, o transporte do vírions em vesículas até a superfície celular é seguido da liberação das novas partículas virais por exocitose (Figura 2).

Figura 2 - Ciclo Reprodutivo dos Alfaherpesvírus



Adaptado de Flores (2007).

### 2.3 EPIDEMIOLOGIA

O BoHV-1 foi isolado pela primeira vez por Madin, York e McKercher (1956), de lavado nasal de animais infectados. O isolamento do vírus de exsudato vaginal de vacas acometidas de vulvovaginite pustular foi demonstrado por Kendrick, Gillespie e McEntee (1958 apud DEL FAVA, 2001). McKercheretal (1959 apud DEL FAVA, 2001) demonstrou que tanto o quadro respiratório quanto o genital eram causados pelo mesmo vírus, que passou a ser reconhecido como agente causador

da IBR/IPV. A transmissão de BoHV-1 ocorre por meio do contato direto entre secreções nasais, oculares e genitais, sêmen e anexos fetais de animais infectados ou por inalação de aerossóis contaminados, sendo o contato direto o mais relevante na epidemiologia da doença, principalmente, em rebanhos criados de modo intensivo ou semi-intensivo. A transmissão transplacentária já foi relatada e está condicionada ao estado imunológico da fêmea no momento da infecção (RADOSTITS et al., 2007).

No Brasil, o primeiro relato foi feito por Alice (1978), que isolou o BoHV-1 de casos de vulvovaginite ocorridos no Estado da Bahia. No mesmo ano, Mueller et al. (1978) isolaram e identificaram o BoHV-1 de rim de feto bovino colhido em matadouro do Estado de São Paulo. Galvão, Dori e Alice (1963 apud MELO, 2012), após a realização de vários estudos conduzidos na Bahia, comprovaram que a infecção por BoHV-1 disseminada no país. Na região Nordeste, foram relatadas prevalências de anticorpos que variam entre 56 e 96%, dependendo do tipo de criação analisada e do método de diagnóstico utilizado (CERQUEIRA et al., 2000; MELO et al., 1997, 1999; SILVA et al., 1995).

A espécie bovina é a principal fonte de infecção para o BoHV-1. As principais vias de eliminação do vírus são: secreções respiratórias, oculares e genitais (muco prepucial, muco vaginal) e o sêmen de animais infectados. A via de transmissão direta horizontal é a mais importante e ocorre através do contato direto entre os animais e também pela cópula, porém embrião e feto podem infectar-se pela via vertical (transplacentária). A transmissão indireta ocorre principalmente pela inseminação artificial, a qual apresenta importância significativa na entrada da doença em rebanhos que nunca tiveram contato com o vírus (LEMAIRE; PASTORET; THIRY, 1994).

O BoHV-1 está amplamente distribuído e com alta frequência em rebanhos bovinos de todo o mundo (MICKELSEN; EVERMANN, 1994). Evidências sorológicas demonstram a presença, bem como a alta frequência, das infecções pelo BoHV-1 também nos rebanhos brasileiros. Dados regionais, obtidos a partir de inquéritos sorológicos, revelam a expressiva disseminação do vírus em rebanhos de corte e leite. Mueller et al. (1981 apud DEL FAVA, 2002) detectaram 42,2% de animais reagentes no Estado de São Paulo. No Rio Grande do Sul foram descritas frequências de soropositividade de 18,8% (LOVATO et al., 1995), 81,7% (RAVAZZOLO et al., 1989) e 31,9% (VIDOR et al., 1995). Takiuchi, Alfieri e Alfieri

(2001) verificaram frequência de animais soropositivos para o BoHV-1 variando entre 52,4 e 81,7%, em rebanhos não vacinados, provenientes dos estados de São Paulo, Paraná, Rondônia, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Goiás.

Na região Centro-Oeste, Barbosa et al. (2005) e Vieira et al. (2003) observaram uma soropositividade nos rebanhos de 83 e 51,9%, respectivamente. No Sudeste do país, a ocorrência de anticorpos contra BoHV-1 variou de 14,2 a 87,3% Melo et al. (2002). Na região Sul, foram encontradas variações de 18,8 e 64,4% de animais reagentes para BoHV-1 (ALFIERI; ALFIERI, 2000; DIAS et al., 2008; LOVATO et al., 1995; MÉDICI; VIDOR et al., 1995;).

Algumas características nos rebanhos podem influenciar na ocorrência da enfermidade. De acordo com estudos realizados com plantéis ingleses, o constante ingresso de bovinos de diferentes origens, a presença de animais mais velhos, o manejo intensivo e o maior número de cabeças por rebanho são fatores de risco para a ocorrência de BoHV-1 (BOELAERT et al., 2005; WOODBINE et al., 2009). Dados obtidos por Dias et al. (2008) confirmam os fatores de risco supracitados e ainda incluem nesta lista a compra de reprodutores e o uso de pastagens comuns.

Bovinos são os principais reservatórios de BoHV-1, no entanto espécies de ruminantes silvestres, bubalinos, ovinos e caprinos já foram infectados experimentalmente pelo vírus (MOLLEMA et al., 2005; SIX et al., 2001). Em um estudo realizado por Scicluna et al. (2010), ficou comprovada a presença de partículas virais ativas em fezes de búfalos positivos para BoHV-1, o que pode representar uma fonte de contaminação ambiental para o herpesvírus. Os resultados ainda mostraram a infecção de búfalos por meio de vias naturais de transmissão, porém a capacidade dessa espécie em transmitir BoHV-1 para bovinos não está completamente elucidada.

## 2.4 LATÊNCIA

Uma característica marcante do BoHV-1, e dos alphaherpesvírus em geral, é sua capacidade de estabelecer latência no hospedeiro. Após a infecção primária, o vírus pode apresentar-se na forma latente nos gânglios sacrais (ACKERMANN; WYLER, 1984; VAN DER ENGELENBURG et al., 1993) e no gânglio trigêmeo (SHEFFY; DAVIES, 1972 apud HENZEL et al., 2008). A latência é caracterizada pela presença do genoma, ausência de expressão gênica considerável e pela

ausência na produção de progênieviral (ENGELS; ACKERMANN, 1996).

Dessa forma, os animais infectados tornam-se portadores vitalícios e podem voltar a eliminar o vírus no sêmen durante episódios de reativação viral. Fatores que causem depressão no sistema imunológico do hospedeiro, como estresse ou tratamento com corticoides, podem afetar o estado de latência e propiciar a reativação da infecção (FIELDS; KNIPE, 1992; MARSI; OLSON; NGUYEN, 1996; MILLER; VAN DERMAATEN, 1987).

Mesmo animais clinicamente saudáveis, nos quais a reativação do BoHV-1 está ocorrendo, podem apresentar infecções leves ou subclínicas e eliminar grandes quantidades de vírus no sêmen (SNOWDON, 1965; VAN DER ENGELENBURG et al., 1993). Esses achados ressaltam o risco de se utilizar touros soropositivos como doadores de sêmen para inseminação artificial (IA) (SHEFFY; KRINSKY, 1973 apud MAURILIO; AURORA; ROMULO, 1999).

Em estudo realizado por Henzel et al. (2008), foi observada em bezerras inoculadas pronunciada recrudescência clínica durante o período de reativação viral, além de reexcreção de BoHV-1 nas secreções vaginais em títulos moderados, o que parece ser suficiente para manter a circulação do vírus em rebanhos.

A relação de BoHV-1 e estresse é bem conhecida, conforme relatado por Proudfoot et al. (2012), referindo-se aos estudos realizados (VAN REENEN et al., 2000), quando bezerros isolados socialmente e inoculados experimentalmente com BoHV-1 excretaram mais vírus que aqueles que permaneceram junto aos lotes de costume.

Os animais infectados pelo BoHV-1, portadores permanentes do vírus, podem ser identificados por testes sorológicos através da detecção de anticorpos específicos incluem a soroneutralização (SN) e os ensaios imunoenzimáticos (ELISA) (KAHRS, 1977 apud TELMO et al., 1995).

A resposta imune humoral, usualmente medida por soroneutralização (SN), tem servido como indicador da infecção e também do estado imunológico contra o BoHV-1 (KAHRS, 1977).

O teste de SN é altamente específico e confiável para a detecção de anticorpos contra o BoHV-1. Os animais positivos apresentam títulos médios entre 8 e 64, ocasionalmente são registrados títulos mais altos e alguns animais parecem desenvolver títulos de anticorpos muito baixos ou não detectáveis (GIBBS; RWEYEMAMU, 1977 apud MARJORIE et al., 2001). A produção de anticorpos

contra o BoHV-1 pode ser detectada aproximadamente entre 8 a 12 dias pós-infecção, podendo persistir até 5 anos. Durante a fase primária da infecção são detectados anticorpos, IgM e IgG1 e na fase secundária IgG1 e IgG2 (GUY; POTGIETER, 1985).

A importância da avaliação sorológica no diagnóstico da infecção pelo BoHV-1 é evidente pois demonstra a distribuição geográfica do vírus. A implantação de um programa de controle para IBR/IPV está diretamente relacionada com a prevalência da infecção em determinadas regiões. Por isso, é importante a informação de surtos da doença com isolamento do vírus e o conhecimento da situação sorológica dos rebanhos, que traduz o nível de infecção dos bovinos pelo BoHV-1 (HALFEN; FERRARI, 1994).

## 2.5 EXCREÇÃO VIRAL NO SÊMEN

Sob condições naturais, os touros são infectados pelas vias aérea ou/e genital. Pequenos nódulos avermelhados na mucosa do prepúcio e do pênis evoluem para pústulas. O pênis torna-se avermelhado e dolorido, podendo o animal apresentar micção frequente e incapacidade para monta (WEIBLEN; KREUTZ; CANABARRO, 1991 apud CORREA, 1996).

Tem sido postulado que o BoHV-1, por replicar predominantemente na mucosa prepucial e na uretra, contamina o sêmen durante a ejaculação, quando o líquido seminal passa sobre as mucosas infectadas. Isto foi confirmado por Van Der Engelenburg et al. (1993) que encontraram mais de 90% do DNA total do BoHV-1 no fluido seminal, praticamente não havendo detecção do vírus junto aos espermatozoides.

