

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

**Estabelecimento de uma Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real para
Detecção de Animais Persistentemente Infectados pelo Vírus da Diarréia Viral
Bovina**

Dissertação de Mestrado

ÂNGELA OLIVEIRA CORBELLINI

Porto Alegre

2011

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

**Estabelecimento de uma Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real para
Detecção de Animais Persistentemente Infectados pelo Vírus da Diarréia Viral
Bovina**

Ângela Oliveira Corbellini

**Dissertação apresentada como requisito parcial
para obtenção do grau de Mestre em Ciências
Veterinárias na área de Virologia Veterinária.
Orientador: Prof. Dr. Cláudio Wageck Canal
Co-orientador: Prof. Dr. Sérgio Ceroni da Silva**

Porto Alegre

2011

C789e Corbellini, Ângela Oliveira

Estabelecimento de uma reação em cadeia da polimerase em tempo real para detecção de animais persistentemente infectados pelo vírus da diarreia viral bovina / Ângela Oliveira Corbellini. - Porto Alegre: UFRGS, 2011.

84f.; il. – Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2011. Cláudio Wageck Canal,

Ângela Oliveira Corbellini

**Estabelecimento de uma Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real para
Detecção de Animais Persistentemente Infectados pelo Vírus da Diarréia Viral
Bovina**

Aprovada em 23 de FEV 2011.

APROVADA POR:

Prof. Dr. Cláudio Wageck Canal
Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dra. Ana Cláudia Franco
Membro da Comissão

Prof.Dr. Vagner Ricardo Lunge
Membro da Comissão

Prof. Dr. Fernando Rosado Spilki
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro e por acreditar em nosso projeto.

Ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Veterinária da UFRGS, pelo acolhimento e oportunidade de realização deste trabalho.

Ao professor orientador Dr. Cláudio Wageck Canal por me orientar e por ter depositado em mim total confiança na execução deste trabalho.

Ao professor Sérgio Ceroni da Silva pelas orientações e disponibilidade.

À equipe do Laboratório de Patologia Veterinária da UFRGS, em especial ao professor Dr. David Driemeier, que permitiu e viabilizou a execução das imunohistoquímicas deste e de futuros estudos e as alunas Ana Paula e Fabiana pela paciência na realização dos testes e coleta das amostras.

Ao Prof. Bangel pela amizade, compreensão e por tornar agradável a minha passagem pela universidade.

Ao médico veterinário Mário por ter identificado as propriedades problemas e possibilitado a coleta das amostras utilizadas neste estudo.

Aos meus colegas de laboratório, Carine, Luciane, Matheus, Renata, Nelson, Catarina, Hiran, Eliana, Helena e Andrea pela colaboração na execução do meu projeto de pesquisa e com os quais tive o privilégio de poder compartilhar da amizade.

A minha amiga Daniele que sempre estive do meu lado.

A minha família por sempre incentivar os meus estudos.

Ao meu marido pela compreensão, apoio e carinho concedidos nestes dois anos de mestrado.

Enfim, a todos meus amigos que de alguma forma colaboraram com este trabalho, o meu sincero agradecimento.

Muito obrigada!

RESUMO

O Brasil é um grande produtor de alimentos e a bovinocultura tem grande importância econômica e social. Doenças virais podem ter grande impacto na pecuária e, por isso, a identificação do agente, o conhecimento de sua epidemiologia e o desenvolvimento de técnicas eficientes para seu diagnóstico são medidas extremamente importantes no seu controle. A diarreia viral bovina (“*bovine viral diarrhea*”- BVD) é uma enfermidade difundida nos rebanhos bovinos ocasionando grandes perdas econômicas em rebanhos de corte e leite em todo mundo. A identificação de animais persistentemente infectados (PI) pelo vírus da BVD (BVDV) é essencial em um programa de controle desta doença. No presente estudo, foi estabelecida uma transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase quantitativa (RT-qPCR) específica para identificação e quantificação dos diversos genótipos de pestivírus. Foi utilizado o teste de imunoperoxidase (IPX) como referência, além de outros testes de diagnóstico, como transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), isolamento viral (IV), ELISA de captura de antígeno (ECA) e imunohistoquímica (IHQ). Os valores usados como base para quantificação foram pré-determinados pelo resultado da IPX de uma amostra padrão. A sensibilidade da RT-qPCR foi de $10^{3,9}$ TCID₅₀/mL, apresentando valor de coeficiente de correlação de 0,978 que permite identificar 95% das infecções com até 450,66 partículas virais/mL de soro. O coeficiente de variação da reprodutibilidade variou de 4 a 9%. Foram analisadas 72 amostras de soro sanguíneo de animais suspeitos de apresentarem infecção persistente pelo BVDV. Os títulos obtidos através da IPX a partir de soro de animais PI variaram de $10^{5,55}$ a $10^{7,3}$ TCID₅₀/mL, enquanto que os títulos das amostras testadas pela RT-qPCR variaram de $10^{6,2}$ a $10^{7,6}$ TCID₅₀/mL. Os diferentes métodos laboratoriais utilizados para detectar o BVDV em rebanhos apresentaram a mesma eficiência entretanto, a utilização comparativa destes métodos aliada a uma nova estratégia permitiu que se estabelecesse uma RT-qPCR específica para detecção e quantificação do BVDV em amostras de soro de animais PI que poderá ser utilizada como uma importante ferramenta para o diagnóstico de pestivírus com diferentes características genéticas. Além disso, o presente trabalho poderá servir como base para a quantificação do agente em diferentes órgãos dos animais PI, o que contribuirá para o entendimento da patogenia do BVDV.

Palavras chaves: bovino, vírus da diarreia viral bovina, diagnóstico, PCR em tempo real, detecção.

ABSTRACT

Brazil is an important food producer and cattle production has great economical and social importance. Viral diseases are constant problems and the identification of the agent, the knowledge of the disease's epidemiology and the development of efficient diagnostic techniques are extremely important for its control. Bovine viral diarrhea (BVD) is a widespread disease causing great economical losses around the world. The identification of persistently infected animals (PI) in bovine herds is essential to the implementation of control programs. In the present study, a reverse transcription followed by quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was established to the identification and quantification of pestivirus. Immunoperoxidase (IPX) was used as the reference test, in addition with reverse transcription followed by the polymerase chain reaction (RT-PCR), virus isolation (VI), antigen-capture ELISA (ACE) and Immunohistochemistry (IHC). The values used as standard to quantification were predetermined by the result from the IPX using a reference strain. The sensitivity of RT-qPCR was $10^{3.9}$ TCID₅₀/mL, showing 0.978 of coefficient correlation, what allowed to detect 95% of infections with up to 450.66 viral particles/mL. The reproducibility of the coefficient of varied from 4 to 9%. Seventy-two samples of blood serum from animals suspected of presenting persistent infection of BVDV were analyzed. The titers obtained through the IPX from the serum of PI animals varied from $10^{5.55}$ to $10^{7.3}$ TCID₅₀/mL, while the titers from the tested samples by the RT-qPCR varied from $10^{6.2}$ to $10^{7.6}$ TCID₅₀/mL. The different laboratory methods tested were capable of detecting the BVDV with equal efficiency, The comparative utilization of these methods allied with a new strategy allowed the establishment of a specific RT-qPCR protocol to quantify and detect the BDVD in PI sera which can be used as an important tool to the detection and quantification of the pestivirus different genetic backgrounds. Beyond this, the present protocol can be used to quantify the virus in different organs of PI animals and will contribute for the understanding of BVDV pathogenicity.

Keywords: cattle, bovine viral diarrhea virus, diagnosis, real-time PCR, detection.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Esquema representativo da estrutura do genoma do BVDV.....	16
FIGURA 2 - Representação do período de gestação (de zero a 280 dias) e as conseqüências que o BVDV pode causar em casos de infecção de fêmeas bovinas prenhes.....	24
FIGURA 3 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação obtidos pela RT-PCR para BVDV.....	43
FIGURA 4 - Fotomicrografia dos cultivos celulares inoculados com BVDV e corados pela técnica da imunoperoxidase.....	44
FIGURA 5 - Fotomicrografia de corte histológico após realização da técnica de imunohistoquímica.....	44
FIGURA 6 - Curva de amplificação de diluições da amostra NADL.....	45
FIGURA 7 - Curva padrão da amplificação da amostra NADL e das amostras positivas para BVDV.....	46
FIGURA 8 - Gráfico representativo da amplificação das amostras positivas para BVDV na RT-qPCR utilizando o sistema SYBR Green.....	47
FIGURA 9 - Gráfico representativo da curva de desnaturação das amostras positivas para BVDV.....	47

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - *Primers* utilizados na RT-PCR e na RT-qPCR para identificação de animais persistentemente infectados..... 42

TABELA2 - Confirmação dos animais PI por RT-PCR e IV e comparação dos títulos da RT-qPCR e da IPX 43

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

%	Por Cento
®	Marca Registrada
µl	Micro litro
ABIEC	Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne.
ABPL	Associação Brasileira dos Produtores de Leite.
BDV	Border Disease Virus
bp	Base Pair
BoHV-1	Bovine Herpesvirus type-1
BT	Bovine Turbinate
Btest	Bovine Testicle
BVD	Bovine Viral Diarrhoea
BVDV	Bovine Viral Diarrhoea Virus
CAE	Capture Antigen ELISA
CSFV	Classical Swine Fever Virus
Ct	Cycle Threshold
DM	Doença das Mucosas
ECA	ELISA de Captura de Antígeno
EDTA	Ethylenediamine Tetraacetic Acid
Eff	Eficiência
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
g	Gravidade
h	Horas
IFA	Imunofluorescência
IHQ	Imunohistoquímica
IPX	Imunoperoxidase
IV	Isolamento Viral
Kb	Kilobase
MDBK	Madin-Darby Bovine Kidney Cells
mL	Militro
nm	Nanômetro
°C	Grau Celsius
ORF	Open Reading Frame

pb	Pares de Base
PBS	Solução Tampão de Fosfato
PCR	Polymerase Chain Reaction
PI	Persistentemente infectado
PI3V	Parainfluenza 3 virus
pmol	Picomol
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction
R ²	Coeficiente de Correlação
RNA	Ribonucleic Acid
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
RT-qPCR	Reverse Transcriptase Quantitative Polymerase Chain Reaction
S/P	Relação Positiva
SN	Soroneutralização
SNC	Sistema Nervoso Central
ssp	Espécie
TCID ₅₀	Median Tissue Culture Infective Dose
Tm	Temperature Melting
TSV	Tunisian Sheep Vírus
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UFSM	Universidade Federal de Santa Maria
USA	United States of America
UTR	Unstranlated Region

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 Agente Etiológico	16
2.1.1 Morfologia e Estrutura do BVDV.....	16
2.1.2 Biótipos.....	18
2.2 Epidemiologia.....	19
2.2.1 Infecção Transitória ou Aguda	19
2.2.2 Infecção Persistente.....	19
2.2.3 Doença das Mucosas	20
2.2.4 Prevalência do BVDV	20
2.2.5 Transmissão	22
2.3 Patogenia	23
2.4 Diagnóstico.....	25
2.4.1 Isolamento Viral (IV).....	26
2.4.2 Imunoperoxidase (IPX)	27
2.4.3 Imunofluorescência (IFA)	27
2.4.4 Imunohistoquímica (IHQ)	27
2.4.5 ELISA Indireto.....	28
2.4.6 ELISA de Captura de Antígeno (ECA).....	28
2.4.7 Técnicas de Biologia Molecular	29
2.4.8 Diagnóstico Diferencial.....	29
2.5 Vacinação	30
2.6 Controle.....	32
3. ARTIGO CIENTÍFICO.....	34
4. DISCUSSÃO GERAL.....	58
REFERÊNCIAS	61
ANEXO.....	75

1. INTRODUÇÃO

O Brasil tem a bovinocultura como uma de suas atividades de maior importância econômica e social. Apresenta-se hoje como o maior exportador de carne bovina e o quinto maior produtor de leite (ABIEC, 2009; ABPL, 2010). Dessa forma, visando manter e aprimorar cada vez mais esse nível de produção é importante estabelecer um programa de controle sanitário, que permita a manutenção da competitividade no mercado internacional. Considerando que as doenças virais são preocupação constante, deve-se dar atenção ao desenvolvimento de técnicas de diagnóstico que possibilitem a identificação do agente e facilitem o conhecimento da epidemiologia da doença (RADOSTTIS, 2007; FLORES, 2007).

A diarreia viral bovina (“*Bovine Viral Diarrhea*”- BVD) é uma enfermidade que vem se difundindo em muitos rebanhos, ocasionando grandes perdas econômicas em animais de corte e leite em todo mundo (VOGEL et al., 2001; LINDBERG, 2003; DIAS & SAMARA, 2003; NORONHA et al., 2003; GROOMS, 2006), tornando fundamental a realização de programas de controle da doença (HOUE, 1999).

O vírus da diarreia viral bovina (BVDV), responsável por causar a BVD, é membro do gênero *Pestivirus*, pertencente à família *Flaviviridae*, juntamente com o vírus da peste suína clássica (CSFV) e o vírus da doença da fronteira (BDV) (POTGIETER, 2004; RIDPATH, 2005; RIDPATH; FLORES, 2007). A infecção causada pelo BVDV apresenta-se geralmente na forma subclínica, mas pode ocorrer na forma clínica. Quando presente, a sintomatologia é bastante variável, como, por exemplo, desordens reprodutivas, respiratórias ou digestivas, doença aguda/hemorrágica e doença das mucosas (VOGEL et al., 2001; DIAS & SAMARA, 2003).

A alta diversidade genética desse agente e a capacidade de atravessar a barreira placentária permitem que ele estabeleça infecção continuada nos rebanhos, devido à presença e manutenção de animais persistentemente infectados (PI), que eliminam grande número de partículas virais através de secreções e excreções (POTGIETER, 2004; THURMOND, 2005).

Através da análise da região 5'UTR (não-traduzida) do genoma do BVDV, a qual apresenta alta conservação de nucleotídeos, o BVDV pode ser classificado em dois genótipos: BVDV-1 e BVDV-2 (RIDPATH et al., 1994). Atualmente, Liu et al. (2009)

sugerem que seja feita uma nova classificação, considerando a existência de um outro genótipo denominado BVDV-3.

Além disso, o BVDV é classificado em dois biótipos: citopático e não-citopático, que se diferenciam, respectivamente, pela capacidade de causarem, ou não, efeito nas células infectadas ao se replicarem. Enquanto o biótipo citopático é encontrado apenas em bovinos com doenças das mucosas, o não-citopático é o responsável pela circulação permanente do BVDV nos rebanhos, devido a sua capacidade de estabelecer infecção persistente, gerando animais persistentemente infectados (PI) (BROWNLIE, 1990; BOOTH et al., 1995; MEYERS & THIEL, 1996; FRAY et al., 2000; VOGEL et al., 2001; LINDENBACH & RICE, 2001).