Snowdon (1965 apud ROCHA, 1999) isolou o BoHV-1 no prepúcio de touros por um período de até 361 dias após infecção experimental. Straub (2001) demonstrou que o BoHV-1 pode estar presente na secreção prepucial de touros em títulos de  $10^8$  TCID<sub>50</sub>/ml, podendo facilmente contaminar o sêmen. Van Der Engelenburg et al. (1993), através do método de PCR, verificaram excreção do BoHV-1 no sêmen de touros por um período de até 65 dias após infecção experimental.

Xia et al. (1995), utilizando PCR, detectaram o vírus em sêmen de touros até 40 dias após a inoculação experimental pela via intraprepucial. Marsi, Olson e

Nguyen (1996) detectaram o BoHV-1 no sêmen de quatro touros através de PCR por até 18 dias após a infecção experimental primária e por até 14 dias após a reativação experimental da infecção.

## 2.6 RESISTÊNCIA DO VÍRUS NO SÊMEN

O BoHV-1 é o patógeno viral mais frequentemente encontrado no sêmen bovino. Sua transmissão tem sido amplamente favorecida pelo desenvolvimento de processos de criopreservação do sêmen, uma vez que as condições de processamento e armazenamento do sêmen são ideais para a preservação do BoHV-1 (AFSHAR; EAGLESOME, 1990).

Rocha et al. (1999) verificaram que a infectividade do BoHV-1 no sêmen pode permanecer conservada por até sete dias em temperatura de 4°C e por cinco dias em temperatura ambiente. Demonstraram, através do isolamento em cultivo celular e quantificação, não haver perda no título do BoHV-1 em sêmen bovino armazenado por mais de um ano em nitrogênio líquido (-196°C).

Spradbrow (1968 apud ROCHA et al., 1999) examinando o sêmen de 40 touros provenientes de três centrais de sêmen australianas, isolou o BoHV-1 em três ampolas provenientes de uma mesma coleta e descongeladas em épocas diferentes, utilizando cultivo celular de rim bovino. Após 12 meses de armazenamento, o vírus ainda estava presente em uma das amostras na concentração de 104,3 TCID 50/ml.

Não existe uma correlação obrigatória entre a presença de infecção pelo BoHV-1 e a detecção de anticorpos específicos circulantes, uma vez que tem sido relatada a detecção do BoHV-1 em amostras clínicas obtidas de animais soronegativos. Três possibilidades em que o vírus pode ser detectado no sêmen de touros soronegativos são citadas: a) animais suscetíveis com infecção ativa e excretando o vírus antes da produção de anticorpos; b) baixa sensibilidade do teste em detectar níveis reduzidos de anticorpos; c) alguns animais infectados podem desenvolver a imunidade celular sem resposta humoral mensurável. Desta forma, apesar de ser um importante instrumento para detecção de infecção, a pesquisa de anticorpos constitui-se em uma forma incompleta de se determinar a presença do BoHV-1 no sêmen (GEE; WALTGER; HAGE, 1996; HUCK et al., 1971; KUPFERSCHIMIED; REBELATTO; MORAES, 1986; PARSONSON; SNOWDON,



1975; XIA et al., 1995).

## 2.7 INFECÇÃO EM TOUROS DE CENTRAIS DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL (IA)

Knoblauch (1962) não verificou interferência sobre as taxas de concepção ou sobre a qualidade do sêmen obtido de touros soropositivos ao BoHV-1. Boeckx et al. (1968 apud MAURILIO et al., 1999) detectaram o BoHV-1 em touros de uma central de IA localizada na Bélgica, através de testes de isolamento e neutralização viral. Os autores verificaram que os animais inseminados com sêmen dessa central apresentavam baixas taxas de concepção.

Huck et al. (1971) isolou o BoHV-1 a partir de "swab" prepucial de quatro touros de uma central de IA sendo que um destes animais apresentava sorologia negativa no momento do isolamento viral.

Van Oirschot, Straver e Van Lieshout (1993), avaliando os sêmens de touros de uma central holandesa na qual nenhum sinal clínico de IBR havia sido observado, verificaram que 75 touros de um total de 116 examinados apresentavam infecção subclínica pelo BoHV-1, sendo o vírus isolado de 43 amostras de sêmen destes animais.

Gee et al. (1996) relataram a infecção pelo BoHV-1 em touros de uma central de IA holandesa supostamente negativa para BoHV-1. Dois animais mostraram sinais clínicos de IBR, tendo o BoHV-1 sido detectado em "swab" nasal por meio de PCR. Subsequentemente, o DNA do vírus foi detectado através de PCR em "swabs" nasais provenientes de outros 23 animais. Outros estudos também têm relatado a infecção pelo BoHV-1 em touros alojados em centrais de IA localizadas em diversos países, como África do Sul (MARÉ et al., 1961), Alemanha (STRAUB; MÄCKLE, 1966), Austrália (SPRADBROW, 1968), Dinamarca (AUTRUP; BITSCH, 1978), Noruega (SAXEGAARD, 1966) e Suíça (BRUNNER et al., 1988).

Weiblen et al. (1991) descreveram isolamentos de BoHV-1 em sêmen e "swabs" prepuciais de touros de uma central de IA brasileira, onde alguns animais vieram a apresentar sinais clínicos em um período de 13 dias após o primeiro isolamento.

Pituco (1988) detectou anticorpos específicos em 72,5% de 131 touros alojados em centrais de IA em São Paulo, Minas Gerais e Rio Grande do Sul, através de testes de soroneutralização.

Centrais de inseminação artificial podem ser propagadoras do patógeno, pois o BoHV-1 mantém sua viabilidade em amostras criopreservadas por até um ano Rocha, Gouveia e Leite (1999). Oliveira et al. (2012) encontraram 44,7% de positividade em 76 amostras de sêmen colhidas nos estados do Rio Grande do Sul e de Goiás.

Diante do risco de disseminação de patógenos pelo sêmen comercializado, em 2006, o Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MINISTÉRIO..., 2006), vinculado à Secretaria de Defesa Agropecuária, elaborou uma instrução normativa que regulamenta o registro e fiscalização de centro de coleta e processamento de sêmen (CCPS) bovino. Entre as exigências desta instrução normativa nº 53, tem-se que para a obtenção de inscrição de reprodutor estabelece a comunicação de quarentena por ocasião do ingresso do reprodutor na unidade de quarentena do CCPS, conforme modelo estabelecido no MAPA; cópia do Certificado de Registro Genealógico Definitivo - RGD ou do Certificado Especial de Identificação e Produção - CEIP; cópia da Certificação Zootécnica, conforme determinação do setor competente do MAPA - somente para animais inscritos com a finalidade de comercialização de sêmen; cópia do teste de Tipagem de DNA ou Sanguínea; cópia do Certificado Andrológico, conforme modelo estabelecido e atestado sanitário, conforme modelo estabelecido.

## 2.8 SINAIS CLÍNICOS

O BoHV-1 afeta, principalmente, os tratos respiratório e genital de bovinos, raramente há ocorrência conjunta das formas genital e respiratória da doença (RADOSTITS et al., 2007). Relatos recentes atribuem a ocorrência de encefalites à infecção por BoHV-1 e BoHV-1.2b (BATISTA et al., 2010), este último considerado um subtipo menos patogênico.

1) Rinotraqueite infecciosa bovina (IBR) – É uma das doenças que compõem o complexo respiratório bovino, responsável por significativas perdas produtivas, principalmente devido ao aumento da mortalidade e ao menor desenvolvimento entre animais jovens, à menor produção leiteira e ao ganho de peso, além de interferir na performance reprodutiva do rebanho (GAY; BARNOUIN, 2009).

A manifestação clínica da doença caracteriza-se pela ocorrência de febre, anorexia, apatia, descargas mucopurulentas nasais e oculares, conjuntivite, erosões

e hiperemia na mucosa nasal, dispneia, tosse, estridor traqueal e aumento dos linfonodos locais (SPILKI et al., 2004).

2) Vulvovaginite pustular infecciosa (IPV) – A IPV aguda pode se desenvolver no trato genital de fêmeas entre dois a quatro dias após episódios de cobertura natural ou inseminação artificial com sêmen infectado. Clinicamente, os sinais são observados após um período de incubação que varia de um a três dias e caracterizam-se pelo aparecimento de hiperemia, corrimento genital que varia de seromucoso a mucopurulento e edemaciação da vulva, além de pequenas pústulas distribuídas na mucosa, que podem coalescer formando úlceras recobertas por material fibrinoso que ocupam uma grande parcela da superfície vulvar (DEL FAVA, 2001; HENZEL et al., 2008).

Entretanto, IBR e IPV não são as únicas formas de manifestação clínica das infecções pelo BoHV-1. Tanto em rebanhos de corte quanto de leite também podem ocorrer quadros clínicos de conjuntivite, enterite, encefalite e distúrbios reprodutivos. Estes são caracterizados por mortalidade embrionária precoce e/ou tardia, com repetições de cios a intervalos regulares e/ou irregulares; mortalidade fetal com aborto; natimortos; mortalidade neonatal e infertilidade (KARHS, 1977; STRAUB, 1991).

3) Balanopostite pustular infecciosa (IPB) – Machos infectados por BoHV-1 podem desenvolver inflamação grave do pênis e do prepúcio, com lesões semelhantes às descritas na IPV. Em virtude do desconforto causado pelos danos no trato genital, o macho evita a monta e, em alguns reprodutores, pode haver prejuízos temporários à qualidade do sêmen, como anomalias morfológicas e funcionais dos espermatozoides (LATA JAIN et al., 2008).

4) Abortamento e lesões nos bezerros – O maior prejuízo ocorre na esfera reprodutiva e durante um surto; até 25% das matrizes gestantes podem abortar, especialmente entre o quinto e o oitavo mês de gestação (FLORES, 2007), contudo a inoculação experimental em novilhas gestantes mostrou que a maioria dos bezerros veio a termo, porém com a condição de portadores do vírus (MILLER, 1991). Bezerros infectados durante os estágios finais de seu desenvolvimento fetal podem apresentar a forma sistêmica da enfermidade, caracterizada por infecção aguda, com aparecimento de lesões necróticas nas mucosas dos tratos digestivo e respiratório, fígado, rins e quadros de encefalite, que levam a cria ao óbito poucas horas após o parto (RADOSTITS et al., 2007).

## 2.9 DIAGNÓSTICO

O isolamento viral em cultivo celular é considerado o teste padrão para a identificação de BoHV-1. O diagnóstico pode ser realizado a partir de swabs de secreções nasais, oculares e genitais, além de sêmen e tecidos de fetos abortados e anexos fetais. As técnicas de imunoperoxidase e imunofluorescência são alternativas mais rápidas para o diagnóstico virológico. O material para análise inclui cortes ou impressões de tecido, esfregaço de secreções e de sêmen. Em tecidos autolisados ou com contaminação bacteriana, podem ocorrer reações inespecíficas que interferem na leitura final dos testes (WORLD..., 2009).

A sorologia pode ser realizada por SN ou por ELISA, e estes testes têm sido largamente utilizados em inquéritos epidemiológicos, certificação de rebanhos e triagem de reprodutores destinados à coleta e comercialização de sêmen. A técnica de SN tem importante aplicação na realização de testes pareados, permitindo a identificação das diferentes fases da infecção e a circulação viral ativa no rebanho. A constante busca pelo aperfeiçoamento dessas técnicas resultou na diversificação e validação de novos métodos diagnósticos (PARREÑO et al., 2010).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) apresenta grande aplicabilidade no diagnóstico veterinário, podendo ser utilizada também na genotipagem, nas análises filogenéticas dos patógenos na identificação de animais positivos durante a forma latente da infecção (SCHMITT; HENDERSON; DEKA, 2005). Entre as vantagens desta técnica está a detecção de quantidades ínfimas de DNA viral na amostra, apresentando maiores sensibilidade e especificidade quando comparada ao ELISA e ao isolamento viral (WORLD..., 2009), além da utilização de diversos tipos de tecidos e secreções que podem conter partículas viáveis ou não. Esta técnica permitiu a Silva et al. (2009) identificarem, em amostras de tecido fetal, diferentes agentes etiológicos causadores de abortamentos, incluindo BoHV-1. Variações deste método, como a PCR em tempo real, nested-PCR, semi-nested PCR e Multiplex PCR, mostram-se adequadas para a identificação de DNA viral, sendo esta última utilizada para diagnóstico diferencial de encefalites bovinas provocadas por BoHV-1 ou BoHV-5 (DEKA et al., 2005; FONSECA JUNIOR et al., 2011; MEDINA et al., 2009; TAKIUCHI et al., 2003).

Takiuchi et al. (2005), afirmaram que a técnica de PCR possibilita a amplificação de segmentos do genoma a partir de diferentes tipos de materiais

biológicos, como fragmentos de tecidos, feto abortado, sistema nervoso central, secreções e sêmen. Além disso, é uma ferramenta indispensável para a avaliação da sanidade dos embriões produzidos por biotécnicas da reprodução. Esta avaliação é possível, pois permite a detecção de baixa concentração viral em embriões, fluidos uterinos e líquido de lavagem, os quais nem sempre são detectados por outros métodos de diagnóstico (TAKIUCHI et al., 2005).

O BoHV1 deve ser monitorado em touros de centrais de inseminação artificial pela técnica de PCR, uma vez que o vírus é eliminado de forma intermitente no fluido seminal de bovinos soropositivos. Esse procedimento permite o controle da qualidade de sêmen e minimiza os riscos de transmissão da doença em centrais de coleta de sêmen (MASRI et al., 1996; ROCHA et al., 1998).

## 2.10 CONTROLE E PREVENÇÃO

Ações como manejo sanitário e nutricional adequados, desinfecção periódica das instalações e imunização dos animais, dificultam a disseminação viral dentro do rebanho (RADOSTITS et al., 2007). A vacinação é recomendada em locais onde a infecção por herpesvírus é endêmica, bem como em propriedades onde haja condições favoráveis para a transmissão viral. Nesses casos, a erradicação da enfermidade é economicamente inviável, pelo grande custo envolvido no descarte de animais, e a imunização dos animais torna-se uma maneira eficaz de diminuir as perdas econômicas advindas da manifestação clínica da doença (PATEL, 2005).

O uso generalizado de vacinas convencionais anti-BoHV-1 não parece ter reduzido a prevalência da infecção. Por outro lado, um grande número de animais soropositivos tem sido detectado nos testes sorológicos, sem poder ser realizada a diferenciação entre animais infectados e vacinados. Vacinas marcadas permitem essa diferenciação e parecem ser mais indicadas, principalmente para uso em touros de centrais e em programas de erradicação do BoHV-1 (FLORES et al., 1993; VAN OIRSCHOT et al., 1993).

No Brasil, é permitida a imunização de animais com vacinas inativadas (DEL FAVA, 2001). As vacinas inativadas são capazes de minimizar a manifestação dos sinais clínicos e reduzir a excreção viral, contudo não foram efetivas na prevenção da primoinfecção em bezerros amamentados com o colostro de vacas imunizadas durante a gestação (MOREIRA et al., 2001). Segundo Silva et al. (2007), há

necessidade de reavaliação dos critérios para o licenciamento e a importação de vacinas contra BoHV-1, já que as seis vacinas comerciais testadas no estudo falharam ao induzir uma resposta imunológica adequada. Alguns estudos estão sendo realizados visando melhorar a eficácia desse produto biológico. Cilento et al. (2011) produziram uma vacina inativada contra BoHV-1 que induziu níveis de anticorpos moderados a altos tanto na mucosa quanto no compartimento sistêmico. Outra alternativa testada por Weiss et al. (2010) é a vacinação intravaginal, que se mostrou efetiva na redução da gravidade e na duração da sintomatologia clínica, bem como no período de excreção viral após o desafio.

A imunização com vacinas recombinantes pode ser uma alternativa em locais que precisam diminuir a ocorrência da infecção para, posteriormente, erradicar o agente viral. Esse tipo de imunógeno permite a diferenciação entre cepas vacinais e não vacinais, por meio de teste ELISA que detecta anticorpos contra uma glicoproteína presente somente nos isolados de campo. Franco (2002) desenvolveu uma vacina recombinante (gE) que apresentou atenuação, imunogenicidade e efeito protetor frente ao desafio com vírus homólogo. Entretanto, esse tipo de vacina requer estudos mais aprimorados.

A questão da vacinação é um tema delicado, e alguns fatores devem ser levados em consideração antes de iniciarem um programa de vacinação nos rebanhos. Inicialmente, deve ser realizada uma análise de custo financeiro, levando-se em conta o preço cobrado pelo produto biológico e também os custos relativos ao manejo. Também deve ser realizado um amplo diagnóstico diferencial, de forma a excluir outros agentes de problemas reprodutivos para o rebanho. Por último, uma avaliação rigorosa do manejo implementado no rebanho deve ser realizada, de forma a minimizar o estresse e a evitar a expressão de herpesvírus latentes. O estresse será sempre um complicador, e a utilização apenas de produtos biológicos (vacinas) pode não contornar determinadas situações de surtos causados por herpesvírus (FINO et al., 2012).

## REFERÊNCIAS

- ACKERMANN, M.; ENGELS, M. Pro and Contra IBR- eradication. **Vet. Microbiol.**, v. 113, n. 3-4, p. 293-302, 2006.
- ACKERMANN, M.; WYLER, R. The DNA of an IPV Strain of Bovine Herpesvirus 1 in Sacral Ganglia During Latency After Intravaginal Infection. **Vet. Microbiol.**, v. 9, p. 53-63, 1984.
- AFSHAR, A.; EAGLESOME, M. D. Viruses Associated With Bovine Semen. **Veterinary Bulletin**, v. 60, n. 2, p. 93-109, 1990.
- ALICE, F. J. Isolamento do vírus da rinotraqueite infecciosa bovina (IBR) no Brasil. **Rev. Bras. Biol.**, v. 38, n. 4, p. 919-20, 1978.
- AUTRUP, E. H.; BITSCH, V. The occurrence, control and eradication of infectious bovine rhinotracheitis virus infection at artificial insemination centres in Denmark. **Nordisk Vet. Med.**, v. 30, n. 4-5, p. 169-77, 1978.
- BARBOSA, A. C. V. C.; BRITO, W. M. E. D.; ALFAIA, B. T. Soroprevalência e fatores de risco para a infecção pelo herpesvírus bovino Tipo 1 (BHV-1) no Estado de Goiás, Brasil. **Ciênc. Rural**, n. 35, v. 6, p. 1368-73, 2005.
- BATISTA, H. B. C. R. et al. Herpesvírus bovinos (BoHV-1.1 e BoHV-1.2b) em forma infecciosa em encéfalos de bovinos submetidos ao diagnóstico de raiva no Estado do Rio Grande do Sul. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 62, n. 5, 2010.
- BOECKX, M. IBRAHIM, M., BOUTERS, R. De invloed van en acute IPV/IBR incetie op de bevruchtigs resultaten van K.I. stieren. **Vlaams Diergerrees kunding Tijdschrift**, v. 37, p. 177-88, 1968.
- BOELAERT, F. et al. Risk factors for bovine herpesvirus-1 seropositivity. **Prev. Vet. Med.**, v. 69, p. 285-95, 2005.
- BRUNNER, D. et al. A Comparison of Three Techniques for Detection of Bovine Herpesvirus Type 1 (BHV-1) in Naturally and Experimentally Contaminated Bovine Semen. **Zuchtygiene**, v. 23, n. 1, p. 1-9, 1988.
- CERQUEIRA, R. B. et al. Serological Survey for Bovine Herpesvirus 1 in Cattle from Different Regions in the State of Bahia, Brazil. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 37, n. 6, p. 497-500, 2000.
- CHAPMAN, M. S. Survival of infectious bovine rhinotracheitis virus in stored bovine semen. **Vet. Scienc. Com.**, v. 3, n. 2, p. 137-9, 1979.
- CORREA, F. R. et al. Viroses Confundíveis com Febre Aftosa. **Ciênc. Rural, Santa Maria**, v. 26, n. 2, p. 323-32, 1996.
- CILENTO, M.C. et al. Systemic and Local Antibodies Induced by an Experimental Inactivated Vaccine Against Bovine Herpesvirus Type 1. **Ciênc. Rural**, v. 41, p. 307-313, 2011.