A transmissão do BVDV ocorre principalmente por contato direto entre os animais (HOUE, 1995), mas o vírus também pode ser transmitido por sêmen, embriões, vacinas, fômites contaminados, saliva, secreções nasais e oculares e fezes (KIRKLAND et al., 1991; PLAGEMANN, 1992; MOENNIG & HOUE et al., 1993; VOGEL et al., 2001; GARD et al., 2007; STHAL et al., 2007).

Visando o controle e a erradicação do BVDV preconiza-se identificar, remover e prevenir a geração de novos animais PI como medidas de biossegurança (LINDBERG e ALENIUS, 1999; HOUE et al., 1999). Países que se destacam como produtores de bovinos na Europa e América do Norte já estão utilizando programas oficiais ou não-oficiais de prevenção e controle do BVDV (HEFFERNAN et al., 2009; PRESI; HEIM, 2010; ROSSMANITH, 2010; VAN CAMPEN, 2010), no entanto, o Brasil ainda não possui nenhum programa oficial de controle do vírus (FLORES et al., 2005). A utilização de medidas baseadas no histórico epidemiológico do rebanho, sinais clínicos, achados pós-morte, tipo de infecção (aguda ou persistente) e o manejo vacinal (GOYAL, 2005, GOENS, 2002; RADOSTITS et al., 2007) são ferramentas eficientes que podem ser usadas para eliminação do BVDV nos rebanhos.

Segundo Houe et al. (2006), técnicas laboratoriais (diretas e indiretas) utilizadas em conjunto permitem aprimorar o diagnóstico, tanto do rebanho como do animal, já que possibilitam a detecção de anticorpos, antígenos ou do genoma viral.

Estudos realizados no Brasil demonstraram grande diversidade nos isolados de BVDV e estimaram que a prevalência em determinados rebanhos para BVDV pode variar de 56 a 66% (OLIVEIRA, 1996; BOTTON et al., 1998) e pode atingir até 90% a

nível de rebanho (CANAL et al., 1996; POLETTO et al., 2004; THOMPSON et al., 2006; QUINCOZES et al., 2007). Por esta razão mostra-se necessário estabelecer uma ferramenta que possibilite um diagnóstico preciso do BVDV nos rebanhos comerciais do Brasil.

Portanto, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de estabelecer uma RT-qPCR capaz de identificar e quantificar amostras de animais PI coletadas em rebanhos comerciais e avaliar diferentes técnicas utilizadas para o diagnóstico do BVDV como testes confirmatórios e de referência.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Agente Etiológico

A diarreia viral bovina (“*bovine viral diarrhea*”- BVD) é a responsável por importantes perdas de produção de carne e leite, sendo considerada uma das principais doenças virais de bovinos (BAKER, 1995; HOUE, 1999; LINDBERG, 2003).

O agente etiológico responsável por causar a BVD é um membro do gênero *Pestivirus*, pertencente à família *Flaviviridae*, da qual também fazem parte os vírus da peste suína clássica (CSFV) e da doença da fronteira (BDV) (FRANCKI et al., 1991; FLORES et al., 2007).

A sua caracterização através da utilização de anticorpos monoclonais e análise do seu genoma comprovaram que os pestivírus não são espécie-específicos. Desta forma, o vírus da diarreia viral bovina (BVDV) e o BDV que infectam principalmente bovinos e ovinos, respectivamente, podem ocasionalmente infectar suínos, javalis e outros ruminantes domésticos e selvagens da ordem *Artiodactyla* (EVERMANN, 2005; VILCEK & NETTLETON, 2006).

2.1.1 Morfologia e Estrutura do BVDV

O BVDV teve a sua primeira descrição em 1946 por pesquisadores da *New York State Veterinary College* (BAKER, 1995). O genoma do BVDV é um RNA de fita simples, de polaridade positiva, com aproximadamente 12,3 kb, contém uma única fase de leitura aberta (ORF - *open reading frame*), que é traduzida em uma poliproteína única com cerca de 4.000 aminoácidos (LINDENBACH & RICE, 2001). Esta poliproteína, por sua vez, é clivada por proteases celulares e virais originando entre 10 a 12 polipeptídeos estruturais e não-estruturais (DONIS, 1995). Dentre as proteínas estruturais estão a N terminal (N^{Pro}), a proteína do capsídeo (C) e as glicoproteínas do envelope (E^{RNS}, E1 e E2), já as proteínas não-estruturais são: P7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B (LINDENBACH et al., 2007, RIDPATH; FLORES, 2007). Na Figura 1 é apresentado um esquema geral do genoma de BVDV. O vírus apresenta um nucleocapsídeo icosaédrico, vírion esférico de 40 – 60 nm de diâmetro e um envelope

lipídico, derivado das membranas da célula hospedeira, suscetível à ação de solventes e detergentes (DONIS, 1995; RIDPHATH, 2005; FLORES et al., 2007).

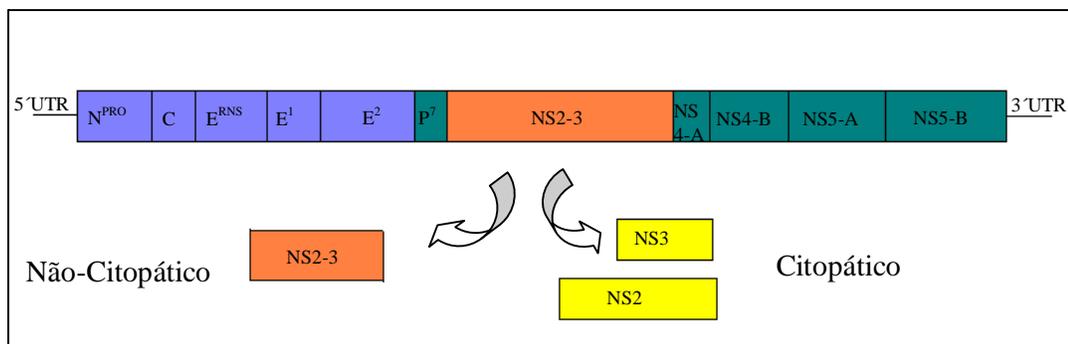


FIGURA 1. Esquema representativo da estrutura do genoma do BVDV. Representação das regiões codificantes para as proteínas estruturais e não-estruturais do vírus, e demonstração de como pode ocorrer a alteração do biótipo citopático para não-citopático. Figura adaptada de Ridpath; Flores (2007).

A análise das regiões 5'UTR, N^{Pro} e E2 permitiu a classificação das diferentes espécies, tipos e subtipos de pestivírus. Atualmente, o BVDV encontra-se dividido em dois genótipos: BVDV-1 e BVDV-2 (VILCEK et al., 2001; BECHER et al., 2003; VILCEK et al., 2005; LIU et al., 2010). Estudos mais recentes propuseram uma subclassificação dos isolados de BVDV-1 em 15 subgenótipos e de BVDV-2 em 4 subgrupos (GIANGASPERO et al., 2007; KADIR et al., 2008; NAGAI et al., 2008; HORNBERG et al., 2009; JACKOVA et al., 2008). Para poder estabelecer uma demarcação entre espécies virais são necessários estudos que correlacionem características genéticas e sorológicas dos isolados, pois as variações que ocorrem nas sequências do genoma podem alterar as características antigênicas (VAN REGENMORTEL & MAHY, 2004; VILCEK & NETTLETON, 2006; YESILBAG et al., 2008; MINAMI et al., 2009; STAHL et al., 2009; LIU et al., 2010).

Os isolados do BVDV-1 incluem a maioria dos vírus utilizados na pesquisa, produção de vacinas e diagnóstico laboratorial (RIDPATH et al., 1994). De outra parte, os primeiros isolados de BVDV-2 foram identificados somente no fim das décadas de 1980 e 1990, nos Estados Unidos e no Brasil, respectivamente (CANAL et al., 1996). No princípio, tentou-se relacionar este genótipo com alta virulência, porém estudos posteriores comprovaram que nem sempre esta correlação é verdadeira. O BVDV-2 pode ser proveniente de diversas fontes, como o soro fetal bovino, utilizado em cultivo

de embriões, de animais PI nascidos de mães vacinadas contra BVDV-1 e de bovinos que morreram de síndrome hemorrágica, que é causada por um BVDV-2 não-citopático (RIDPATH, 2003; RADOSTITS et al., 2007; BAKER, 1995).

A comparação dos dados de filogenia das regiões 5'UTR, N^{Pro} e E2 permitiu estabelecer a existência de diferentes pestivirus “atípicos”, como D32/00_”HoBi”, Brz buf 9, CH-KaHo/cont, Th/04_Khonkaen e Pronghorn (SCHIRMEIER et al., 2004, LIU, et al., 2008; STALDER et al., 2005, VILCEK et al., 2005; RIDPATH; FLORES, 2007; STAHL et al., 2007, BAXI et al., 2006). Em 2009, Liu et al., propuseram uma classificação dos pestivirus considerando a existência de nove espécies: BVDV-1, BVDV-2, BVDV-3 (pestivirus bovinos atípicos), pestivirus giraffe, CSFV, BDV, Tunisian sheep vírus (TSV), Antelope e Bungowannah.

2.1.2 Biótipos

Os pestivirus caracterizam-se por apresentar dois biótipos diferentes, o não-citopático e o citopático (POTGIETER, 2004; RIDPATH; FLORES, 2007). O biótipo não-citopático é o mais encontrado na natureza, apresenta a capacidade de se replicar nas células do hospedeiro sem causar destruição celular, podendo ainda ser considerado vírus reservatório, por ser o único biótipo encontrado em animais PI (VILCEK & NETTLETON 2006; PETERAHNS & SCHWEIZER, 2010). Já o biótipo citopático é originário de mutações, deleções e rearranjos genéticos na proteína viral não-estrutural NS2-3, do biótipo não-citopático, que resultam em expressão da proteína viral NS3. Essa alteração na expressão desta proteína origina uma enfermidade gastroentérica invariavelmente fatal, denominada doença das mucosas (DM) (THIEL, PLAGEMANN, MOENNIG, 1996; MEYERS & THIEL, 1996, FRAY et al., 2000; VOGEL et al., 2001; FLORES; SCHUCH, 2007; RIDPATH; FLORES, 2007). Dessa forma, esse dado sugere que essa proteína possa ser utilizada como marcador molecular na caracterização do BVDV (RIDPATH, FLORES, 2007). Além disso, uma superinfecção com vírus citopático, a partir de vacinas vivas modificadas ou de animais doentes, também pode levar o animal a desenvolver DM, portanto, não é incomum encontrarmos os dois biótipos juntos no mesmo indivíduo (RIDPATH; FLORES, 2007).

2.2 Epidemiologia

Estudos comprovaram que os pestivírus não são espécie-específicos, o que permite verificar a infecção pelo BVDV em bovinos, ovinos, suínos, caprinos e em uma grande variedade de ruminantes de vida livre ou de cativeiro. Além disso, já foram identificados animais silvestres como cervídeos e alpacas persistentemente infectados, entretanto, o papel dessas espécies no estudo da epidemiologia do vírus ainda não está bem definido (BELKNAP et al., 2000; CARMAN et al., 2005; VILCEK; NETTLETON, 2006; DUNCAN, 2008; BYERS et al., 2009, PASSLER; WALZ, 2009; VAN CAMPEN, 2010).

Infecções causadas pelo BVDV podem ser dos tipos: (1) transitórias ou agudas, comumente observadas em animais suscetíveis, que não tiveram contato com o vírus; (2) persistentes, quando a infecção acontece durante o período de gestação e geralmente são observadas em terneiros de até 2 anos; e (3) doença das mucosas que pode ser observada em animais PI quando o vírus não-citopático se transforma em citopático (RIDPATH; FLORES, 2007).

2.2.1 Infecção Transitória ou Aguda

A infecção transitória está envolvida na indução de resposta imune do animal infectado. Assim, a partir de testes sorológicos, é possível traçar um histórico do rebanho ou do indivíduo, para determinar se houve contato com o vírus. Esse tipo de infecção não pode ser caracterizado pela manifestação dos sinais clínicos, devido a sua ampla diversidade, que está diretamente relacionada com a cepa viral infectante, com o sistema imune e com a idade do hospedeiro. Apesar do animal transitoriamente infectado excretar baixa carga viral por um período curto de 3 a 10 dias deve-se evitar o contato deste com fêmeas gestantes, pois isso poderá resultar em perdas reprodutivas ou até mesmo originar animais PI (HOUE, 1999).

2.2.2 Infecção Persistente

A infecção persistente resultante da infecção de fêmeas prenhes, entre 42 e 125 dias de gestação, é causada pelo vírus não-citopático, o qual é capaz de atravessar a placenta e infectar o feto (HOUE, 1995). Neste período específico da gestação o sistema

imunológico do feto está se desenvolvendo e, ao entrar em contato com o vírus, o reconhece como próprio, desenvolvendo imunotolerância específica, de modo a originar animais sorologicamente negativos, porém mantenedores do vírus (HOUE et al., 2006). Durante a gestação, a fêmea infectada apresentará altos níveis de anticorpos, que serão transferidos para o feto, permanecendo na circulação até 40 dias após o nascimento.

Cabe ressaltar que os animais PI podem se apresentar fracos ou assintomáticos. Contudo, independente dessa característica, são considerados a maior fonte de contaminação e disseminação do vírus, pois liberam altas cargas virais de forma contínua e duradoura através de sangue, secreções (vaginal, nasal, salivar, sêmen e leite) e, em menor proporção, nas excreções (urina e fezes). Assim, é imprescindível a eliminação desses animais PI do rebanho para controle e erradicação da doença (POTGIETER, 2004; THURMOND, 2005; RADOSTITS et al., 2007; RIDPATH, FLORES, 2007).

2.2.3 Doença das Mucosas

A doença das mucosas (DM) ocorre quando os animais PI são superinfectados com o biótipo citopático homólogo antigenicamente ao vírus não-citopático residente (GROOMS & KEILEN, 2002; RADOSTITS et al., 2002; POTGIETER, 2004). Isto ocorre geralmente por meio de mutações, deleções ou recombinações no genoma do vírus não-citopático, originando o correspondente citopático (MEYERS et al., 1992; MEYERS et al., 1996) e no passado foram relatados cursos associados com a inoculação de vacinas vivas modificadas.

2.2.4 Prevalência do BVDV

HOUE (1999) descreveu que a prevalência e a disseminação do BVDV estão associadas à presença de animais com infecção transitória/aguda e, principalmente, à existência e manutenção de animais PI. Essa combinação de infecções caracteriza a adaptação do agente viral com a população hospedeira (PETERHNS & SCHWEIZER, 2009).

As mudanças que ocorreram nas práticas de manejo e na forma de criação, passando de extensiva para semi-extensiva, intensiva ou confinamento, podem interferir

na transmissão do vírus (HOUE, 1999; VIET; FOURICHON; SEEGER, 2007; EZANNO; FOURICHON; SEEGER, 2008; VAN CAMPEN, 2010) e os efeitos disso são observados nos índices de prevalência de animais PI (0,1 a 4%) e de animais sorologicamente positivos (18 a 84%) (LONERAGAN et al., 2005; RIDPATH; FLORES, 2007; FULTON et al., 2009).

No Brasil, diversos estudos realizados demonstraram grande diversidade nos isolados de BVDV (OLIVEIRA, 1996; BOTTON et al., 1998) e estimaram que a prevalência individual de animais com anticorpos para BVDV varia de 56 a 66%. Já em nível de rebanho, esta prevalência passa para 68 a 90% (CANAL et al., 1996; POLETTO et al., 2004; THOMPSON et al., 2006; QUINCOZES et al., 2007). Estudos iniciais desenvolvidos por Flores et al. (2005) indicavam que a maior parte dos isolados brasileiros pertenciam ao genótipo BVDV-1 não-citopático, apesar de já existirem relatos da presença do BVDV-2 (CANAL et al., 1996). Posteriormente, verificou-se que a maioria de isolados de BVDV-1 pertenciam ao subgenótipo BVDV-1a, e que a maioria das amostras de BVDV-2 eram classificadas como BVDV-2b (CORTEZ, 2006).

De acordo com Xue et al. (2009) o BVDV-1m é o mais encontrado na China, enquanto nos Estados Unidos os mais comuns são BVDV-1a, BVDV-1b e BVDV-2a (FULTON et al., 2000; FULTON et al., 2005; TAJIMA; DUBOVI, 2005; FULTON et al., 2009). Já na Europa, o BVDV-1 apresenta uma grande diversidade genética e a prevalência do BVDV-2 é bastante baixa (RIDPATH, 2005). Sendo assim, é possível verificar que as diferentes variantes de pestivírus encontram-se bastante difundidas por todo o mundo. E esse tipo de informações podem ser de grande importância para a pesquisa e o desenvolvimento de novas vacinas (XUE et al., 2009).

Em áreas com alta prevalência de BVDV a aquisição de animais de reposição, sem a realização prévia de testes sanitários específicos, tem se destacado como uma das principais causas da introdução do vírus em rebanhos suscetíveis. Isso pode ocorrer devido a possibilidade de se adquirir animais cursando com a fase aguda da infecção, animais PI, ou ainda, novilhas prenhes gestando terneiros PI (RIDPATH; FLORES, 2007; VIET; FOURICHON; SEEGER, 2007, FULTON et al., 2009; VAN CAMPEN, 2010).

2.2.5 Transmissão

Animais jovens costumam ser mais suscetíveis à BVD quando comparados a animais adultos, porém o desenvolvimento de infecção severa será determinado pela virulência da cepa. O mesmo pode ser visualizado em animais não vacinados, vacinados inadequadamente, ou com sistema imunológico debilitado, que se encontram mais suscetíveis a desenvolver infecção e doença clínica. É importante ressaltar que mesmo os animais vacinados podem desenvolver doença clínica, devido à grande diversidade de cepas circulantes, e por as vacinas não oferecem proteção cruzada contra o desafio heterólogo (RADOSTITS et al., 2007; FULTON et al., 2009).

Exames andrológicos podem ser ineficazes na detecção de BVDV e a utilização de sêmen contaminados com o vírus pode induzir infecção transitória/aguda em vacas, persistente nas progênes, além de reduzir as taxas de concepção (HOUE, 1999; GARD; GIVENS; STRINGFELLOW, 2007). Givens et al. (2009) constataram que touros imunocompetentes, após infecção aguda, podem apresentar infecção testicular prolongada, porém com baixa capacidade de transmissão (GIVENS et al., 2009).

Além disso, técnicas de reprodução assistida como a transferência de embriões e a inseminação artificial também aparecem como via de transmissão do BVDV (HOUE, 1999; GIVENS; WALDROP, 2004; THURMOND, 2005; GARD; GIVENS; STRINGFELLOW, 2007).

Segundo Gard, Givens, Stringfellow (2007) as técnicas de reprodução assistida, se corretamente monitoradas, podem ser utilizadas na prevenção da disseminação de agentes infecciosos. Porém, esses mesmos autores citam que o uso de embriões e/ou sêmen de animais infectados com o BVDV podem resultar na sua disseminação (Gard, Givens, Stringfellow, 2007). Esses dados confirmam a necessidade da realização de monitoramento dos materiais usados tanto na coleta como na transferência de embriões. Cabe lembrar ainda a importância da avaliação dos fatores relacionados com os animais, como a saúde da doadora, dos embriões e da receptora (GARD; GIVENS; STRINGFELLOW, 2007).

O contato com secreções, excreções, feto abortado e placenta contaminada de animais suscetíveis representa outra forma de contaminação (RIDPATH; FLORES, 2007). Além disso, o contato indireto de novilhas prenhes com fluidos fetais contaminados, durante o parto de um animal PI também é um importante fator de risco

para infecção, tendo em vista que o vírus permanece viável nesse tipo de secreção por 24 a 48 h pós-parto (LINDBERT, 2004)

O BVDV pode permanecer viável no ambiente por alguns dias ou semanas, por isso deve-se manipular com cuidado equipamentos contaminados como agulhas, material cirúrgico, luvas para palpação, materiais utilizados por tatuadores e aplicadores de brincos, evitando expor os animais saudáveis ao agente infeccioso (THURMOND, 2005). A viabilidade do vírus no ambiente pode variar de acordo com as condições ambientais (temperatura e umidade) e superlotação do rebanho. Ainda a forma de criação pode favorecer a transmissão de partículas virais através de aerossóis, pode ser potencializada, principalmente quando a cepa circulante for do BVDV-1, que é responsável por causar doença respiratória (BAULE et al., 2001).

A utilização de vacinas vivas modificadas em fêmeas prenhes suscetíveis é responsável pela contaminação iatrogênica de fetos (THURMOND, 2005). Além disso, Kleiboeker et al. (2003) demonstraram que animais que receberam este tipo de vacina, podem servir como fonte de infecção a animais prenhes suscetíveis, devido à capacidade de eliminar transitoriamente cepas vacinais.

2.3 Patogenia

Os sinais clínicos e a severidade da BVD variam de acordo com a cepa viral e com o hospedeiro. O genótipo, o biótipo e a virulência da cepa infectante são características importantes relacionadas ao vírus, assim como o status imunológico, reprodutivo e sanitário são fatores ligados ao hospedeiro que interferem diretamente na patogenia do BVDV (RIDPATH; FLORES, 2007).

A principal via de infecção do BVDV é a via oronasal. A partir da penetração no organismo, o vírus sofre tropismo para as tonsilas, onde se replica e concentra até atingir altos títulos, para posteriormente ser drenado para outros tecidos linfóides, como medula óssea e placas de *Peyer*. Os órgãos linfóides são os responsáveis por disseminar o vírus para todos os órgãos pela circulação (POTGIETER, 2004; RIDPATH; FLORES, 2007; LUNARDI et al., 2008; DIEGUEZ et al., 2009).

Cepas de baixa virulência concentram-se predominantemente em folículos linfóides e na região cortical do timo, onde se encontram associados a linfócitos e células do estroma. Liebler-Tenorio; Ridpath; Neil (2003) verificaram que há relação

entre a presença do vírus e a infecção multifocal na mucosa intestinal, entretanto não há relação entre a presença do vírus e lesões teciduais. Além disso, altos títulos virais podem ser encontrados até o sexto dia pós-infecção porque, a partir desse período, o organismo do hospedeiro inicia um processo de neutralização viral. Essa neutralização, além de não permitir que o vírus seja detectado nos órgãos afetados, coincide também com a morte dos linfócitos infectados, o que ocasiona depleção dos folículos linfóides e dos linfócitos da região cortical do timo. Após esse período, é possível observar uma repopulação dos focos de lesão, com aumento de linfócitos circulantes (LIEBLER-TENORIO; RIDPATH; NEIL, 2004).

As infecções causadas por cepas altamente virulentas apresentam sinais clínicos mais severos, porém rotineiramente inespecíficos, como a hipertermia, a anorexia, a depressão e a diarreia (LUNARDI et al., 2008). A replicação dessas cepas não se restringe aos órgãos linfóides e, por conseguinte, a disseminação e a quantificação do antígeno encontrada nos tecidos é significativamente maior quando comparadas com as cepas de baixa virulência (LIEBLER-TENORIO, 2005). Apesar da característica particular dessas cepas, de se distribuírem amplamente pelo organismo do hospedeiro, as lesões encontradas são restritas e marcadas por depleção dos folículos linfóides. Além disso, as lesões observadas tardiamente nos linfonodos não correspondem a quantidade real de vírus no tecido (LIEBLER-TENORIO, 2005). Geralmente, os vírus são observados em tecidos como linfonodos, mucosa do trato digestivo superior e inferior, no trato respiratório e no sistema endócrino. Entretanto, sabe-se que ainda são capazes de infectar células mielóides e megacariócitos da medula óssea (WALZ et al., 1999; ARCHAMBAULT et al., 2000; LIEBLER-TENORIO et al., 2005). Em outro estudo realizado, Ridpath; Neil; Landgraf (2000) comprovaram que cepas de baixa virulência também são capazes de induzir imunossupressão, porém de caráter transitório.

Estudos experimentais desenvolvidos por Walz et al. (1999), utilizando uma cepa altamente virulenta (genótipo BVDV-2), demonstraram que os animais infectados apresentavam hipertermia, diarreia com sangue e imunossupressão, o que levou a denominação de tal enfermidade como síndrome hemorrágica.

A infecção transplacentária é a responsável por originar desordens reprodutivas nos rebanhos e, ainda, animais persistentemente infectados (GROMS, 2004; GROOMS et al., 2006).

As desordens reprodutivas causadas pelo BVDV estão relacionadas com a redução na fertilidade, que pode ser decorrentes de falhas na fertilização, morte embrionária precoce ou disfunção ovariana (GROOMS, 2004; LIEBLER-TENORIO, 2005). Além disso, o vírus pode produzir efeitos sobre os touros persistentemente infectados reduzindo a qualidade do sêmen desses animais (POTGIETER, 2004; RADOSTITS, 2007).

Comparando os índices de abortos observados em rebanhos imunes e não-imunes para BVDV, é possível concluir que os não-imunizados apresentam importantes perdas em relação aos imunizados. Além disso, verificou-se que surtos de doença aguda severa associada ao BVDV-2 têm-se destacado frente à alta incidência de abortos (EVERMANN; RIDPATH, 2002).

A infecção entre 42 e 125 dias de gestação pode resultar em uma alta incidência de nascimento de animais PI, além de morte fetal, abortos, mumificações, e, em menor escala em anomalias fetais (EVERMANN; BARRINGTON, 2005). Entretanto, para que ocorram nascimentos de animais PI, alguns fatores são fundamentais, tais como, período gestacional e o biótipo da cepa viral infectante. Portanto, a infecção pelo BVDV pode produzir diferentes sintomas, tanto nos animais infectados como em suas progênes (FIGURA 2) (FLORES; SCHUSC, 2007; RIDPATH; FLORES, 2007).

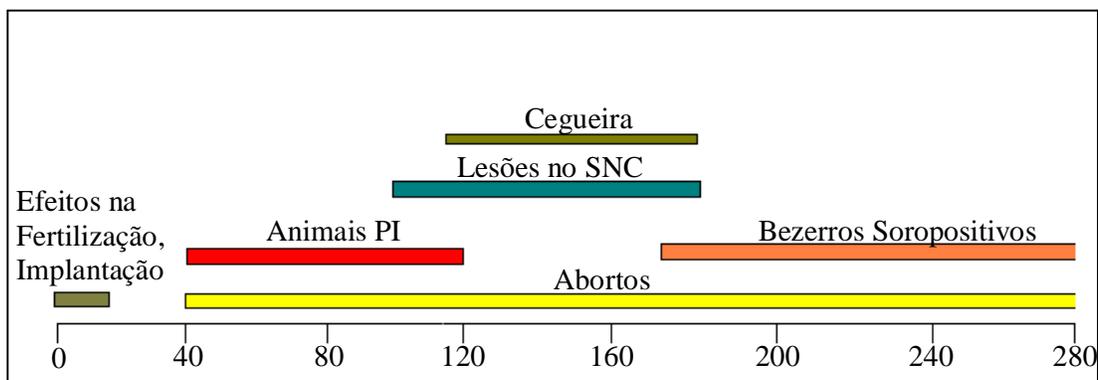


FIGURA 2. Representação do período de gestação (de zero a 280 dias) e as consequências que o BVDV pode causar em casos de infecção de fêmeas bovinas prenhes. Figura adaptada de Ridpath; Flores (2007).

2.4 Diagnóstico

A doença desenvolvida pelo BVDV não apresenta nenhum sinal patognomônico. Portanto, para poder determinar que uma infecção está ocorrendo devido a presença do

vírus, é necessário, inicialmente, realizar uma boa anamnese do rebanho como um todo, observar os sinais clínicos e achados pós-morte (SANDVIK, 1999; GOYAL, 2005). Os testes laboratoriais mais comumente utilizados para confirmar a infecção são a titulação de anticorpos em amostras pareadas, detecção de antígenos ou do genoma do agente (SANDVIK, 2005). Porém, o diagnóstico definitivo depende do isolamento viral, detecção do antígeno ou de resposta imune contra o agente, juntamente com informações sobre epidemiologia, características da infecção e manejo vacinal (GOENS, 2002; RADOSTITS et al., 2007).

Várias técnicas de diagnóstico podem ser utilizadas na detecção do BVDV. Estas dividem-se em dois grupos: os testes diretos e os testes indiretos. O primeiro grupo se baseia na detecção do antígeno ou RNA viral e o segundo detecta a resposta imune de tipo humoral do hospedeiro frente à ação do agente etiológico (REINHARDT et al., 2001).

2.4.1 Isolamento Viral (IV)

O teste de eleição para o diagnóstico do BVDV é o IV em cultivos celulares. Essa técnica permite observar a presença de vírus viável na amostra, apresentando destruição do citoplasma celular quando os biótipos isolados forem citopáticos. Quando o biótipo presente na amostra for o não-citopático, será necessária posterior realização de técnicas como IPX ou IFA, que permitam confirmar a positividade do isolamento através da coloração das células infectadas (SALIKI; DUBOVI, 2004; RIDPATH; FLORES, 2007).