D'ARCE, R. C. F. et al. Restriction Endonuclease and Monoclonal Antibody Analysis of Brazilian Isolates of Bovine Herpesvirus Types 1 and 5. **Vet. Microbiol.**, v. 88, p. 315-24, 2002.

DEKA, D. et al. Detection of Bovine Herpesvirus-1 Infection in Breeding Bull Semen by Virus Isolation and Polymerase Chain Reaction. **Rev. Sci. Zoo.**, v. 24, p. 1085-94, 2005.

DEL FAVA, C. **Índices reprodutivos e características de desempenho em bovinos de corte, infectados e não infectados pelo herpesvírus bovino Tipo 1 (HVB-1)**. 2001. 127 f. Tese (Doutorado em Clínica Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

DELHON, G. et al. Genome of Herpesvirus 5. **J. Virol, United States**, v. 77, n. 19, 2003.

DIAS, J.A.; ALFIERI, A.A.; MÉDICI, K.C.; FREITAS, J.C.; FERREIRA NETO, J.S. & MÜLLER, E. Fatores de Risco Associados à Infecção Pelo Herpesvírus Bovino 1 em Rebanhos Bovinos da Região Oeste do Estado do Paraná. **Pesq. Vet. Bras.**, v.28, n.03, 2008.

DIAS, M. M. **Avaliação do estresse do desmame em bezerros de corte e sua relação com a performance produtiva**. 2006. 84 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

ENGELS, M.; ACKERMANN, M. Pathogenesis of Ruminant Herpesvirus Infections. **Vet. Microbiol.**, v. 53, n. 2, p. 3-15, 1996.

FEHLER, F. et al. Glycoprotein IV of bovine Herpesvirus 1 Expressing Cell Line Complements and Rescues a Conditionally Lethal Viral Mutant. **J. Virol.**, v. 66, n. 2, p. 831-9, 1992.

FENNER, F. et al. **Veterinary virology**. San Diego: Academic Press, 1987. cap.19, p. 347-56.

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

FINO, et al. Infecções por herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e as suas implicações na reprodução bovina. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 36, n. 2, p. 122-7, 2012.

FLORES, E. F. **Virologia veterinária**. Santa Maria: UFMS, 2007. p. 435-62.

FONSECA JUNIOR, A. A. et al. PCR Multiplex para detecção dos principais herpesvírus neurológicos de ruminantes. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 63, n. 6, p. 1403-13, 2011.

FRANCO, A. C. A. Brazilian glycoprotein e negative bovine herpesvirus type 1.2a (BHV-1.2a) mutant is attenuated for cattle and induces protection against wild-type virus challenge. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 22, p. 135-40, 2002.

GALVÃO, C. L.; DORIA, J. D.; ALICE, F. J. Anticorpos Neutralizantes para o Vírus



Rinotraqueite infecciosa dos Bovinos, em Bovinos do Brasil. **Bol. Inst. Biol. Bahia**, v. 6, p. 15-25, 1962/1963.

GAY, E.; BARNOUIN, J. A nation-wide epidemiological study of acute bovine respiratory disease in France. **Prev. Vet. Med.**, v. 89, p. 265-71, 2009.

GEE, A. L. W.; WALTGER, L. H. A.; HAGE, J. J. The use a polymerase chain reaction assay for the detection of bovine herpesvirus 1 in semen during a natural outbreak of infectious bovine rhinotracheitis. **Vet. Microbiol.**, v. 53, p. 163-8, 1996.

GIBBS, E. P. J.; RWEYEMANN, M. M. Bovine herpeavirus 1. **Vet. Bulletin.**, v. 47, n. 5, p. 317-43, 1977.

GÓLAN, A. E. et al. Detection of Bovine Herpesvirus Type 1 in Frozen Semen and Aborted Foetuses in Santa Fe Province, Argentina. **Avances en Ciencias Veterinarias**, v. 5, n. 2, p. 142-5, 1990.

GUY, J. S.; POTGIETER, L. N. D. Bovine Herpesvirus-1 Infection of Kinetics of Antibody nation of Intranasal Exposure and Abortion Induced by Ihe Vírus. **Am. J. Vet. Res.**, v. 46, n. 4, p. 893-8, 1985.

HALFEN, D. C.; FERRARI, M. F. Infecções por Herpesvirus Bovino-1 em Bovinos no Rio Grande do Sul. **Bol. Lab. Reg. de Diag.**, n. 4, p. 31-7, 1994.

HENZEL, A. et al. Aspectos virológicos e clínico-patológicos da infecção genital aguda e latente pelo herpesvírus bovino tipo 1.2 em bezerras experimentalmente infectadas. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 28, p. 140-8, 2008.

HOLZ, C. L. et al. Soroprevalência de herpesvírus bovinos tipos 1 e/ou 5 no Estado do Rio Grande do Sul. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 29, n. 9, p. 767-73, 2009.

HUCK, R. A.; MILLAR, P. G.; EVANS, D. H.; STABLES, J. W. Balanoposthitis associated with infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis (I.B.R./I.P.V.) virus in a stud of bulls. **Vet. Rec.**, v. 88, p. 292-7, 1971.

INSTITUTO DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO ESTADO DE MATO GROSSO (INDEA-MT). **Relatório de população bovina existente no Estado de Mato Grosso**. Cuiabá: Secretaria de Agricultura de Mato Grosso, 2015.

KAHRS, R. F. Infectious bovine rhinotracheitis: a review and update. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 171, n. 10, p. 1055-64, 1977.

KENDRICK, J. W.; GILLESPIE, J. H.; McENTEE, K. Infectious Pustular Vulvovaginitis of Cattle. **Cornell. Vet.**, v. 48, n. 4, p. 458-95, 1958.

KNOBLAUCH, H. Der Virus-Blaerschenaussschlag des Rindes als Massener Krankheit auf Einer Besamungsstation. **Monats. Fur. Vet.**, v. 17, p. 445-50, 1962.

KOPPERS-LALIC, D. et al. The UL 41- E coded virion host shutoff (VHS) protein and VHS independent mechanisms are responsible for down – regulation of MHC class 1 molecules by bovine herpesvirus 1. **J. Gen. Virol. England**, v. 82, p. 2071-81, 2001.

KUPFERSCHIMIED LOVATO, L. T. et al. Serology survey of bovine herpesvirus type 1 infection in dairy herds of Rio Grande do Sul State. **Res. Virologic.**, p. 253, 1993.

LATA JAIN, V. et al. Detection of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) infection in semen of breeding bulls of gujarat by a direct fluorescence test. **Buff. Bull.**, v. 27, n. 2, p. 202-6, 2008.

LEMAIRE, M.; PASTORET, P. P.; THIRY, E. Le controle de infection pas le virus de la rhinotracheite infectieuse bovine. **Annales de Méd. Vet.**, v. 138, p. 167-80, 1994.

LOVATO, L. T. et al. Herpesvírus bovino tipo 1(BoHV-1): inquérito soro-epidemiológico no rebanho leiteiro no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciênc. Rural**, v. 25, n. 3, p. 425-30, 1995.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Legislação**. Brasília, DF: Secretaria de Política Agrícola, 2006.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Plano Agrícola e Pecuário 2013-2014**. Brasília, DF: Secretaria de Política Agrícola, 2014.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Plano Agrícola e Pecuário 2014-2015**. Brasília, DF: Secretaria de Política Agrícola, 2015.

MARSI, S. A. et al. Rapid detection of bovine herpesvirus 1 in semen of infected bulls by a nested polymerase chain reaction. **Canadian J. of Vet. Res.**, v. 60, p. 100-7, 1996.

McKERCHER, D. G.; BIBRACK, B.; RICHARDS, W. P. C. Effects of the infectious bovine rhinotracheitis virus on the central nervous system of cattle. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 56, n. 10, p. 1460, 1970.

MÉDICI, K. C.; ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F. Prevalência de anticorpos neutralizantes contra o herpesvírus bovino tipo 1, decorrente de infecção natural, em rebanhos com distúrbios reprodutivos. **Ciênc. Rural**, v. 30, n. 2, p. 347-50, 2000.

MEDINA, M. R. et al. Development and evaluation of a polymerase chain reaction assay to detect bovine herpesvirus 1. **Span. J. Agric. Res.**, v. 7 n. 1, p. 59-66, 2009.

MELO, C. B. et al. Distribuição de anticorpos para herpesvírus bovino 1 em rebanhos bovinos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 54, n. 6, p. 575-80, 2002.

MELO, C. B. et al. Prevalência de anticorpos contra herpesvírus bovino-1, vírus da diarréia viral bovina e vírus da leucose enzoótica bovina em bovinos do Estado de Sergipe, Brasil. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 21, n. 2, p. 160-1, 1997.

MELO, C. B. et al. Distribuição de herpesvírus bovino tipo 1 em rebanhos bovinos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 54, p. 575-80, 2002.

METZLER, A. E.; SCHUDEL, A. A.; ENGELS, M. Bovine herpesvirus 1: molecular and antigenic characteristics of variant viruses isolated from calves with neurological disease. **Arch. Virol.**, v. 87, p. 205-17, 1986.

- MILLER, J. M.; VAN DER MAATEN, M. J. Early Embrionic death in heifers after inoculation with bovine herpesvirus-1 and reactivation of latent virus in reproductive tissues. **Am. J. Vet. Res.**, v. 48, n. 11, p. 1555-8, 1987.
- MILLER, N. J. Infectious necrotic rhinotracheitis of cattle. **J. Am. Vet. Medic. Assoc.**, v. 126, n. 939, p. 463-7, 1955.
- MOLLEMA, L. et al. Quantification of the transmission of bovine herpesvirus 1 among red deer (*cervus elaphus*) under experimental conditions. **Vet. Microbiol.**, v. 111, p. 25-34, 2005.
- MUELLER, S. B. K. et al. Isolamento e identificação do vírus da rinotraqueíte infecciosa dos bovinos de um rim de feto de bovino (IBR / IPV). **Arq. Inst. Biol.**, v. 45, n. 3, p. 187-90, 1978.
- MURPHY, F. A. et al. **Veterinary virology**. 3rd. Academic Press, 1999. p. 301-25.
- OKAZAK, K.; HONDA, E.; KONO, Y. Heparin – binding of BoHV-1 Glicoprotein g. **Arch. Virol. Austria**, v. 134, n. 3-4, p. 413-9, 1994.
- OKAZAKI, K. et al. Bovine Herpesvirus 1 GP 87 Mediates Both Attachment of Virions to Susceptible Cells and Haemagglutination. **Arch. Virol.**, v. 97, p. 297-307, 1987.
- OLIVEIRA, M. T. et al. Detection of Bovine herpesvirus 1 and 5 in semen from brazilian bulls. **Theriogenology**, v. 75, p. 1139-45, 2010.
- PARREÑO, V. et al. Validation of an indirect elisa to detect antibodies against bohv-1 in bovine and guinea-pig serum samples using ISO/IEC 17025 standards. **J. Virol. Meth.**, v. 169, p. 143-53, 2010.
- PARSONSON, I. M.; SNOWDON, W. A. The Effect of Natural and Artificial Breeding Using Bulls Infected With or Semen Contaminated With IBR Virus. **Aust. Vet.**, v. 51, p. 365-9, 1975.
- PASSOS, E. C. et al. Pesquisa do vírus da rinotraqueíte infecciosa/vulvovaginite pustular infecciosa (IBR/IPV) em sêmen e swab prepucial e estudo da persistência de anticorpos em touros doadores. **Rev. Bras. Rep. Animal**, v. 16, n. 3-4, p. 87-93, 1992.
- PATEL, J. R. Characteristics of live bovine herpesvirus-1 vaccines. **Vet. J.**, v. 169, p. 404-16, 2005.
- PITUCO, E. M. **Ocorrência da rinotraqueíte infecciosa dos bovinos/vulvovaginite pustular infecciosa (IBR/IPV) em rebanhos bovinos criados nos Estados de São Paulo, Rio Grande do Sul, Paraná e Minas Gerais: utilização das reações sorológicas de microssoroneutralização, microhemoaglutinação passiva e da imunofluorescência indireta para detecção de anticorpos anti-herpesvírus bovino-1**. 1988. 74 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Bovina) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São, São Paulo, 1988.
- PITUCO, E. M. et al. Detecção de anticorpos contra o herpesvírus bovino tipo 1

(BoHV-1) em rebanhos de corte e leite com problemas reprodutivos no Brasil. **Arq. Inst. Biol.**, v. 66, p. 126, 1999.

RADOSTITS, O. M. et al. **Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats**. 10. ed. Philadelphia: Saunders-Elsevier, 2007. p. 1691-783.

RISSI, D. R. et al. Meningoencefalite por herpesvírus bovino tipo 5. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 27, n. 7, p. 261-8, 2007.

ROCHA, M. A.; GOUVEIA, A. M. G.; LEITE, R. C. Herpesvírus bovino tipo 1 no sêmen. **Ciênc. Rural**, v. 29, p. 373-80, 1999.

ROCHA, M. A.; BARBOSA, E. F.; DIAS NETO, E. A High sensitivity NESTED PCR assay for BHV-1 detection in semen of naturally infected bulls. **Vet. Microbiol.**, v. 63, n. 1, p. 1-11, 1998.

ROCHA, M. A.; GOUVEIA, A. M. G.; LEITE, R. C. Detecção de anticorpos para o herpesvírus bovino-1 em touros de uma central de sêmen. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 19, n. 3-4, p. 181-6, 1995.

ROCHA, M. A. et al. Isolamento do herpesvírus bovino-1 (HVB-1) em sêmen de touros de uma central brasileira de inseminação artificial. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 21, n. 2, p. 62-3, 1997.

ROIZMAN, B. et al. The family herpesviridae: an update the herpesvirus study group of the international committee on taxonomy of viruses. **Arch. Virol.**, v. 123, p. 425-49, 1992.

ROIZMAN, B. et al. Family Herpesviridae. **Arch. Virol.**, v. 10, p. 114-27, 1995.

SAXEGAARD, F. Problems connected with the diagnosis of subclinical infectious pustular vulvovaginitis virus (IPV VIRUS) in bulls. **Nordisk Vet. Med.**, v. 18, p. 452-9, 1966.

SCHMITT, B.; HENDERSON, L. Diagnostic tools for animal diseases. **Rev. Sci. Tech OffInt. Epi. Zoot.**, v. 24, p. 243-50, 2005.

SCHWYZER, M.; ACKERMANN, M. Molecular Virology of Ruminant Herpesviruses. **Vet. Microbiol.**, v. 53, p. 17-29, 1996.

SCICLUNA, M. T. et al. Should Domestic Buffalo (*Bubalus Bubalis*) be Considered in the Epidemiology of Bovine Herpesvirus 1 infection? **Vet. Microbiol.**, v. 143, p. 81-8, 2010.

SHEFFY, B. E.; KRINSKY, M. Infectious Bovine Herpesvirus in Extended Bovine Semen. **Proceedings of the United States animal Health Association**, v. 77, p. 131-7, 1973.

SILVA, F. F. et al. Anticorpos Neutralizantes Contra o HVB-1 em Bovinos do Estado de Pernambuco. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 47, p. 597-9, 1995.

- SILVA, L. F.; WEIBLEN, R.; FLORES, E. F. Imunogenicidade de vacinas comerciais inativadas contra o herpesvírus bovino tipo 1. **Ciênc. Rural**, v. 37, p. 1471-4, 2007.
- SILVA, T. M. A. et al. Diagnóstico etiológico de aborto infeccioso bovino por PCR. **Ciênc. Rural**, v. 39, p. 2563-70, 2009.
- SILVA, M. S. et al. Identificação e diferenciação de herpesvírus bovino tipos 1 e 5 isolados de amostras clínicas no centro-sul do Brasil, Argentina e Uruguai (1987-2006). **Pesq. Vet. Bras.**, v. 27, n. 10, p. 403-8, 2007.
- SIX, A. et al. Latency AND Reactivation of Bovine Herpesvirus 1 (BHV-1) in Goats and of Caprine Herpesvirus 1 (CAPHV-1) in Calves. **Arch. Virol.**, v. 146, p. 1325-1335, 2001.
- SNOWDON, W. A. The IBR-IPV Virus: reaction to infection and intermittent recovery of virus from experimentally infected cattle. **Aust. Vet. J.**, v. 41 p. 135-42, 1965.
- SPIILKI, F. R. et al. Comparative Pathogenicity of Bovine herpesvirus 1 (BHV-1) Subtypes 1 (BHV-1.1) and 2a (BHV-1.2a). **Pesq. Vet. Bras.**, v. 24, p. 43-9, 2004.
- SPRADBROW, W. A. The Isolation of infectious bovine rhinotracheitis virus from bovine semen. **Aust. Vet. J.**, v. 44, n. 9, p. 410-2, 1968.
- STEUKERS, L. et al. Comparative analysis of replication characteristics of BoHV-1 subtypes in bovine respiratory and genital mucosa explants: a phylogenetic enlightenment. **Vet. Res.**, v. 42, n. 33, p. 1-11, 2011.
- STRAUB, O. C. Advances in BoHV-1 (IBR) research. **DTSCH. Tierarztl. Wochenscht**, v. 108, p. 419-22, 2001.
- STRAUB, O. C.; KIELWEIN, G. Experimentelle Mastitiden Durch das Schenauerschlag Virus des Rides. **Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschrift**, v. 79, p. 310-2, 1966.
- STRAUB, O. C.; MACKE, N. Ein Ausbruch des Blaeschenauschlags in einer Besamungsstation. **Tierartzliche Umschau**, v. 20, p. 113-6, 1965.
- TAKIUCHI, E.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A.A. Herpesvírus bovino tipo 1: tópicos sobre a infecção e métodos de diagnóstico. **Semina, Ciênc. Agr.**, v. 22, n. 2, p. 203-9, 2001.
- TAKIUCHI, E. et al. Bovine herpesvirus type 1 abortions detected by a semi nested – PCR in Brazil cattle herds. **Res. Vet. Sci.**, v. 79, n. 1, p. 85-8, 2005.
- TAKIUCHI, E. et al. Otimização da reação em cadeia pela polimerase (SemiNested-PCR) para a detecção do herpesvírus bovino tipo 1 em fragmentos de órgãos fetais e em semen de bovinos naturalmente infectados. **Semina, Ciênc. Agr.**, v. 24, p. 43-56, 2003.
- TEIXEIRA, M. F. B. et al. ELISA de bloqueio monoclonal para o diagnóstico sorológico de infecções pelo herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1). **Pesq. Vet. Bras.**, v. 21, n. 1, p. 33-7, 2001.