Os pestivírus replicam-se em diferentes tipos celulares, sendo os mais utilizados, para o IV, células MDBK (*Madin-Darby Bovine Kidney Cells*), BT (*Bovine Turbinate*) e Btest (*Bovine Testicle*) (SANDVIK, 1999; SALIK; DUBOVI, 2004). De acordo com Salik; Dubovi (2004), os leucócitos, obtidos a partir de amostras de sangue total, são as células mais indicadas para servirem de inóculo, mas outras amostras como soro, fezes, sêmen e suabes naso-faríngeos e orais, também podem ser inoculados (RADOSTITS et al., 2007). Apesar da sua excelência, o IV é um teste demorado, laborioso e necessita de cultivo celular suscetível, não sendo, portanto, indicado para análise de um grande número de amostras (SANDVIK, 2005; CORNISH et al., 2005; HOUE et al., 2006; HILBE et al., 2007). Além disso, DEREGT et al. (2002) compararam os resultados obtidos com o IV com os da detecção do RNA viral pela técnica de RT-PCR, e

verificaram que 19% de 16 animais PI identificados pela RT-PCR não foram identificados pelo IV. Entretanto, quando confrontado o IV com a técnica de IHQ e com o teste ECA, todos a partir de biópsias de orelha, o isolamento viral teve resultados superiores na identificação de animais infectados (CORNISH et al., 2005).

2.4.2 Imunoperoxidase (IPX)

A IPX tem como princípio básico a detecção da reação antígeno- anticorpo (mono ou policlonal) por um segundo anticorpo marcado com a enzima peroxidase, que ao reagir com peróxido de hidrogênio, produz uma coloração específica (TEIXEIRA, 1998). É uma técnica bastante utilizada para detecção viral e análise sorológica de animais suspeitos de infecção (KEUSER et al., 2004). A IPX pode ser tão ou mais eficiente que as técnicas sorológicas de identificação de antígeno, ainda mais quando associada a anticorpo monoclonal que permita diferenciar a cepa infectante (KREUTZ et al., 2000).

2.4.3 Imunofluorescência (IFA)

A prova de IFA tem sido bastante utilizada como teste de detecção de anticorpos contra vários tipos diferentes de vírus. Pode ser realizada em cortes histopatológicos ou cultivos celulares com inóculos virais. Permite a visualização da infecção pelo BVDV, conforme o mesmo princípio da IPX, variando somente o marcador ou conjugado associado ao anticorpo secundário. A maior desvantagem associada a esta técnica é a dificuldade de interpretação dos resultados e o surgimento de reações inespecíficas (GREISER-WILKE et al., 2007; FLORES, 2007).

2.4.4 Imunohistoquímica (IHQ)

A detecção do BVDV através da IHQ, a partir de amostras de tecido fixadas em formol e embebidas em parafina tem sido muito utilizada para diagnóstico de infecção aguda e persistente e também em casos de aborto (BRODERSEN, 2004; LIEBLER-TENORIO; RIDPATH; NEIL, 2004; SALIKI; DUBOVI, 2004). Essa técnica permite a identificação do antígeno presente no citoplasma das células infectadas, fornecendo um diagnóstico mais específico do que técnicas que necessitam da extração do antígeno de soluções (SANDVIK, 1999).

A IHQ de biópsias de orelha ganhou aplicação importante na investigação da existência de animais PI em rebanhos bovinos (NJAA et al., 2000; GROOMS; KEILEN, 2002; RIDPATH et al., 2002; BRODERSEN, 2004). Fragmentos de orelha são facilmente coletados, transportados e ainda apresentam boa estabilidade, permitindo estocagem em formol por um período de 30 dias, e no refrigerador por mais de 10 dias, antes do serem processadas, sem interferência dos resultados (MILLER et al., 2005). Além disso, não sofre interferência de anticorpos maternos, como geralmente ocorre em exames sorológicos, permitindo dessa forma, sua utilização para animais jovens (GROOMS; KEILEN, 2002; CORNISH et al. 2005).

Como desvantagens desta técnica podem ser citadas a existência de múltiplas etapas, que podem aumentar o erro durante a execução do teste, além de permitir somente avaliação subjetiva dos resultados obtidos (CORNISH et al., 2005).

2.4.5 ELISA Indireto

O ELISA para detecção de anticorpos é considerado uma prova rápida e prática, podendo ser usado para análise de grande número de amostras, porém não possibilita a diferenciação entre anticorpos produzidos frente a uma resposta à infecção, dos anticorpos vacinais e colostrais (GOYAL, 2005; RAUE; HARMEYER; NANJIANI, 2010). Este teste pode também ser utilizado para determinação da eficiência de vacinas, avaliação de protocolos vacinais, monitoramento do status imune do rebanho frente a uma exposição ao BVDV e associação do vírus aos possíveis sinais clínicos observados (SALIKI; DUBOVI, 2004; RIDPATH; FLORES, 2007). Porém, as principais desvantagens são a produção de resposta cruzada com outros pestivírus e sensibilidade variável conforme o protocolo utilizado (SALIKI & BUBOVI, 2004; SANDVIK, 2005).

2.4.6 ELISA de Captura de Antígeno (ECA)

Os testes de ECA permitem identificar a presença do antígeno pela detecção específica com anticorpo marcado, a partir de amostras de soro, tecido necropsiados e de biópsia de orelha. São testes comerciais utilizados principalmente na identificação de animais PI. A presença de anticorpos maternos pode reduzir a sua sensibilidade. Assim, não é o teste mais indicado para animais menores de 3 meses de idade. Como vantagens

pode se citar especificidade, sensibilidade, rapidez, custo e praticidade (CORNISH et al., 2005; DRISKELL & RIDPATH, 2006; KAMPA et al., 2007; FLORES, 2007).

2.4.7 Técnicas de Biologia Molecular

Os diagnósticos moleculares destacam-se por serem rápidos e sensíveis, podendo ser utilizados em larga escala no diagnóstico de indivíduos ou rebanhos (PILZ et al., 2007; HOFFMANN et al., 2009).

As técnicas de biologia molecular permitem a identificação (VILCEK et al., 1994), a diferenciação (CANAL et al., 1996, VILCEK et al., 2001) e a quantificação viral (UTTENTHAL et al., 2003, HOFFMANN et al., 2006), além de identificar variantes virais (SCHIRRMEIER et al., 2004; STHAL et al., 2009) e novos pestivírus (KIRKLAND et al., 2007). A RT-PCR é uma técnica altamente sensível para detecção de animais PI, a partir de amostras biológicas individuais ou em *pools* de soros sanguíneos e de tanques de leite. Essa técnica baseia-se na amplificação de parte do genoma viral com visualização dos resultados em gel de agarose ou acrilamida (TAJIMA; DUBOVI, 2005; DRISKELL; RIDPATH, 2006; EDMONDSON et al., 2007).

A RT-qPCR parte do mesmo princípio da RT-PCR, porém pode permitir a quantificação dinâmica superior aos métodos moleculares convencionais, aumentando a objetividade da interpretação dos resultados (BAXI et al., 2006). Além disso, o formato *multiplex*, que parte da utilização de mais de um par de iniciadores, possibilita a distinção de diferentes agentes na mesma reação (BAXI et al., 2006, HOFFMANN et al., 2006; YOUNG et al, 2006; LA ROCCA & SANDVIK, 2009).

2.4.8 Diagnóstico Diferencial

Devido à sintomatologia variável e inespecífica da doença causada pelo BVDV, surge a importância de realizar o diagnóstico diferencial de outras enfermidades. O diagnóstico diferencial deve ser iniciado pelo estudo da prevalência e epidemiologia, posteriormente passando para os achados clínicos e patológicos de diferentes doenças, que irão variar de acordo com a região avaliada (RADOSTITS et al., 2007). Além do diagnóstico diferencial, é de grande importância considerar a possibilidade de

ocorrerem outras doenças concomitantes ao BVDV, tendo em vista a imunossupressão observada na maioria dos animais infectados (POTGIETER, 2004).

O diagnóstico diferencial deverá ser solicitado de acordo com a sintomatologia observada em cada caso individualmente. Em casos onde a principal sintomatologia apresentada é a diarreia, devem ser realizados testes para diferenciar o agente causador de infecções como salmonelose, disenteria do inverno, paratuberculose, febre catarral maligna, intoxicação por arsênico, micotoxicoses e deficiência de cobre (EVERMANN; BARRINGTON, 2005).

Em situações onde as lesões orais têm destaque na sintomatologia, devem ser incluídos diagnósticos diferenciais para febre catarral maligna, doença da língua azul, estomatite vesicular, estomatite papular e febre aftosa (EVERMANN; BARRINGTON, 2005).

Para o diagnóstico diferencial das doenças respiratórias em bezerros devem ser realizados testes que diferenciem infecções pelo vírus respiratório sincicial bovino, *Pasteurella spp*, *Manheimia spp*, *Hemophilus spp*, *Salmonella spp* e *Mycoplasma spp* (EVERMANN; BARRINGTON, 2005).

Doenças não descritas no Brasil até o presente momento, como doença da língua azul, a infecção pelo vírus Akabane e pelo vírus Aino, não devem deixar de ser consideradas e pesquisadas quando a sintomatologia apresentada consistir em falhas reprodutivas e malformações (POTGIETER, 2004).

2.5 Vacinação

A vacinação é indicada para rebanhos com histórico de doença clínica ou reprodutiva, alta reposição de animais, sorologia positiva, ou em casos de confirmação da presença do BVDV (RIDPATH; FLORES, 2007). O principal objetivo da utilização da vacinação é prevenir a infecção aguda de animais suscetíveis, evitando, dessa forma, a manifestação de doença clínica no rebanho, e, conseqüentemente, a infecção de fêmeas prenhes, de modo a impedir o nascimento de animais PI (KELLING, 2004; FULTON, 2005).

Alguns programas de vacinação preconizam o uso de vacinas inativadas durante a gestação, devido ao seu maior limiar de segurança quando comparadas às atenuadas. Entretanto, o preparo de uma vacina inativada requer maiores quantidades de partículas

virais, uso de adjuvantes que se faz necessário, e não permite que essa seja aplicada em dose única, ou seja, é necessária uma imunização inicial seguida de uma revacinação, o que encarece sua utilização em grandes propriedades (FULTON, 2005; RADOSTITS et al., 2007).

Por outro lado, as vacinas atenuadas, que permitem a replicação viral nas células do animal vacinado, necessitam de menor quantidade de partículas virais para a produção de uma dose vacinal suficiente a gerar a imunidade esperada (dose única), o que proporciona uma grande redução do custo (KELLING, 2004; FULTON, 2005).

Estudos de Cortese et al. (1998) verificaram que a imunização, quando realizada com esse tipo de vacina produz anticorpos vacinais circulantes detectáveis até 18 meses após a sua aplicação. Já Fulton; Burge (2000), demonstram que o declínio dos anticorpos vacinais, inicia-se 140 dias após a primeira aplicação, sugerindo a necessidade de uma revacinação, o que pode gerar dúvidas na eficácia desse tipo de vacina. Estudos experimentais sugerem que os animais vacinados com vacina atenuada desenvolvem uma viremia transitória, que pode ser confirmada pelo isolamento viral a partir de secreções nasais. Dessa forma, poderá estar ocorrendo transmissão do vírus vacinal para animais suscetíveis (KELLING, 2004).

Touros no período pré-púbere, vacinados com vacina atenuada, produzida com vírus não-citopático, apresentaram infecção testicular prolongada, porém ainda não é possível determinar quais os riscos dessa infecção para transmissão venérea e para fertilidade destes animais (GIVENS et al., 2007). Animais prenhes não devem ser vacinados com vacinas atenuadas, pois tal método pode ocasionar infecção do feto, com consequências variáveis dependendo da fase gestacional em que a fêmea for vacinada (RADOSTITS et al., 2007). Animais PI, quando expostos a vírus vacinal citopático, semelhante ao não-citopático infectante, podem desenvolver a doença das mucosas (FULTON, 2005).

Ao comparar as duas vacinas quanto à capacidade de cada uma de induzir a imunidade fetal, observou-se que a vacina atenuada garante proteção fetal significativa, porém incompleta, enquanto que as vacinas inativas garantem apenas imunidade parcial (KELLING, 2004).

Estudos atuais mostraram que a utilização de vacina atenuada antes da cobertura confere proteção fetal a 89,4% dos animais avaliados e que o uso de tal vacina diminui

o risco de infecção fetal pelo BVDV-1 em 82% e pelo BVDV-2 em 75% (XUE et al., 2009).

No Brasil, as vacinas disponíveis no mercado para BVDV são todas inativadas e, na maioria dos casos, a partir de cepas norte-americanas do BVDV-1. Essas vacinas são polivalentes contendo antígenos de outros agentes infecciosos como o herpesvírus bovino tipo-1 (BoHV-1), vírus da parainfluenza bovina tipo-3 (PI3V) e o vírus respiratório sincicial bovino (BRSV), sendo que algumas ainda podem ter *Pasteurella spp* (FLORES et al., 2005).

2.6 Controle

Segundo Radostits et al. (2007), a presença contínua do BVDV nos rebanhos está relacionada a falhas na implementação de programas de imunização, ao não estabelecimento de programas de monitoramento de rebanho e ao não desenvolvimento de programas eficazes de biossegurança e controle da biocontaminação. Diversos países estão com um programa de erradicação do BVDV implementado, como a Ilha de Shetland, a Grã-Bretanha, a França, os Países Baixos e a Alemanha, os quais já conseguiram erradicar a doença. Países como os Estados Unidos, a Suíça e a Áustria ainda estão com os programas em execução (SYNGE et al., 1999; HOUE; LINDENBERG; MOENNIG, 2005; HEFFERNAN et al., 2009; VAN CAMPEN, 2009; PRESI; HEIM, 2010; ROSSMANITH, 2010).

A estruturação destes programas baseia-se na identificação e eliminação de animais PI, prevenção da introdução do vírus no rebanho, adoção de programas de imunização e de controle da biocontaminação para, finalmente, obter a erradicação total do vírus dos rebanhos (HOUE; LINDENBERG; MOENNIG, 2005; VAN CAMPEN, 2010). Os programas de controle e erradicação do BVDV podem ser utilizados por todos os países, porém com devidas adequações necessárias para o tipo de rebanho existente, o histórico epidemiológico do vírus, juntamente com as possibilidades de vacinas e métodos de diagnósticos disponíveis (GREISER-WILKE; GRUMMER; MOENNIG, 2003; HEFFERNAN et al., 2009).

A utilização de diferentes testes diagnósticos é essencial para o desenvolvimento de eficientes programas de controle e erradicação do BVDV. Esses testes devem ser ordenados da seguinte forma: a) classificação do estado sanitário do rebanho;

b) identificação dos animais infectados em rebanhos positivos; c) monitoramento contínuo para confirmar a manutenção do estado sanitário de rebanho livre em rebanhos negativos (HOUE; LINDENBERG; MOENNIG, 2005; ROSSMANITH, 2010). Os testes de detecção de anticorpos, a partir de amostras de tanque de leite ou de leite oriundo de vacas primíparas, de amostras de soro de grupos ou indivíduos, assim como a detecção do próprio agente em tanque de leite são os testes mais indicados para classificação do estado sanitário do rebanho frente ao BVDV (GREISER-WILKE; GRUMMER; MOENNIG, 2003; PRESI; HEIM, 2010).

Já em rebanhos positivos, o principal passo para controle e prevenção do BVDV é a efetiva eliminação dos animais PI, para impedir que o vírus continue circulando e evitar a possibilidade de nascimentos de novos animais PI (GREISER-WILKE; GRUMMER; MOENNIG, 2003; GROOMS 2004).

O monitoramento do rebanho na detecção de animais PI deverá ser constante, pois nada impede que tenham ocorrido erros nos protocolos de vacinação ou de biossegurança, na identificação de rebanhos positivos, ou de reinfecção com o vírus (LAUREYNS; RIBBENS; KRUIF, 2010). Como exemplo de monitoramento de rebanhos, Rossmanith, et al. (2010), na Austrália, utilizaram testes de ELISA e RT-PCR a partir de amostras obtidas nos tanques de leite e obtiveram no período de 2 anos rebanhos livres de BVDV sem uso de vacinação.

Para se tomar as medidas de biossegurança, corretas todos os fatores de risco associados a cada propriedade devem ser devidamente analisados, pois, dessa forma, poderá ser possível prevenir o rebanho da exposição ao vírus (PRESI; HEIM, 2010).

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de estabelecer uma RT-qPCR capaz de identificar e quantificar amostras de animais PI coletadas em rebanhos comerciais e avaliar diferentes técnicas utilizadas para o diagnóstico do BVDV como testes confirmatórios e de referência.

3. ARTIGO CIENTÍFICO

Os materiais e métodos empregados para realização dos experimentos, bem como resultados, discussão e conclusão, serão apresentados a seguir na forma de artigo científico.

Estabelecimento de uma Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real Via Transcriptase Reversa para Detecção de Animais Persistentemente Infectados pelo Vírus da Diarréia Viral Bovina.

Corbellini, A.O.; Weber, M.N.; Budaszewski, R.; Souza, C.K.; Pinto, L.D.; Bitencourt, A.P.G.; Silva, S.C.; Canal, C.W.

Estabelecimento de uma Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real Via Transcriptase Reversa para Detecção de Animais Persistentemente Infectados pelo Vírus da Diarréia Viral Bovina.

Corbellini, A.O.¹; Souza, C.K.¹; Weber, M.N.¹; Budaszewski, R.¹; Pinto, L.D.¹; Bitencourt, A.P.G.²; Silva, S.C.³; Canal, C.W.¹.

¹Laboratório de Virologia Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

²Laboratório de Patologia Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

³Laboratório de Biologia Molecular Aplicada, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

Resumo

A diarreia viral bovina é uma enfermidade que vem se difundindo nos rebanhos bovinos ocasionando grandes perdas econômicas em todo mundo e tornando fundamental a realização de programas de controle da doença. A identificação de animais persistentemente infectados (PI) em rebanhos bovinos é essencial para a implementação de um programa de controle do BVDV. No presente estudo foi estabelecida uma Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real, via transcriptase reversa (RT-qPCR), específica para detecção e quantificação dos diversos genótipos de pestivirus utilizando a imunoperoxidase (IPX) como teste de referência para quantificação. Do total das 72 amostras de soro sanguíneo analisadas, sete amostras foram positivas para BVDV. A sensibilidade da RT-qPCR foi de $10^{3,9}$ TCID₅₀/mL, sendo obtido um coeficiente de correlação de 0,978 com uma eficiência próxima a 100%. Os títulos obtidos através da IPX a partir de soro de animais PI variaram de $10^{5,55}$ a $10^{7,3}$ TCID₅₀/mL, enquanto que os títulos das amostras testadas pela RT-qPCR variaram de $10^{6,2}$ a $10^{7,6}$ TCID₅₀/mL. Além disso, outros testes como transcriptase reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), isolamento viral (IV), ELISA de captura de antígeno (ECA) e imunistoquímica (IHQ) para confirmação do diagnóstico, por serem testes comumente utilizados para detecção do BVDV. Entretanto, a utilização comparativa destes métodos aliada com uma nova estratégia permitiu que se estabelecesse uma RT-qPCR específica para diferentes genótipos de BVDV para estudos de identificação e quantificação de amostras de soro de animais PI. Isso poderá servir como uma importante ferramenta para detecção dos pestivírus atípicos e como base de um estudo inicial atualizado da patogenia do BVDV, permitindo a quantificação do agente em diferentes órgãos dos animais PI.

Palavras chaves: bovinos, vírus da diarreia viral bovina, diagnóstico, PCR em tempo real, detecção.

Abstract

Bovine viral diarrhoea (BVD) is a widespread disease throughout the herds causing great economical losses around the world. The identification of persistent infection animals (PI) in bovine herds is essential to the implementation of a control program for the BVD virus. In the present study, it was established a reverse transcription followed by the chain reaction from the quantitative polymerase (RT-qPCR) which is specific to the identification and quantification of the variable types of pestivirus genotypes utilizing as a reference test the immunoperoxidase (IPX). Seventy-two samples of blood serum from animals suspected of presenting persistent infection of BVDV were analyzed, being seven positive. The sensibility of RT-qPCR was of $10^{3.9}$ TCID₅₀/mL showing a coefficient value of correlation of 0.978 with efficiency close to 100%. The obtained titles through the IPX from the serum of PI animals varied from $10^{5.55}$ to $10^{7.3}$ TCID₅₀/mL, while the titles from the tested samples by the RT-qPCR varied from $10^{6.2}$ to $10^{7.6}$ TCID₅₀/mL. Besides, other tests like the reverse transcription followed by the chain reaction of polymerase (RT-PCR), virus isolation (VI), antigen-capture ELISA (ACE) and Immunohistochemical (IHC) confirmed diagnosis. However, the comparative utilization of these methods allied to a new strategy allowed to be established a specific RT-qPCR for different BVDV genotypes for quantification and detection in samples of PI animal serums. It can be used as an important tool to the detection of the atypical pestivirus, as well as, a basis of an updated initial study of the pathogenesis of the BDVD, allowing a quantification of the agent in different organs of PI animals.

Keywords: cattle, bovine viral diarrhoea virus, diagnosis, real-time PCR, detection.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um grande produtor de alimentos e a bovinocultura tem grande importância econômica e social. Dados recentes apontam o Brasil como o maior exportador em volume de carne bovina do mundo (ABIEC, 2009) e o quinto maior produtor de leite (ABPL, 2010).

As doenças virais são preocupações constantes em qualquer programa de sanidade e, por isso, a identificação do agente, o conhecimento da epidemiologia da doença e o desenvolvimento de técnicas eficientes para seu diagnóstico são medidas extremamente importantes no controle das patologias virais. A diarreia viral bovina (“*bovine viral diarrhea*”- BVD) é uma enfermidade amplamente difundida nos rebanhos bovinos e ocasiona grandes perdas econômicas em animais de corte e leite em todo mundo (LINDBERG, 2003; VOGEL et al., 2001; DIAS & SAMARA, 2003; NORONHA et al., 2003, GROOMS, 2006), o que torna fundamental a realização de programas de controle da doença (HOUE, 1999).

O vírus BVD é um membro do gênero *Pestivirus*, pertencente à família *Flaviviridae*, juntamente com o vírus da peste suína clássica (CSFV) e o vírus da doença da fronteira (BDV) (POTIGIETER, 2004; RIDPATH, 2005; RIDPATH; FLORES, 2007). Analisando a região conservada do genoma 5'UTR (região não-traduzida), o BVDV pode ser classificado em dois genótipos: BVDV-1 e BVDV-2 (RIDPATH et al., 1994). Recentemente, Liu et al., (2009) sugeriram que seja feita uma reclassificação, considerando a existência de um outro genótipo denominado BVDV-3.

A transmissão do BVDV ocorre principalmente por contato direto entre os animais (HOUE, 1995), mas também pode ocorrer via sêmen, embriões, vacinas, fômites contaminados, saliva, secreções nasais e oculares e fezes (KIRKLAND et al., 1991; MOENNIG & PLAGEMANN, 1992; HOUE et al., 1993; VOGEL et al., 2001; GARD et al., 2007; STHAL et al., 2007).

O controle e a erradicação do BVDV baseiam-se em identificar, remover e prevenir a geração de novos animais PI como medida de biossegurança (LINDBERG & ALENIUS, 1999) e a confirmação da presença do vírus nos rebanhos pode ser feita através de diferentes métodos de diagnóstico diretos (identificação de antígenos ou

genoma viral) e indiretos (detecção de anticorpos). Essas técnicas laboratoriais utilizadas em conjunto, permitem aprimorar o diagnóstico em animais com BVDV, já que possibilitam a detecção de anticorpos, antígenos ou do genoma viral (Houe et al., 2006).

As técnicas moleculares têm sido amplamente utilizadas na detecção de patógenos virais sendo técnicas rápidas e menos laboriosas do que as que utilizam cultivo celular. Recentemente, a PCR em tempo real está tornando-se uma ferramenta muito útil no diagnóstico de uma gama de viroses tanto na medicina humana como veterinária (Niesters, 2001). Além disso, possibilita a obtenção de um resultado preciso e rápido, não necessitando de análise em gel de agarose. Técnicas de RT-qPCR utilizando sondas como TaqMan têm sido utilizadas para quantificação e genotipagem de BVDV em substituição da RT-PCR convencional (Bhudevi e Weinstock, 2001; Mahlum et al., 2002; Letellier e Kerkhofs, 2003). Outro método como a utilização do corante fluorescente SYBR Green I pode ser utilizado para RT-qPCR. Como o SYBR Green I é um intercalante de dupla fita de DNA, pode apresentar inespecificidade na reação da qPCR. No entanto, para detectar os ácidos nucléicos-alvo na reação, pode ser empregada a curva de dissociação, a qual diferencia as amplificações inespecíficas através da análise de temperatura (Lekanne et al., 2002; Zipper et al., 2004). Este método tem sido utilizado para detecção e quantificação da carga viral do BVDV em tanques de leite e no soro de animais PI (Kosinova et al., 2007).

O objetivo do presente trabalho foi estabelecer uma RT-qPCR capaz de identificar e quantificar amostras de animais PI coletadas em rebanhos comerciais e avaliar diferentes técnicas utilizadas para o diagnóstico do BVDV como testes confirmatórios e de referência.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Amostras

Um total de 72 amostras de soro sanguíneo de animais suspeitos, com retardo no crescimento, de infecção persistente pelo BVDV foram analisadas. Os critérios para seleção das propriedades alvo foram: apresentação relatos de diminuição na produção, de aumento de problemas reprodutivos e presença de animais com crescimento retardado. Os animais testados pertenciam a nove propriedades de Municípios do Estado do Rio Grande do Sul, Cachoeirinha (amostras C-01 à C-09), Glorinha (amostras G-01 à G-05), Jaguari (amostra J-01), Encruzilhada (amostras E-01 à E-05), Rio Pardo (amostras RP-01 à RP-13), Arroio do Meio (amostra AM-01), Dom Pedrito (amostra DP-01), São Borja (amostras SB-01 à SB-18) e São Francisco de Paula (amostras SFP-01 à SFP-11) e uma propriedade do Município de Ji-Paraná do Estado de Rondônia, (amostras JP-01 à JP-08). Além dos animais suspeitos, fez parte deste estudo um animal experimentalmente infectado (SM-01), gentilmente cedido pelos Drs. Eduardo Furtado Flores e Rudi Weiblen da Universidade Federal de Santa Maria - UFSM. Como controle positivo foi utilizada a cepa de referência de BVDV - NADL cultivada em células MDBK (ATCC, CCL-220).

2.2 Preparação das amostras de soro sanguíneo

As amostras de sangue foram coletadas da veia jugular e/ou caudal utilizando agulhas individuais. O sangue foi deixado a temperatura ambiente por 1 hora e centrifugado a 3000 g por 10 minutos para separação do soro sanguíneo. A seguir, o soro era armazenado a -80°C para posterior utilização.

2.3 Extração e Transcrição do RNA

Para extração e purificação do RNA total foi utilizado TRIzol[®] LS (Invitrogen, USA) seguindo as recomendações do fabricante. Conjuntos de cinco amostras foram processadas simultaneamente, sendo os controles positivos testados posteriormente. Logo após a extração, foi realizada a transcrição reversa utilizando-se a enzima Superscript[®] III Reverse Transcriptase Taq Platinum[®] (Invitrogen,USA), seguindo as instruções do fabricante. As reações foram padronizadas para um volume final de 20 µL

e as condições de amplificação foram: 5 minutos a 65°C seguidos de 1 ciclo de 1 hora a 55°C e 15 minutos a 72°C.

2.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A amplificação do fragmento de 288 pb foi realizada utilizando protocolo descrito por Vilcek, et al. (1994) com os *primers* 324/326, descritos na Tabela 1. As condições de amplificação foram as seguintes: 95°C por 3 minutos, seguidos de 35 ciclos de 95°C por 1 minuto, 56°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto e extensão final de 72°C por 10 minutos. Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% e corados com *Blue green loading dye I* (LGC Biotecnologia, Brasil). Como referência foi utilizado o marcador de peso molecular GeneRuler™ 100 bp (SM-0243, Fermentas, USA) e a visualização dos produtos de amplificação foi realizada sob lâmpada ultravioleta.

2.5 Isolamento Viral

As amostras dos animais identificados positivos pela RT-PCR para BVDV foram submetidas ao isolamento viral. Os soros (1 mL) foram previamente filtrados e posteriormente inoculados em meio de cultivo. A seguir foram inoculados em linhagem celular MDBK (ATCC, CCL-220) mantidos em meio mínimo de Earle modificado por Dulbecco, suplementado com 2% de soro fetal bovino livre de BVDV. Os cultivos celulares foram mantidos por cinco dias em estufa com 5% de CO₂ a 37°C em garrafas de cultivo celular de 25 cm² (FRESHNEY, R.I., 2005). Cada amostra foi submetida a seis passagens subsequentes e o monitoramento da replicação viral foi realizado através da IPX nas passagens 2, 4 e 6.

2.6 ELISA de Captura de Antígeno

O teste de ELISA de Captura de Antígeno utilizado neste estudo foi o “HerdChek Bovine Diarrhoea Virus (BVDV) Antigen/Serum Plus ELISA Test Kit”, seguindo as instruções do fabricante (IDEXX, Estados Unidos), a partir de fragmento de orelha coletado e mantido congelado a -80°C.

2.7 Imunohistoquímica

A imunohistoquímica de biópsia de orelha foi realizada pelo Laboratório de Patologia Veterinária da UFRGS, seguindo o protocolo previamente padronizado por Santos (2010) com algumas modificações. O anticorpo primário monoclonal comercial utilizado foi o anti-BVDV 15C5 (Syracuse, USA) diluído 500 vezes em uma solução tampão fosfato salina (PBS).

2.8 Teste de Imunoperoxidase

A IPX foi utilizada para a titulação viral e para confirmar o isolamento viral, seguindo o protocolo descrito por Saunders (1977), com modificações, como a fixação com acetona 20% e tempos de incubações de 15 minutos, descritos previamente por Paton et al. (1991). A IPX foi realizada em placa de 96 poços, utilizando-se como controle positivo a cepa NADL, e como controle negativo, soro fetal bovino livre de pestivírus. As amostras foram previamente diluídas até 10^{-7} e sua reprodutibilidade foi testada em quadruplicata. Os anticorpos, primários (policlonal) e secundários (IgG1-121p) foram gentilmente cedidos pelo Dr. Paulo Michel Roehle do Laboratório de Virologia da UFRGS. O título viral foi determinado segundo o método descrito por Reed & Muench (1938).