- VAN DER ENGELENBURG, F. A. C. et al. Development of a rapid and sensitive polymerase chain reaction assay for detection of bovine herpesvirus type 1 in bovine semen. **J. Clin. Microbiol.**, v. 31, p. 3129-35, 1993.
- VAN DRUNEN LITTLE-VAN DER HURK, S.; HUGUES, G.; BABIUK, L. A. The Role of Carbohydrate in the Antigenic and Immunogenic Structure of Bovine Herpesvirus Type 1 Glycoproteins G1 and GIV. **J. Gen. Virol.**, v. 71, p. 2053-63, 1990.
- VAN OIRSCHOT, J. T. et al. A Subclinical infection of bulis with bovine herpesvirus type 1 at an artificial insemination centre. **Vet. Rec.**, v. 132, n. 2, p. 32-5, 1993.
- VAN REENEN, C. et al. Social Isolation may Influence Responsiveness to Infection with Bovine Herpesvirus 1 in Veal Calves. **Vet. Microbiol.**, v. 75, p. 135-43, 2000.
- VIDOR, T. et al. Herpes bovino tipo 1 (HVB-1): sorologia de rebanhos com problemas reprodutivos. **Ciênc. Rural**, v. 25, n. 3, p. 421-4, 1995.
- VIEIRA, S. et al. Anticorpos para o herpesvírus bovino 1(BHV-1) em bovinos do Estado de Goiás. **Ciênc. Anim. Bras.**, v. 4, n. 2, p. 131-7, 2003.
- VIEIRA, S. et al. Anticorpos para o Herpesvírus Bovino Tipo 1(BoHV-1) em Bovinos do Estado de Goiás. **Ciênc. Anim. Bras.**, v. 4, n. 2, p. 131-7, 2003.
- WEIBLEN, R. et al. Bovine herpesvirus isolation from sémen and preputial swabs. In: Annual Meeting of the American Assodation of Laboratory Diagnostidans. **Proceedings...** San Diego, 1991.
- WEIBLEN, R. et al. Bovine meningoencephalitis from IBR virus. **Vet. Rec.**, v. 124, p. 666-7, 1989.
- WEISS, M. et al. Imunização genital de bezerras com uma cepa recombinante do herpesvírus bovino tipo 1 defectiva naglicoproteína e confere proteção frente a desafio com um isolado virulento. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 30, p. 42-50, 2010.
- WINKLER, M. T.; DOSTER, A.; JONES, C. Bovine herpesvirus 1 can infect CD4(+) T lymphocytes and induce programmed cell de ath during acute infection of cattle. **J. Virol, United States.**, v. 73, n. 10, p. 8657-68, 1999.
- WOODBINE, K. A. et al. A four longitudinal sero-epidemiological study of bovine herpesvirus type-1 (BHV-1) in adult cattle in 107 unvaccinated HERDS in south west england. **BMC. Vet. Res.**, v. 5, p. 5-6, 2009.
- WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE). **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**, 2009.
- XIA, J. Q. et al. Detection of bovine herpesvirus 1 in the semen of experimentally infected bulls by dot-blot hybridisation, polymerase chain reaction and virus isolation. **Res. Vet. Sci.**, v. 59, p. 183-5, 1995.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar a excreção do BoHV-1 em sêmen de touros de algumas propriedades do Estado de Mato Grosso por meio da técnica molecular de detecção PCR.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Verificar a importância do modo de transmissão venérea da infecção pelo BoHV-1 por meio da caracterização de percentuais de touros positivos para a presença do BoHV no sêmen.
- Comparar a frequência de ocorrência da eliminação do BoHV-1 através do sêmen com a idade dos touros comprovadamente infectados.

**4 ARTIGO 1****AVALIAÇÃO MOLECULAR DA EXCREÇÃO DO HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 1  
(BOHV-1) NO SÊMEN DE TOUROS DO ESTADO DE MATO GROSSO**



## **AVALIAÇÃO MOLECULAR DA EXCREÇÃO DO HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 1 (BoHV-1) NO SÊMEN DE TOUROS DO ESTADO DE MATO GROSSO**

*Molecular Evaluation of Bovine Herpesvirus 1 (BoHV-1) Shedding in Semen Samples of Bulls from Mato Grosso State*

Raphael Campos QUINTEIRO  
Michele LUNARDI

### **RESUMO**

O Herpesvírus Bovino tipo 1 (BoHV-1) encontra-se amplamente disseminado em rebanhos bovinos. O BoHV-1 pode ser encontrado no sêmen de touros, independente do desenvolvimento de anticorpos neutralizantes. A infecção pelo BoHV-1 afeta principalmente os tratos respiratório e genital dos bovinos e pode ser subdividida em duas entidades clínicas denominadas Rinotraqueite Infecciosa Bovina (IBR) e Vulvovaginite/Balanopostite Pustular Infecciosa (IPV/IPB). Animais infectados tornam-se portadores vitalícios do BoHV-1 e podem apresentar episódios intermitentes de excreção viral. A transmissão do BoHV-1 ocorre por meio de contato direto através de secreções nasais, oculares, genitais, sêmen e anexos fetais de animais infectados, além da transmissão indireta que ocorre principalmente pela inseminação artificial. O contato direto apresenta maior relevância epidemiológica nesta infecção. A infecção por esse vírus pode ocasionar problemas reprodutivos, como endometrite, infertilidade, absorção embrionária e abortos, além de poder determinar uma grave inflamação do pênis e do prepúcio. Touros provenientes de rebanhos distintos, cujas propriedades estão localizadas em seis das sete macrorregiões que dividem o Estado de Mato Grosso, tiveram o sêmen examinado quanto à excreção do BoHV-1. O diagnóstico conclusivo somente é possível pela identificação do BoHV-1 diretamente em amostras clínicas. Para isso um total de 99 amostras de sêmen *in natura* foram submetidas a técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR) para identificar o genoma do BoHV-1, utilizando os *primers* B1 e Bcon. Entre os touros avaliados, com idades variando de 28 meses a 120 meses e de acordo com os resultados da PCR, 21 apresentaram amostras de sêmen positivas para detecção molecular do BoHV-1, observando que a maior proporção de animais infectados estava nas propriedades da macrorregião Centro Sul e apresentavam idades entre 36 e 48 meses. Contudo os resultados dos controles positivos e negativos foram satisfatórios, validando a técnica estabelecida no presente estudo. Atualmente a técnica da PCR está sendo universalmente adotada no diagnóstico de diversas viroses, inclusive a causada pelo BoHV-1.

**Palavras-chave:** Bovinos. Diagnóstico molecular. Herpesvírus bovino tipo 1. PCR.

### **ABSTRACT**

The Bovine Herpesvirus type 1 (BoHV-1) is widespread in cattle herds. Bovine herpesvirus type 1 can be found in the semen of bulls, with or without the concomitant development of neutralizing antibodies. The BoHV-1 primarily affects the respiratory and genital tracts of cattle and can be subdivided into two clinical outcomes called Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR) and Infectious Pustular Vulvovaginitis / Balanoposthitis (IPV/IPB). Infected animals become lifelong carriers of BoHV-1 and may have intermittent episodes of viral shedding. Transmission of BoHV-1 occurs through direct contact via nasal, ocular and genital discharge, semen

and fetal membranes of infected animals, as well as indirect transmission primarily by artificial insemination. Direct contact is epidemiologically more relevant for transmission of the infection. Additionally, reproductive problems such as endometriosis, infertility, embryonic absorption and abortions, as well as severe inflammation of the penis and prepuce may occur as a result of infection. Bulls from different herds, located at six of the seven geographical regions that divide the Mato Grosso state, had the semen examined for excretion of BoHV-1. The definitive diagnosis is possible only by BoHV-1 identification directly from clinical specimens. To evaluate this, a total of 99 samples of semen *in natura* were submitted to polymerase chain reaction (PCR) technique to identify the genome of BoHV-1, using the primers B1 and Bcon. Among the evaluated bulls, their ages ranged from 28 months to 120 months and according to the PCR results, 21 showed positive semen samples for molecular detection of BoHV-1. The highest proportion of infected animals was obtained in the Macro-region South Centre and in animals aging 36-48 months. In addition, the results for the positive and negative controls in the PCR assay were satisfactory, validating the established technique in this study. Currently, PCR assays are being universally adopted in the diagnosis of several viral infections, including infections by BoHV -1.

**Keywords:** Cattle. Molecular diagnosis. Bovine herpesvirus type 1. PCR.

## INTRODUÇÃO

O Estado de Mato Grosso é considerado o maior produtor de bovinos do país, com aproximadamente 29,2 milhões de animais (INSTITUTO..., 2015). O processo de modernização, com adoção de modelos mais eficientes de gestão na produção, tem sido fundamental para o sucesso dos setores que compõem a cadeia da pecuária (MINISTÉRIO..., 2014).

Grande parte do rebanho bovino brasileiro é de origem zebuína e seus cruzamentos. Estudos de desempenho produtivo, seleção racial e características desejáveis como menor suscetibilidade a endo e ectoparasitas, adaptação ao clima tropical, precocidade sexual e fertilidade são preocupações e despertam o interesse dos setores comercial e científico brasileiros, visto o aumento da comercialização internacional do material genético bovino brasileiro (MINISTÉRIO..., 2015).

O BoHV-1 pertence à família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*, gênero *Varicellovirus* e pode ser classificado ainda em BoHV-1.1 e BoHV-1.2 (D'ARCE et al., 2002). O BoHV-1 pode ser classificado em subtipos: BoHV-1.1 (IBR "like") está relacionado aos quadros com sintomatologia respiratória e problemas reprodutivos, como infertilidade e abortamentos; o subtipo BoHV-1.2a tem sido associado a uma vasta variedade de manifestações clínicas, que incluem transtornos reprodutivos (abortamento), doenças do trato genital tais como vulvovaginite postular infecciosa e balanopostite postular infecciosa (IPV e IPB) e problemas respiratórios; por sua vez, episódios de doença respiratória leve, IPV e IPB podem ser atribuídos ao subtipo BoHV-1.2b, sendo que a ocorrência de abortamentos nunca foi associada a este genótipo (FLORES, 2007).

No Brasil, o primeiro relato da infecção por este agente viral foi feito por Alice (1978), que isolou o BoHV-1 de casos de vulvovaginite ocorridos no Estado da Bahia. No mesmo ano, Mueller et al. (1978 apud DEL FAVA, 2002), isolaram e identificaram o BoHV-1 de rim de feto bovino colhido em matadouro do Estado de São Paulo. Galvão, Dori e Alice (1963 apud MELO, 2012), após a realização de vários estudos conduzidos na Bahia, comprovaram que a infecção por BoHV-1 estava disseminada no país.

Por meio de técnicas de cultivo de células, pelo perfil de reatividade com alguns anticorpos monoclonais (AcMs) e por PCR (D'ARCE et al., 2002; METZLER; SCHUEL; ENGEL, 1986; ROEHE et al., 1997), isolados respiratórios de herpesvírus têm sido classificados como BoHV-1.1 e isolados de doença genital como BoHV-1.2

(METZLER et al., 1986; D'ARCE et al., 2002). Os isolados de doença neurológica, anteriormente classificados como BoHV-1.3, por suas diferenças moleculares e antigênicas, foram posteriormente reclassificados como BoHV-5 (ROIZMAN et al., 1992).

A espécie bovina é a principal fonte de infecção para o BoHV-1. As principais vias de eliminação do vírus são: secreções respiratórias, oculares e genitais (muco prepucial, muco vaginal) e o sêmen de animais infectados. A via de transmissão direta horizontal é a mais importante e ocorre através do contato direto entre os animais e também pela cópula, porém embrião e feto podem infectar-se pela via vertical (transplacentária). A transmissão indireta ocorre principalmente pela inseminação artificial, a qual apresenta importância significativa na entrada da doença em rebanhos que nunca tiveram contato com o vírus (LEMAIRE; PASTORET; THIRY, 1994).

Devido a suas características, a PCR se tornou opção validada para estudos epidemiológicos e para caracterização de microrganismos causadores de doenças que afetam a esfera reprodutiva de bovinos. Esta técnica molecular tem sido empregada para detecção da presença dos mesmos no sêmen de bovinos no Brasil, segue relatos como, *Brucella abortus* (LOURENCETTI, 2014), *Mycoplasma bovis* e *Ureaplasma diversum* (CARDOSO et al., 2006), BoHV1 e BoHV5 (SOUZA et al., 2013), *Tritrichomonas foetus* e *Campylobacter fetus* spp *venerealis* (BOTELHO, 2014), e *Leptospira* spp (MAGAJEVSKI; GÍRIO, 2008).

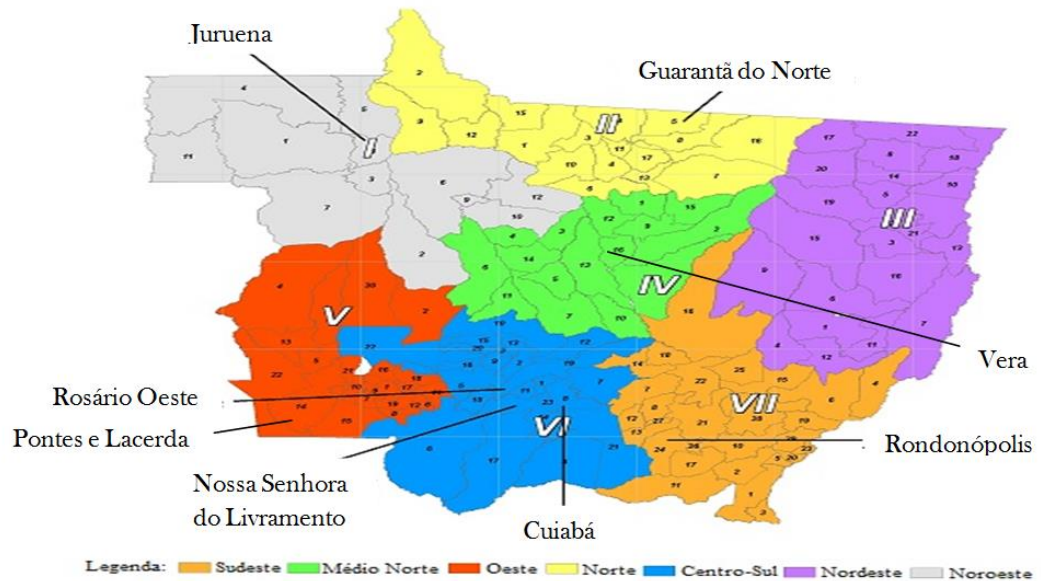
Considerando a importância que a enfermidade possui dentro dos rebanhos bovinos, principalmente aqueles voltados à exploração de corte, juntamente aos poucos dados epidemiológicos da ocorrência de BoHV-1 nos rebanhos aliado a prática deficiente e/ou inexistente de sanidade nas propriedades e a ausência de programas de assistência técnica especializada, este trabalho teve por objetivo avaliar a excreção do BoHV-1 em sêmen de touros de algumas propriedades do Estado de Mato Grosso por meio da técnica molecular de detecção PCR.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **AMOSTRAS**

Neste estudo, 99 touros provenientes de rebanhos distintos, cujas propriedades estão localizadas em seis das sete macrorregiões que dividem o Estado, tiveram o sêmen examinado quanto à excreção do BoHV-1 (Figura 1).

Figura 3 - Municípios e localização dos rebanhos destinados a avaliação da presença do BoHV-1, de acordo com as divisões das 7 macrorregiões de Mato Grosso



Os rebanhos avaliados eram provenientes de oito diferentes propriedades, cuja principal atividade consiste na criação de gado de corte e leite, localizadas nos municípios de Juruena, Guarantã do Norte, Vera, Pontes e Lacerda, Cuiabá, Rosário Oeste e Nossa Senhora do Livramento e Rondonópolis, pertencentes respectivamente às macrorregiões Noroeste, Norte, Médio Norte, Oeste, Centro Sul e Sudeste 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 variou de 5 a 15 animais por propriedade.

Sendo 10 animais 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 variando de 28 a 39 meses, 8 animais do município de Rondonópolis com idade variando de 28 a 48 meses, 11 animais do município de Cuiabá com idade de 30 meses, 5 animais do município de Guarantã do Norte com 120 meses de idade, 15 animais do município de Juruena com idade variando de 30 a 33 meses, 15 animais do Município de Pontes e Lacerda com idade média de 28 meses e 20 animais do município de Vera com idade média de 28 meses. Todos os touros eram oriundos de rebanhos não vacinados contra o BoHV-1, com idade superior a 24 meses.

Para a avaliação molecular da presença do BoHV-1 foram coletadas alíquotas de sêmen *in natura*, por meio do emprego de eletroejaculador, seguindo protocolos de segurança e bem-estar animal. Posteriormente à coleta e identificação das amostras, foram preenchidos formulários com informações relevantes de cada animal. Por fim, 1mL do sêmen *in natura* dos touros foram armazenadas imediatamente a -20° C, até a extração de DNA.

#### EXTRAÇÃO DE DNA

O DNA viral foi purificado a partir de alíquotas de 250µL de sêmen com o kit QIAamp DNA mini kit da Qiagen, conforme recomendações do fabricante. Os ácidos nucleicos extraídos foram mantidos a -20°C até a sua utilização na PCR.

Alíquotas de água ultrapura estéril e células MDBK infectadas com cepa viral padrão foram utilizadas como controles negativo e positivo, respectivamente, nos procedimentos de extração de DNA.

#### REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR)

A reação de PCR foi realizada de acordo com Claus et al. (2005). A reação foi realizada com 5µl do DNA extraído a partir de alíquotas de sêmen e 45µl do PCR-mix, o qual continha 20 pmol de cada um dos primers B1 (5'CAA CCG AGA CGG AAA GCT CC3' nt 185-204); e Bcon [5'AGT GCA CGT ACA GCG GCT CG 3' nt 519-538 (BoHV-1)]; 1,6 mM de cada dNTP (Invitrogen™ Life Technologies, USA); 2,5 unidades de *Taq* DNA polimerase Platinum (Invitrogen™ Life Technologies, USA); 1x PCR buffer (20 mM Tris-HCl pH 8,4 e 50 mM KCl); 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 8% dimetilsulfoxido (DMSO, Sigma Co., USA) e água estéril ultrapura para completar o volume de 50µl. A amplificação foi realizada com as seguintes condições de tempo e temperatura: desnaturação inicial de 3 min a 94°C seguida por 40 ciclos de 1 min/94°C; 1 min/58°C, 1 min/72°C e uma extensão final de 7 min/72°C. Os produtos amplificados, com cerca de 354 pb, foram avaliados por eletroforese em gel de agarose a 2%, em tampão TBE pH 8,4 (89 mM Tris; 89 mM ácido bórico; 2 mM EDTA) sob voltagem constante (90V) por aproximadamente 45 min, corados com brometo de etídeo (0,5 µg/ml), e visualizados sob luz UV.

#### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Entre os 99 touros avaliados neste estudo, 21 (21,2%) apresentaram amostra

de sêmen positiva para a detecção molecular do genoma do BoHV-1, demonstrando que os mesmos estavam infectados com este patógeno e excretando o agente viral pelo sêmen no momento da coleta. Como não havia nenhuma informação prévia sobre o *status* dos animais quanto a infecção pelo BoHV-1, como uso de boletins epidemiológicos, históricos sorológicos, assim como outras informações relevantes sobre o histórico de saúde do rebanho, não foi possível concluir, nesta investigação, se a excreção viral observada foi consequência de uma infecção aguda ou re-excreção viral após estabelecimento de infecção latente pelo BoHV-1.

Animais infectados pelo BoHV-1 foram observados em cinco dos oito municípios onde os animais foram avaliados, distribuídas entre as sete macrorregiões geográficas, com exceção das regiões Nordeste onde nenhum rebanho foi investigado nesta pesquisa. O número de touros analisados nas macrorregiões do Estado de Mato Grosso variou entre 8 a 36 touros. Entre as macrorregiões que compõem o Estado de Mato Grosso, obtiveram maior frequência de touros classificados com positivos, por estar excretando o BoHV-1 pelo sêmen, os animais provenientes do Centro Sul, seguidos pelos touros do Noroeste, respectivamente.

Entre as sete macrorregiões onde rebanhos foram avaliados nesta pesquisa, três apresentaram animais eliminando o BoHV-1 no sêmen, com frequências de animais classificados como positivos variando de 25% a 41,67%. A proporção de animais infectados mostrou-se mais elevada na macrorregião Centro Sul, onde 15 entre os 36 avaliados (41,67%; 15/36) estavam eliminando o genoma viral através do sêmen. Fazendo uma comparação entre os animais avaliados no estudo, a proporção observada de touros infectados por BoHV-1 foi menor, (26,67% e 25%) nas macrorregiões Nordeste e Sudeste, respectivamente (tabela 1).

Tabela 1 - Distribuição das frequências de touros infectados por Herpesvírus Bovino Tipo 1 (BoHV-1) por Macrorregião do Estado de Mato Grosso.

<b>Macrorregiões</b>	<b>Touros avaliados</b>	<b>Percentual animais avaliados (%)</b>	<b>Touros positivos</b>	<b>Frequência de infectados (%)</b>
Noroeste	15	15,15 %	4	26,67%
Médio Norte	20	20,2 %	0	0%
Norte	5	5,05 %	0	0%
Oeste	15	15,15 %	0	0%
Centro Sul	36	36,37 %	15	41,67%
Sudeste	8	8,08 %	2	25%
<b>Total</b>	<b>99</b>	<b>100%</b>	<b>21</b>	<b>-----</b>

Para validar as reações de PCR empregadas neste estudo, as análises das alíquotas de sêmen foram acompanhadas da avaliação concomitante de um controle positivo, representado por suspensão de células MDBK infectadas com vírus padrão, assim como de um controle negativo. Os resultados da técnica de PCR para os controles positivos e negativos foram satisfatórios, fato que validou os procedimentos empregados no diagnóstico molecular realizado no presente estudo.