2.9 Padronização da PCR em tempo real (RT-qPCR)

Inicialmente, foram selecionadas 1.412 sequências da região 5'UTR dos pestivírus disponíveis no Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) com tamanhos variando entre 118 e 421 nucleotídeos (Anexo). O alinhamento dessas sequências foi realizado utilizando o programa Muscle versão 3.8.31 (EDGAR, 2004). Para analisar o alinhamento e identificar as regiões mais conservadas, visando selecionar o par de *primers* foi utilizado o programa Genedoc 2.7.001 (<http://www.genedoc.us>). Os *primers* foram definidos após análise da temperatura de anelamento, formação de dímeros e *harpins*, gerando um produto de amplificação de 157 pb (Tabela 1).

A RT-qPCR foi realizada em equipamento Step One Plus Real Time PCR System (Applied Biosystems, Estados Unidos) utilizando os seguintes reagentes para o mix de amplificação: “Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix-UDG” (Invitrogen,

GB) de acordo com as instruções do fabricante. Ao mix de amplificação foram adicionados 20 pmol de cada *primer*, totalizando um volume final de 20 µL de reação. As condições de amplificação foram: 1 ciclo de desnaturação a 95°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 45 segundos, anelamento a 60°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos. Ao final, foi feita uma curva de desnaturação para verificar a especificidade dos produtos de amplificação. Os valores utilizados para quantificação da carga viral de cada amostra foram definidos tendo como base o valor do título da cepa NADL previamente determinado pela IPX.

TABELA 1. *Primers* utilizados na RT-PCR e na RT-qPCR para identificação de animais persistentemente infectados.

<i>Primers</i>	Sequências 5' - 3'	Produto	Referência
324 (RT-PCR)	ATG CCC WTA GTA GGA CTA GCA	288 pb	Vilcek, et al., 1994
326 (RT-PCR)	TCA ACT CCA TGT GCC ATG TAC		
PanPesti_F (RT-qPCR)	GAG ATG CYA YGT GGA CGA GGG C	157 pb	Este Trabalho
PanPesti_R (RT-qPCR)	GYC TCT GCS RCA CCC TAT CAG G		

2.10 Análise Estatística

Para determinar o limite de detecção e reprodutibilidade do ensaio da RT-qPCR, o RNA foi diluído em série de $10^{7,8}$ até $10^{3,9}$ TCID₅₀. Este ensaio foi realizado em triplicata em três experimentos distintos. A análise estatística para a sensibilidade analítica foi realizada com o programa SPSS versão 11.5.0 utilizando o modelo Probit.

3. RESULTADOS

3.1 RT-PCR

Com a utilização da RT-PCR foram identificadas 7 amostras positivas para BVDV, do total de 72 amostras de soro sanguíneo testadas. As amostras positivas estão apresentadas na Tabela 2. Na Figura 3 estão representados os fragmentos de 288 pb presente nas amostras positivas SFP-07 e SFP-08.

TABELA 2. Comparação dos títulos da RT-qPCR e IPX e confirmação dos animais PI por RT-PCR e IV.

Sample	RT-PCR	IV	Título IPX	Título RT-qPCR	Quantificação RT-qPCR
NADL	+	+	$10^{7,8}$	$10^{7,8}$	65.000.000
SFP-07	+	+	$10^{6,3}$	$10^{6,15}$	1.412.537
SFP-08	+	+	$10^{6,3}$	$10^{6,3}$	2.179.215
SFP-10	+	+	$10^{6,55}$	$10^{6,7}$	4.642.795
J-01	+	+	$10^{5,55}$	10^6	938.793
SM-01	+	+	$10^{7,3}$	$10^{5,8}$	583.446
DP-01	+	+	$10^{7,1}$	$10^{6,2}$	1.475.640
AM-01	+	+	$10^{7,3}$	$10^{5,8}$	681.912

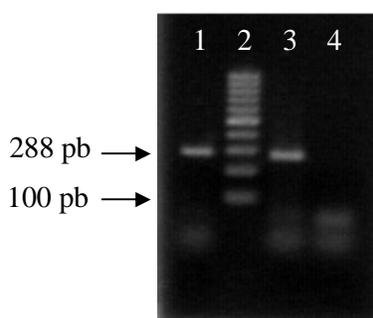


FIGURA 3. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação obtidos pela RT-PCR para BVDV. Nas canaletas 1 e 3 foram aplicados os produtos de amplificação das amostras SFP-07 e SFP-08, respectivamente. Na canaleta 2 foi aplicado o marcador de tamanho molecular de 100 pb. Na canaleta 4 foi aplicado o controle negativo.

3.2 Isolamento Viral

Com o objetivo de confirmar o resultado obtido pela RT-PCR, foi utilizada a técnica de IV que é considerada padrão ouro para diagnóstico de BVDV. A replicação

viral foi verificada através da IPX e todas as amostras previamente identificadas pela RT-PCR resultaram positivas no IV (FIGURA 4).

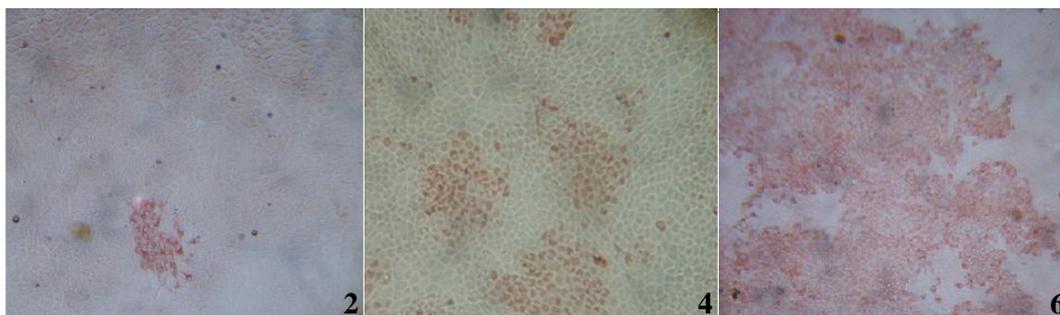


FIGURA 4. Fotomicrografia dos cultivos celulares inoculados com BVDV e corados pela técnica da imunoperoxidase nas passagens 2, 4 e 6 da amostra J-01, onde foi possível verificar um aumento na quantidade de vírus. Fotos tiradas em aumento de 400x.

3.3 ELISA de Captura de Antígeno e Imunohistoquímica

Os ELISAS e as IHQ (FIGURA 5) realizados com as biópsias de orelhas foram positivos em todas as amostras previamente identificadas pela RT-PCR.

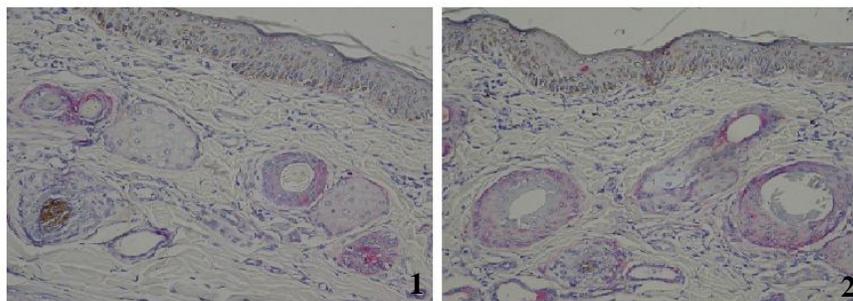


FIGURA 5. Fotomicrografia de corte histológico após realização da técnica de imunohistoquímica em corte de fragmento de orelha. As duas fotos são representativas do resultado de IHQ de biópsia de orelha dos animais SFP-10 e AM-01. Em ambas é possível observar marcação positiva avermelhada difusa em queratinócitos da epiderme, folículos pilosos e em células mononucleares da derme. Fotos tiradas em aumento de 100x.

3.4 Titulação Viral

Todas as amostras positivas para BVDV foram submetidas à técnica da IPX para determinação do título viral correspondente. Na Tabela 2 estão representados os resultados dos títulos encontrados para cada amostra.

3.5 Padronização da RT-qPCR

3.5.1 Sensibilidade da RT-qPCR

A sensibilidade foi determinada através de testes sequenciais de diluições da cepa NADL. O limite de detecção foi determinado como sendo $10^{3,9}$ TCID₅₀/mL por reação (FIGURA 6). A curva padrão apresentou valor de coeficiente de correlação de 0,978 e uma eficiência próxima de 100%, o que mostra que o técnica foi corretamente padronizada (Figura 7).

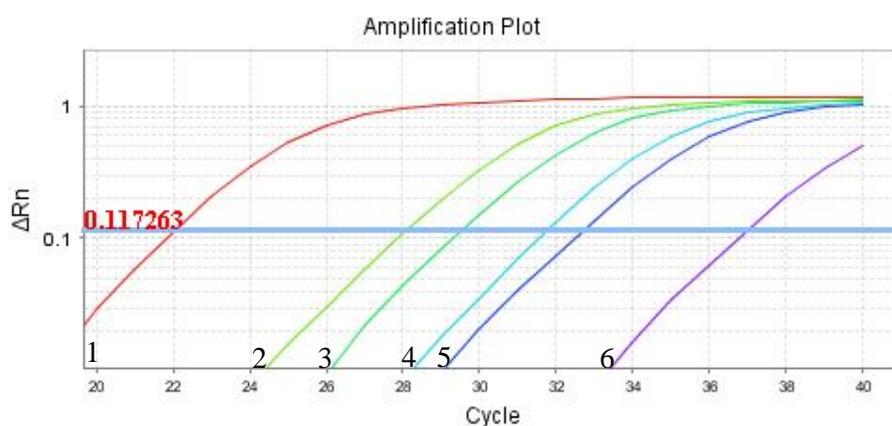


FIGURA 6: Curva de amplificação de diluições da amostra NADL.

1) $10^{7,8}$ TCID₅₀/mL; 2) $10^{4,8}$ TCID₅₀/mL; 3) $10^{4,5}$ TCID₅₀/mL; 4) $10^{4,2}$ TCID₅₀/mL; 5) $10^{3,9}$ TCID₅₀/mL 6) controle negativo.

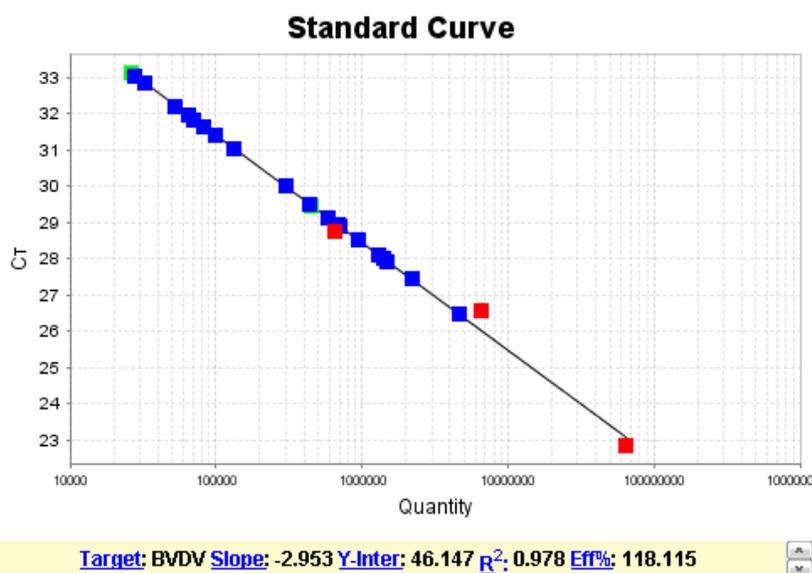


FIGURA 7. Curva padrão da amplificação da amostra NADL e das amostras positivas para BVDV. Neste gráfico estão representadas todas as amostras positivas para BVDV que foram testadas em triplicatas em diferentes concentrações: concentradas, diluídas 10^{-1} e 10^{-2} onde R^2 é igual a 0,978 e a Eff ficou próxima de 100%. Os pontos em vermelho são referentes a curva padrão (NADL), os pontos azuis são das amostras positivas encontradas neste estudo e os pontos verdes os controles negativos.

Além disso, utilizando o programa estatístico Probit foi possível determinar que a confiabilidade da RT-qPCR foi de 95% para detectar BVDV, com até 450,66 TCID₅₀/mL de soro, porém, este valor pode diminuir para 50% quando existirem até 151,53 TCID₅₀/mL de soro.

3.5.2 Especificidade da RT-qPCR

A especificidade analítica da RT-qPCR foi determinada utilizando cinco amostras virais de três vírus diferentes: BVDV-NADL, BVDV-SOLDAN, BVDV-260, BoHV-1 e PI3V. A reação de RT-qPCR detectou todos os BVDV testados e não apresentou reação cruzada contra o BoHV-1 e PI3V.

3.5.3 Análise da RT-qPCR

Todas as amostras previamente identificadas como positivas para BVDV por RT-PCR foram testadas na RT-qPCR e tiveram resultado positivo. A Figura 8 representa o gráfico de amplificação da RT-qPCR das amostras testadas com os

respectivos Ct. Já na Figura 9 encontra-se o gráfico da curva de desnaturação, onde estão representados os valores de Tm. Os valores de Ct, ciclo onde a reação atinge o limiar da fase exponencial das amostras positivas variaram entre 23,98 e 26,48, enquanto o Ct da amostra negativa foi de 35,64. O Tm médio observado nas amostras foi de 83°C com uma variação de dois desvios padrões (1,18) para mais ou para menos.