Os achados deste estudo demonstram que a eliminação do vírus por meio do sêmen pode constituir importante via de transmissão da infecção nos rebanhos, destacando a necessidade de se conhecer o *status* dos touros quanto a infecção pelo BoHV-1 antes que estes animais sejam utilizados para a reprodução, tanto por monta natural como para a coleta de sêmen para a inseminação artificial. Vale ressaltar que os percentuais de animais positivos observados nesse estudo representam os indivíduos que estavam eliminando o vírus pelo sêmen no momento da coleta, tanto após a ocorrência de uma infecção aguda como pela reexcreção viral após um estado de latência viral. Portanto, a ferramenta diagnóstica utilizada nesta investigação avaliou os animais pontualmente, não sendo possível verificar se entre os animais que não estavam eliminando o vírus pelo sêmen estavam presentes indivíduos latentemente infectados.

A prevalência de animais infectados pelo BoHV-1 nos rebanhos estudados, no período avaliado, demonstrou que o vírus está distribuído nas diversas macrorregiões do Estado de Mato Grosso. Sabe-se que a introdução de animais em propriedades livres deve ser precedida da realização de testes sorológicos. Rebanhos livres devem evitar contato direto e indireto com bovinos originados de rebanhos que possuem histórico sanitário desconhecido, a fim de reduzir de forma considerável o risco de introdução do vírus.

Os touros avaliados nessa pesquisa apresentavam entre 28 meses a 120 meses de idade, conforme relatado anteriormente. Entre os touros estudados, foram observadas as excreções virais em maior proporção nos animais com idades entre 36 a 48 meses. A frequência de touros positivos para BoHV-1 com idades inferiores a 36 meses foi de 20,29% (14/69). Enquanto que a mesma em touros com idade entre 36 a 48 meses foi de 37,5% (6/16). Entre os touros avaliados apresentando idade superior a 48 meses foi observada a ocorrência de excreção viral pelo sêmen em 12,5% (1/8) (tabela 2).



Tabela 2 - Distribuição por faixa etária das frequências de touros positivos para Herpesvírus Bovino Tipo 1 (BoHV-1) em bovinos das seis Macrorregiões do Estado de Mato Grosso.

<b>Faixa etária</b>	<b>Touros avaliados</b>	<b>Percentual animais avaliados (%)</b>	<b>Touros Positivos</b>	<b>Frequência de infectados (%)</b>
≤ 36 meses	69	69,70%	14	20,29%
≥36 meses e ≤ 48 meses	16	16,16 %	6	37,5%
≥48 meses	8	8,08 %	1	12,5%
Não informado	6	6,06%	0	0%
<b>Total</b>	<b>99</b>	<b>100%</b>	<b>21</b>	<b>-----</b>

Mesmo diante do destaque do Estado no cenário nacional e da gravidade da infecção causada pelo BoHV-1 na esfera reprodutiva, nota-se a ausência de pesquisas que visem a identificação do vírus no sêmen, associado diretamente a infecção venérea, caracterizados por sua vez como, sendo o principal mecanismo de permanência da infecção nos rebanhos.

Esta aparente negligência pode vir a se tornar entrave em futuras transações dos derivados da bovinocultura do país. O que traria consequências graves ao país que possui grande destaque no ranking mundial de exportação de carne e ainda é o terceiro maior produtor de leite, evidenciando assim, a importância do setor para a economia do País (ASSOCIAÇÃO..., 2014a,b).

A identificação do BoHV-1 é de fundamental importância para o conhecimento de sua patogenia e epidemiologia. Novas avaliações, mais abrangentes, precisam ser realizadas para determinar a prevalência do BoHV-1 em rebanhos e animais de diferentes aptidões nas diversas regiões do Estado, pois a prevalência estabelecida nos estados vizinhos apresentou níveis muito elevados, evidenciando riscos de possível infecção.

Os dados obtidos neste trabalho demonstram claramente a importância da inclusão das infecções por BoHV-1 no diagnóstico diferencial de várias patologias bovinas, particularmente nos distúrbios reprodutivos com características infecciosas.

## **CONCLUSÃO**

A avaliação da excreção do BoHV-1 pelo sêmen de touros pertencentes a rebanhos das diferentes macrorregiões do Estado de Mato Grosso demonstrou que cerca de 21,2% dos animais avaliados estavam infectados pelo vírus e excretando o mesmo pelo sêmen no momento da coleta pontual de alíquota seminal.

Dentre os rebanhos avaliados, foi observada maior proporção de animais infectados nas propriedades localizadas na macrorregião Centro Sul, onde 15 entre as 36 amostras (41,67%) tiveram o fragmento gênico viral amplificado por meio da técnica de PCR.

Como os touros avaliados nessa pesquisa apresentavam idade entre 28 meses a dez anos de idade, pode ser verificado que entre os touros estudados, foi observada a ocorrência de excreção viral pelo sêmen em maior proporção nos animais com idade entre 36 a 48 meses.

Novas avaliações, mais abrangentes, precisam ser realizadas para determinar a prevalência do BoHV-1 em rebanhos e animais de diferentes aptidões nas diversas regiões do estado, pois a prevalência estabelecida nos estados vizinhos por sorologia apresentou níveis muito elevados, evidenciando riscos de possível infecção.

## REFERÊNCIAS

- ALICE, F. J. Isolamento do Vírus da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR) no Brasil. **Rev. Bras. Biol.**, v. 38, n. 4, p. 919-20, 1978.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNE (ABIEC). **Estatísticas**. Disponível em: <<http://www.abiec.com.br/estatisticas.asp>>. Acesso em: 25 nov. 2014a.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES DE LEITE (ABPL). **Release**. Disponível em: <<http://www.leitebrasil.org.br/release.htm>>. Acesso em 20 nov. 2014b.
- BOTELHO, M. P. A. **Deteção de *Tritrichomonas foetus* e *Campylobacter fetus* sp. *venerealis* em touros por meio da PCR e PCR multiplex**. 2014. 71 f. Monografia (Especialização em Ciências Veterinárias) - Curso de Pós-Graduação "Stricto Sensu", Universidade Federal de Lavras, Belo Horizonte, 2014.
- CLAUS, M. P.; ALFIERI, A. F.; FOLGUERAS-FLATSCHART, A. V.; WOSIACKI, S. R.; MEDICI, K. C.; ALFIERI, A. A. Rapid Detection and Differentiation of Bovine Herpesvirus 1 and 5 Glycoprotein C Gene in Clinical Specimens by Multiplex-PCR. **J. Virol.**, v. 128, p. 183-8, 2005.
- D'ARCE, R. C. F.; ALMEIDA, R. S.; SILVA, T. C.; FRANCO, A. C.; SPILKI, F.; ROEHE, P. M.; ARNS, C. W. Restriction Endonuclease and Monoclonal Antibody Analysis of Brazilian Isolates of Bovine Herpesviruses Types 1 and 5. **Vet. Microbiol.**, v. 88, p. 315-24, 2002.
- FLORES, E. F. **Virologia Veterinária**. 1. ed. Santa Maria, RS: UFSM, 2007. p. 435-62.

GALVÃO, C. L.; DORIA, J. D.; ALICE, F. J. Anticorpos Neutralizantes para o Vírus Rinotraqueíte infecciosa dos Bovinos, em Bovinos do Brasil. **Bol. Inst. Biol. Bahia**, v. 6, p. 15-25, 1962/1963.

LEMAIRE, M.; PASTORET, P. P.; THIRY, E. Le controle de infection pasle virus de la rhinotracheite infectieuse bovine. **Annales de Méd. Vet.**, v. 138, p. 167-80, 1994.

LOURENCETTI, M. P. S. **Detecção molecular de DNA de *Brucella abortus* em sêmen bovino *in natura***. 2014. 66 f. Monografia (Especialização em Ciências Veterinárias) - Curso de Pós-Graduação "Stricto Sensu", Universidade Federal de Uberlândia, Belo Horizonte, 2014.

MAGAJEVSKI, F. S.; GÍRIO, R. J. S. Avaliação da sensibilidade da PCR frente a quatro técnicas para extração de dna de leptospira interrogans sorovar pomona em sêmen bovino experimentalmente contaminado. **Ars Veterinaria**, v. 24, n. 1, p. 29-33, 2009.

METZLER, A. E.; SCHUDEL, A. A.; ENGELS, M. Bovine herpesvirus 1: molecular and antigenic characteristics of variant viruses isolated from calves with neurological disease. **Arch. Virol.**, v. 87, p. 205-17, 1986.

MUELLER, S. B. K. et al. Isolamento e identificação do vírus da rinotraqueíte infecciosa dos bovinos de um rim de feto de bovino (IBR/IPV). **Arq. Inst. Biol.**, v. 45, n. 3, p. 187-90, 1978.

OLIVEIRA, R. A. M.; LORENZETTI, E.; ALFIERI, A. A.; LISBOA, J. A. N. Prevalência das infecções latentes por BoHV-1 e BoHV-5 em bovinos de corte no Estado do Paraná. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. Belo Horizonte**, v. 67, n. 5, Out. 2015.

ROEHE, P. M.; SILVA, T. C.; NARDI, N. B.; OLIVEIRA, L. G.; ROSA, J. C. A. Diferenciação entre os vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (BHV-1) e vírus da encefalite bovina (BHV-5) com anticorpos monoclonais. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 17, n. 1, p. 41-4, 1997.

ROIZMAN, B.; DESROSIERS, R. C.; FLECKENSTEIN, B.; LOPEZ, C.; MINSON, A. C.; STUDDERT, M. J. The family herpesviridae: an update. The herpesvirus study group of the international committee on taxonomy of viruses. **Arch. Virol.**, v. 123, p. 425-49, 1992.

## APÊNDICE

**APÊNDICE 1- FORMULÁRIO EPIDEMIOLÓGICO****DIAGNÓSTICO MOLECULAR DO HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 1 (BoHV-1) 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: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_