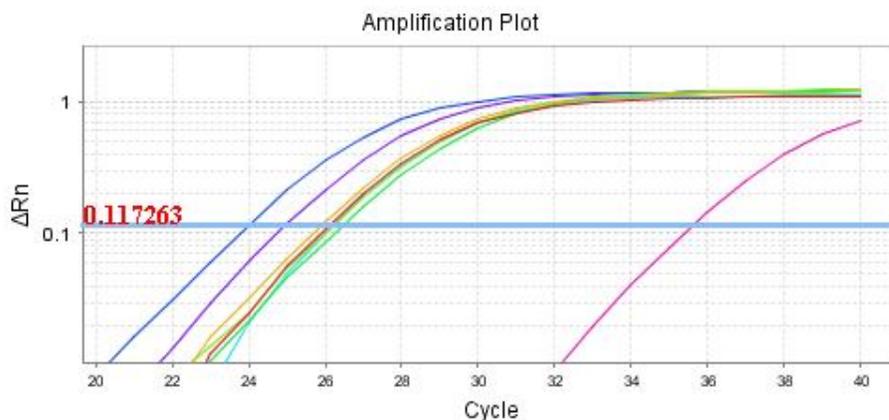


FIGURA 8. Gráfico representativo da amplificação das amostras positivas para BVDV na RT-qPCR utilizando o sistema SYBR Green. Os gráficos mostram os valores de Ct correspondente de cada amostra: SFP-10: 23,98; SM-01: 25,93; AM-01: 26,05; SFP-08: 26,18; J-01: 26,2; SFP-07: 26,48; controle negativo: 35,64

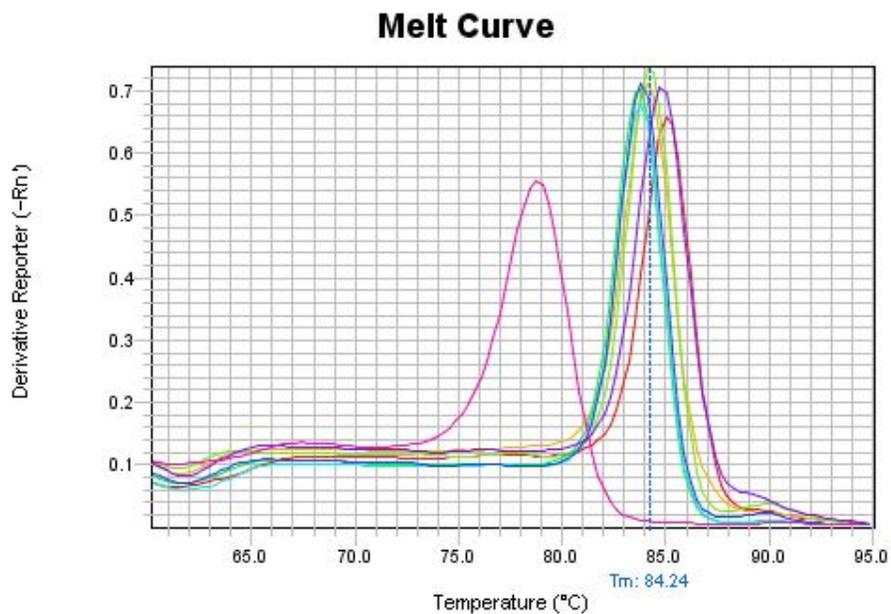


FIGURA 9. Gráfico representativo da curva de desnaturação das amostras positivas para BVDV. A maior concentração de curvas está representando os Tm das amostras positivas, que variaram de 83,69 a 85,05°C. O Tm do controle negativo foi de 79,41°C e está representado pela curva deslocada à esquerda.

3.5.4 Reprodutibilidade da RT-qPCR

A reprodutibilidade da RT-qPCR foi avaliada a partir de três ensaios em triplicata e em três corridas distintas, a partir da amostra NADL em diluições de $10^{7,8}$ até $10^{3,9}$ TCID₅₀/mL. Todas as réplicas do controle positivo apresentaram Ct e Tm dentro do esperado. De acordo com os valores de Ct foi determinado o coeficiente de variação, que avalia a precisão da técnica, que variou de 4 a 9%. Esses valores foram obtidos a partir das médias das três corridas consecutivas.

4 DISCUSSÃO

A identificação de animais PI em rebanhos bovinos é essencial para a implementação de um programa de controle do BVDV. Para isso são necessários testes laboratoriais que forneçam resultados rápidos, sensíveis e específicos, e que ainda possam ser utilizados como uma ferramenta no diagnóstico de rotina (RIDPATH; FLORES, 2007).

Do total das 72 amostras testadas apenas 9,72% foram positivas para a presença do BVDV, o que torna necessário a implementação e utilização de testes diagnósticos sensíveis e específicos para detecção desses animais.

Técnicas moleculares como PCR têm sido amplamente utilizadas para detecção de uma ampla gama de viroses. Atualmente, a PCR em tempo real apresenta-se como uma ferramenta altamente sensível e específica, além de fornecer a quantificação da carga viral no soro, tecidos e outras amostras biológicas (KUBISTA et al., 2006; LEMMON; GARDNER, 2008).

Os títulos de animais PI obtidos na IPX utilizando anticorpo policlonal variaram de $10^{5,55}$ a $10^{7,3}$ TCID₅₀/mL, enquanto que outros estudos com IPX utilizando anticorpo monoclonal obtiveram valores menores variando de $10^{2,2}$ e 10^6 TCID₅₀/mL (BOLIN et al., 1985; BOLIN & RIDPATH, 1992) e 10^3 a 10^5 TCID₅₀/mL (SALIKI, et al. 1997; GILBERT, et al., 1999); em contraste, animais transitoriamente infectados apresentam títulos menores, de aproximadamente $10^{0,9}$ TCID₅₀/mL (BOLIN et al., 1985; BOLIN & RIDPATH, 1992). Essas diferenças encontradas entre os títulos virais na IPX pode estar relacionada ao tipo de anticorpo utilizado, pois o anticorpo policlonal é menos específico e possibilita reações sorológicas cruzadas (BOTTON, et al., 1998; KREUTZ, et al., 2000; RIDPATH; FLORES, 2007).

Em contrapartida, a RT-qPCR estabelecida neste trabalho mostra-se vantajosa em relação a IPX, pois apresenta 100% de probabilidade de detectar BVDV num limite de detecção de $10^{3,9}$ TCID₅₀/mL. Desse modo, apresenta-se como uma ferramenta altamente específica na detecção e quantificação da carga viral de BVDV em de animais PI, auxiliando no controle da doença no rebanho.

A partir de uma cepa de referência de BVDV (NADL), foi determinado o título viral em TCID₅₀/mL pela técnica de IPX, para posteriormente estabelecer a curva padrão

da RT-qPCR. Com base nisso, foi realizada a quantificação da carga viral pela RT-qPCR e os títulos de animais PI obtidos na RT-qPCR e IPX variaram $10^{6,2}$ a $10^{7,6}$ TCID₅₀/mL e $10^{5,5}$ a $10^{7,3}$ TCID₅₀/mL, respectivamente. Os títulos entre as duas técnicas mostraram-se semelhantes, confirmando a validação da quantificação pela RT-qPCR.

A RT-qPCR desenvolvida no presente estudo utiliza um novo par de *primers* panpestivírus, selecionados a partir da análise de 1.412 sequências da região 5' UTR dos pestivírus disponíveis no Genbank. Para analisar o alinhamento e identificar as regiões mais conservadas, visando selecionar o par de *primers* foi utilizado o programa Genedoc 2.7.001 (<http://www.genedoc.us>). Os primers demonstraram identidade com todos os tipos de BVDV, inclusive os do Tipo 3, do qual está tornando-se cada vez mais prevalente nos rebanhos (LIU et al, 2009; LIU et al, 2010). Na prática, a especificidade da RT-qPCR foi avaliada utilizando as cepas de BVDV- NADL, BVDV-SOLDAN, BVDV-260, como grupo de inclusão para o teste. E amostras epidemiologicamente importantes relacionadas ao BVDV como grupo de exclusão, BoHV-1 e PI3V, detectando somente os BVDV demonstrando 100% de especificidade.

A sensibilidade da RT-qPCR foi de $10^{3,9}$ TCID₅₀, apresentando valor de coeficiente de correlação de 0,978 e a eficiência próxima a 100%, que permite identificar 95% das infecções com até 450,66 partículas virais/mL de soro. La Rocca e Sandvik (2009) em um estudo semelhante desenvolveram uma RT-qPCR, porém utilizando o sistema TaqMan e a sensibilidade da técnica foi de $10^{3,6}$ TCID₅₀. Com isso, a RT-qPCR estabelecida neste estudo apresentou uma sensibilidade semelhante ao estudo de La Rocca e Sandvik (2009), só que utilizando SYBR Green I.

A RT-qPCR apresenta algumas vantagens quando comparada com a RT-PCR convencional, como rapidez, altamente específica e sensível e não necessita de análise em gel de agarose, o que evita o risco de possíveis contaminações (MACKAY, 2004).

Como o BVDV possui o genoma altamente variável, os métodos de detecção baseados em SYBR Green I são ferramentas confiáveis e vantajosas para identificação do DNA-alvo, quando os primers bem projetados e a qPCR bem estabelecida. Já os métodos com sondas como TaqMan exigem que a sonda seja altamente complementar à sequência amostral para sua ligação dificultando a ligação da sonda em sequências altamente variáveis (BAXI et al. 2006).

De acordo com os dados apresentados neste estudo, essa RT-qPCR apresentou uma alta sensibilidade e especificidade, podendo detectar diferentes variantes do BVDV. Além disso, mostrou-se ser uma técnica confiável, rápida, reproduzível que possibilita a quantificação da carga viral em amostras de soro. Dessa maneira, a RT-qPCR pode ser uma ferramenta útil para o controle de animais PI e disseminação de BVDV nos rebanhos bovinos comerciais.

5 CONCLUSÃO

O estudo comparativo desenvolvido entre métodos de diagnóstico para BVDV permitiu estabelecer uma RT-qPCR específica e sensível para a detecção e quantificação de diferentes tipos de pestivírus, em amostras de campo coletadas em rebanhos comerciais. Além disso, a RT-qPCR padronizada poderá servir como base para o estudo da patogenia do BVDV, baseado na quantificação do agente em diferentes órgãos dos animais infectados.

6. Referência Bibliográfica

ABIEC - Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne. Disponível em <<http://www.abiec.com.br>>. Acesso em 17/11/2010 (dados de 2009).

ABPL - Associação Brasileira dos Produtores de Leite. Disponível em <<http://www.leitebrasil.org.br/release.htm>>. Acesso em 17/11/2010 (dados de 2010).

BHUDEVI, B.; WEINSTOCK, D. Fluorogenic RT-PCR assay (TaqMan) for detection and classification of bovine viral diarrhoea virus. **Veterinary Microbiology**, v.83, p.1–10. 2001.

BOLIN, S.R.; MCCLURKIN, A.W.; CUTLIP, R.C.; CORIA, M.F. Severe clinical disease induced in cattle persistently infected with noncytopathic virus by superinfection with cytopathic bovine viral diarrhoea virus. **American Journal of Veterinary Research**, v.46, p.573–576, 1985.

BOLIN, S.R.; RIDPATH, J.F. Differences in virulence between two noncytopathic bovine viral diarrhoea viruses in calves. **American Journal of Veterinary Research**, v.53, p. 2157–2163, 1992.

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

DIAS, F.C.; SAMARA, S.I. Detecção de anticorpos contra o vírus da diarréia viral bovina no soro sanguíneo, no leite individual e no leite de conjunto de tanque de expansão de rebanhos não vacinados. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.40, p.161-168, 2003.

EDGAR, R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput, **Nucleic Acids Research**, v.32, n.5, 1792-1797. 2004.

ELLIS, J.A.; MARTIN, K.; NORMAN, G. R.; HAINES, D. M. Comparison of detection methods for bovine viral diarrhoea virus in bovine abortions and neonatal death. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.7, p.433-436, 1995.

FRESHNEY, R.I. Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, Fifth Edition, Copyright 2005 John Wiley & Sons, Inc. cap.23, p.375-420.

GARD, J.A.; GIVENS, M.D.; STRINGFELLOW, D.A. Bovine viral diarrhoea virus (BVDV): Epidemiologic concerns relative to semen and embryos. **Theriogenology**, v.68, n.3, p.434-442, 2007.

GILBERT, S.A.; BURTON, K.M.; PRINS, S.E.; DEREGT, D. Typing of bovine viral diarrhoea viruses directly from blood of persistently infected cattle by multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, p.2020–2023, 1999.

GROOMS, D.L. Reproductive losses caused by bovine viral diarrhoea virus and leptospirosis. **Theriogenology**, v.66, n.3, p.624-628, 2006.

HOUE, H. Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections. **Veterinary Microbiology**, v.64, n.1-3, p.89-107, 1999.

HOUE, H.; LINDBERG, A.; MOENNIG, V. Test strategies in bovine viral diarrhoea virus control and eradication campaigns in Europe. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.18, n.1, p.427-436, 2006.

HOUE, H.; PEDERSEN, K.M.; MEYLING, A. The effect of bovine virus diarrhoea virus infection on conception rate. **Preventive Veterinary Medicine**, v.15, p.117-123, 1993.

KREUTZ L.C., DONIS R.O., GIL L.H.V.G., HOFFMAN A.N., GARCEZ D.C., FLORES E.F. & WEIBLEN R. Production and characterization of monoclonal antibodies to Brazilian isolates of bovine viral diarrhoea virus. **Brazilian Journal Medical Biology Research**, v.33, n.12, p.1459-1466, 2000.

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

KOSINOVA, E.; PSIKAL, I.; ROBESOVA, B.; KOVARCIK, K. Real-time PCR for quantitation of bovine viral diarrhoea virus RNA using SYBR Green I fluorimetry. **Veterinarni Medicina**, v.52, n.6, p. 253-261, 2007.

KUBISTA, M.; ANDRADE, J.M.; BENGTSSON, M.; FOROOTAN, A.; JONAK, J.; LIND, K.; SINDELKA, R.; SJOBACK, R.; SJOGREEN, B.; STROMBOM, L.; STAHLBERG, A.; ZORIC N. The real-time polymerase chain reaction. **Molecular Aspects of Medicine**, v.27, p.95-125, 2006.

LA ROCCA, S.A.; SANDVIK, T. A short target real-time RT-PCR assay for detection of pestiviruses infecting cattle. **Journal of Virological Methods**, v.161, n.1, p.122-127, 2009.

LEKANNE DEPREZ, R.H.; FIJNVANDRAAT, A.C.; RUIJTER, J.M.; MOORMAN, A.F. Sensitivity and accuracy of quantitative real-time polymerase chain reaction using SYBR green I depends on cDNA synthesis conditions. **Analytical Biochemistry**, v.307, p.63-69, 2002.

LEMMON, G.H.; GARDNER, S.N. Predicting the sensitivity and specificity of published real-time PCR assays. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v.7, n.18, p.1-10, 2008.

LETELLIER, C.; KERKHOF, P. Real-time PCR for simultaneous detection and genotyping of bovine viral diarrhoea virus. **Journal of Virological Methods**, v.114, p.21-27. 2003.

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

LINDBERG, A.L. Bovine viral diarrhoea virus infections and its control. A review. **Veterinary Questions**, v.25, p.1-16, 2003.

LIU, L.; XIA, H.; WAHLBERG, N.; BELÁK, S.; BAULE, C. Phylogeny, classification and evolutionary insights into pestiviruses. **Virology**, v.385, n.2, p.351-357, 2009.

MACKAY, I.M. Real-time PCR in the microbiology laboratory. **Clinical Microbiology and Infection**, v.10, p.190-212, 2004.

MAHLUM, C.E.; HAUGERUD, S.; SHIVERS, J.L.; ROSSOW, K.D.; GOYAL, S.M.; COLLINS, J.E.; FAABERG, K.S. Detection of bovine viral diarrhoea virus by TaqMan reverse transcription polymerase chain reaction. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.14, p.120-125, 2002.

MOENNIG, V.; PLAGEMANN, P.G.W. The pestiviruses. **Advances Virus Research**, Academic Press, v.41, p.53-98, 1992.

NIESTERS, H.G.M. Quantitation of viral load using real-time amplification techniques. **Methods**, v.25, p.419-429, 2001.

NORONHA, R.P.; CAMPOS, G.S.; SARDI, S.I. Pesquisa do vírus da diarréia viral bovina em bovinos jovens. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.40, p.424-430, 2003.

PATON, D.; SANDS, J.; ROEHE, P. M. BVD Monoclonal antibodies: relationship between viral protein specificity by radioimmunoprecipitation and viral strain specificity by peroxidase linked assay. **Archives of Virology**, Austria, v.23, n.3, p.47-54, 1991.

POTGIETER, L.N.D. Bovine viral diarrhoea and mucosal disease. In: Coetzer, J.A.W.; Tustin, R.C. *Infectious Diseases of Livestock*. 2nd ed. Cape Town: Oxford University, 2004, v.2, p.946-969.

REED, L.S. & MÜENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent end points. **American Journal of Hygiene**, v. 27, p. 493-7, 1938.

RIDIPATH, J.F. Classification and molecular biology. In: GOYAL, S.M & RIDIPATH, J.F. (Eds) *Bovine Viral Diarrhoea Virus: Diagnosis, management and control*. Iowa:Blackwell Publishing, 2005, cap.3, p.65-80.

RIDIPATH, J.F.; BOLIN, S.R.; DUBOVI, E.J. Segregation of Bovine Viral Diarrhoea Virus into Genotypes. **Virology**, v.205, n.1, p.56-74, 1994.

RIDIPATH, J.F.; FLORES, E.F. Flaviviridae. In: FLORES, E.F. (Org) *Virologia Veterinária*. Santa Maria: UFSM, 2007, cap.22. p.563-592.

SALIKI, J.T.; FULTON, R.W.; HULL, S.R.; DUBOVI, E.J. Microtiter virus isolation and enzyme immunoassays for detection of bovine viral diarrhoea virus in cattle serum. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, p.803–807, 1997.

SANTOS, A. Caracterização Clínica, Patológica e Molecular da Infecção pelo Vírus da Diarreia Viral Bovina Tipo 2 Não-Citopático em Propriedade do Rio Grande do Sul. Dissertação de Mestrado, Faculdade Federal do Rio Grande do Sul, 2010, p.35.

SAUNDERS, G.C. Development and evaluation of an enzyme-labeled antibody test for rapid detection of hog cholera antibodies. **American Journal of Veterinary Research**, v. 38, n. 1. p 21-25. 1977.

VILCEK, S.; HERRING, A.J.; HERRING, J.A.; NETTLETON, P.F.; LOWINGS, J.P.; PATON, D.J. Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. **Archives of Virology**, v.136, p.309–323, 1994.

VOGEL, F.S.F.; SCHERER, C.F.C.; FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; LIMA, M.; KUNRATH, C.F. Resposta sorológica e avaliação de proteção fetal em ovelhas prenhas vacinadas contra o vírus da diarréia viral bovina (BVDV). **Ciência Rural**, v.31, n.5, p.831-838, 2001.

ZIPPER, H.; BRUNNER, H.; BERNHAGEN, J.; VITZTHUM, F. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. **Nucleic Acids Research**, v.32, p.103, 2004.

4. DISCUSSÃO GERAL

A escolha do conjunto de ações mais adequado para o controle e a erradicação do BVDV depende basicamente das condições específicas de cada rebanho (HOUE, 2003), que por sua vez, estão diretamente relacionadas com estratégias na prevenção da entrada de animais PI, na remoção destes das propriedades e na utilização de um calendário vacinal eficiente (VAN OIRSCHOT, 1999; FULTON & BURGE, 2001).

Entretanto, as únicas abordagens que têm apresentado um resultado significativo na redução do impacto decorrente da infecção pelo BVDV, são aquelas que se baseiam em adoção de medidas de biossegurança em geral, com ou sem o uso de vacinas (LINDBERG, 2003).

Portanto, a identificação de animais PI em rebanhos bovinos é essencial para a implementação de um programa de controle do BVDV. Para isso são necessários testes laboratoriais que forneçam resultados rápidos, sensíveis e específicos, e que ainda possam ser utilizados como uma ferramenta no diagnóstico de rotina (RIDPATH; FLORES, 2007). Técnicas moleculares como PCR têm sido amplamente utilizadas para detecção de uma gama de viroses. Atualmente, a qPCR apresenta-se como uma ferramenta altamente sensível e específica, além de fornecer a quantificação da carga viral no soro, tecidos e outras amostras biológicas (KUBISTA et al., 2006; LEMMON; GARDNER, 2008).

Dentro deste contexto, a proposta do estudo foi estabelecer uma nova estratégia para o diagnóstico do BVDV, baseado na RT-qPCR. O objetivo foi fornecer um resultado específico, sensível e eficiente para a detecção e quantificação de diferentes tipos de pestivírus, inclusive os atípicos, em amostras de campo, coletadas em rebanhos comerciais.

Os títulos de obtidos a partir de amostras de animais PI pela IPX utilizando anticorpo policlonal variaram de $10^{5,55}$ a $10^{7,3}$ TCID₅₀/mL, enquanto que outros estudos com IPX utilizando anticorpo monoclonal obtiveram valores menores variando de $10^{2,2}$ e 10^6 TCID₅₀/mL (BOLIN et al., 1985; BOLIN & RIDPATH, 1992) e 10^3 a 10^5 TCID₅₀/mL (SALIKI, et al. 1997; GILBERT, et al., 1999); em contraste, animais transitoriamente infectados apresentam títulos menores, de aproximadamente $10^{0,9}$

TCID₅₀/mL (BOLIN et al., 1985; BOLIN & RIDPATH, 1992). Essas diferenças encontradas entre os títulos virais na IPX pode estar relacionada ao tipo de anticorpo utilizado, pois o anticorpo policlonal é menos específico e possibilita reações sorológicas cruzadas. (BOTTON et al., 1998; KREUTZ, et al., 2000; RIDPATH; FLORES, 2007).

Em contrapartida, a RT-qPCR estabelecida neste trabalho mostra-se vantajosa em relação a IPX, pois apresenta 100% de probabilidade de detectar BVDV num limite de detecção de $10^{3,9}$ TCID₅₀/mL. Desse modo, apresenta-se como uma ferramenta altamente específica na detecção e quantificação da carga viral de BVDV em de animais PI, auxiliando no controle da doença no rebanho.

A quantificação da RT-qPCR foi determinada o título viral em TCID₅₀/mL pela técnica de IPX a partir da cepa de referência de BVDV (NADL), para posteriormente ser estabelecida a curva padrão da RT-qPCR. Com base nisso, foi realizada a quantificação da carga viral pela RT-qPCR e os títulos de animais PI obtidos na RT-qPCR e IPX variaram $10^{6,2}$ a $10^{7,6}$ TCID₅₀/mL e $10^{5,5}$ a $10^{7,3}$ TCID₅₀/mL, repectivamente. Os títulos entre as duas técnicas mostraram-se semelhantes, confirmando a validação da quantificação pela RT-qPCR.

Os novos *primers* (Pan_Pesti) demonstraram identidade com todos os tipos de BVDV, inclusive os do Tipo 3, o qual está tornando-se cada vez mais prevalente nos rebanhos (LIU et al, 2009; LIU et al, 2010) . Porém, na prática, a especificidade da RT-qPCR foi avaliada utilizando as variantes de BVDV: NADL, SOLDAN, 260 (grupo de inclusão) e BoHV-1 e PI3V (grupo de exclusão), detectando somente os BVDV o que demonstra 100% de especificidade.

A sensibilidade da RT-qPCR foi de $10^{3,9}$ TCID₅₀, apresentando valor de coeficiente de correlação de 0,978 e a eficiência de próxima a 100%, que permite identificar 95% das infecções com até 450,66 partículas virais/mL de soro. La Rocca e Sandvik (2009) em um estudo semelhante desenvolveram uma RT-qPCR, porém utilizando o sistema TaqMan e a sensibilidade da técnica foi de $10^{3,6}$ TCID₅₀. Com isso, a RT-qPCR estabelecida neste estudo apresentou uma sensibilidade semelhante ao estudo de La Rocca e Sandvik (2009), porém utilizando SYBR Green I.

A RT-qPCR apresenta algumas vantagens comparando com a RT-PCR convencional, como rapidez, altamente específica e sensível e não necessita de análise em gel de agarose, da evita o risco de possíveis contaminações (MACKAY, 2004).

Como o BVDV possui o genoma altamente variável, os métodos de detecção baseados em SYBR Green I são ferramentas confiáveis e vantajosas para identificação do DNA-alvo, quando os primers bem projetados e a qPCR bem estabelecida. Já os métodos com sondas como TaqMan exigem que a sonda seja altamente complementar à sequência amostral para sua ligação dificultando a ligação da sonda em sequências altamente variáveis (BAXI et al. 2006).

De acordo com os dados apresentados neste estudo, essa RT-qPCR apresentou uma alta sensibilidade e especificidade, podendo detectar diferentes variantes do BVDV. Além disso, mostrou-se ser uma técnica confiável, rápida, reproduzível que possibilita a quantificação da carga viral em amostras de soro. Dessa maneira, a RT-qPCR pode ser uma ferramenta útil para o controle de animais PI e disseminação de BVDV nos rebanhos bovinos comerciais.

REFERÊNCIAS

ABIEC - Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne. Disponível em <<http://www.abiec.com.br>>. Acesso em 17/11/2010 (dados de 2009).

ABPL - Associação Brasileira dos Produtores de Leite. Disponível em <<http://www.leitebrasil.org.br/release.htm>>. Acesso em 17/11/2010 (dados de 2010).

ARCHAMBAULT, D.; BÉLIVEAU, C.; COUTURE, Y.; CARMAN, S. Clinical response and immunomodulation following experimental challenge of calves with type 2 noncytopathogenic bovine viral diarrhea virus. **Veterinary Research**, v.31, n.2, p.215-227, 2000.

BAKER J. C. The clinical manifestations of bovine viral diarrhea infection. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.11, p.425-445, 1995.

BAULE, C.; KULCSÁR, G.; BELÁK, K.; ALBERT, M.; MITTELHOLZER, C.; SOÓS, T.; KUCSERA, L.; BELÁK, S. Pathogenesis of Primary Respiratory Disease Induced by Isolates from a New Genetic Cluster of Bovine Viral Diarrhea Virus Type I. **Journal of Clinical Microbiology**, doi: 10.1128/JCM.39.1.146-153. 2001.

BAXI, M.; MCRAE, D.; BAXI, S.; GREISER-WILKE, I.; VILCEK, S.; AMOAKO, K.; DEREGT, D. A one-step multiplex real-time RT-PCR for detection and typing of bovine viral **Veterinary Microbiol**, v.116, p.37-44, 2006.

BECHER, P.; AVALOS, R.R.; ORLICH, M.; CEDILLO R.S.; KÖNIG, M.; SCHWEIZER, M.; STALDER, H.; SCHIRRMAYER, H.; THIEL, H.J. Genetic and antigenic characterization of novel pestivirus genotypes: implications for classification. **Virology**, v.20, p.96-104, 2003.

BELKNAP, E.B.; COLLINS, J.K.; LARSEN, R.S.; CONRAD, K.P. Bovine viral diarrhea virus in New World camelids. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.12, p.568-70, 2000.

BOLIN, S.R.; MCCLURKIN, A.W.; CUTLIP, R.C.; CORIA, M.F. Severe clinical disease induced in cattle persistently infected with noncytopathic virus by superinfection with cytopathic bovine viral diarrhea virus. **American Journal of Veterinary Research**, v.46, p.573-576, 1985.

BOLIN, S.R.; RIDPATH, J.F. Differences in virulence between two noncytopathic bovine viral diarrhea viruses in calves. **American Journal of Veterinary Research**, v.53, p. 2157-2163, 1992.

BOTTON S.A.; DA-SILVA, A.M.; BRUM, M.C.; WEIBLEN, R.; FLORES, E.F. Antigenic characterization of Brazilian bovine viral diarrhea virus isolates by monoclonal antibodies and cross-neutralization. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.31, p.1429-38, 1998.

BRODERSEN, B.W. Immunohistochemistry used as a screening method for persistent bovine viral diarrhoea virus infection. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.20, p. 85–93, 2004.

BYERS, S.R.; SNEKVIK, K.R.; RIGHTER, D.J.; EVERMANN, J.F.; BRADWAY, D.S.; PARISH, S.M.; BARRINGTON, G.M. Disseminated Bovine viral diarrhoea virus in a persistently infected alpaca (*Vicugna pacos*) cria. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.21, n.1, p.145-148, 2009.

CANAL, C.W.; HOTZEL, I.; ALMEIDA, L.L.; ROEHE, P.M.; MASUDA, A. Differentiation of classical swine fever virus from ruminant pestiviruses by reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR). **Veterinary Microbiology**, v.48, n.3-4, p.373-379, 1996.

CARMAN, S.; CARR, N.; DELAY, J.; BAXI, M.; DEREGT, D.; HAZLETT, M. Bovine viral diarrhoea virus in alpaca: abortion and persistent infection. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.17, n.6, p.589-593, 2005.

CORNISH, T.E.; VAN OLPHEN, A.L.; CAVENDER, J.L.; EDWARDS, J.M.; JAEGER, P.T.; VIEYRA, L.L.; WOODARD, L.F.; MILLER, D.R.; O'TOOLE, D. Comparison of ear notch immunohistochemistry, ear notch antigen-capture ELISA, and buffy coat virus isolation for detection of calves persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.17, n.2, p.110–117, 2005.

CORTESE, V.S.; GROOMS, D.L.; ELLIS, J.; BOLIN, S.R.; RIDPATH, J.F.; BROCK, K.V. Protection of pregnant cattle and their fetuses against infection with bovine viral diarrhoea virus type 1 by use of a modified-live virus vaccine. **American Journal of Veterinary Research**, v.59, n.11, p.1409-1413, 1998.

CORTEZ, A.; HEINEMANN, M.B.; CASTRO, A.M.M.G.; SOARES, R.M.; PINTO, A.M.V.; ALFIERI, A.A.; FLORES, E.F.; LEITE, R.; RICHTZENHAIN, L.J. Genetic characterization of Brazilian bovine viral diarrhoea virus isolates by partial nucleotide sequencing of 5'-UTR region. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.26, n.4, p.211-216, 2006.

DEREGT, D.; CARMAN, P.S.; CLARK, R.M.; BURTON, K.M.; OLSON, W.O.; GILBERT, S.A. A comparison of polymerase chain reaction with and without RNA extraction and virus isolation for detection of bovine viral diarrhoea virus in young cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.14, n.5, p.433-437, 2002.

DIAS, F.C.; SAMARA, S.I. Detecção de anticorpos contra o vírus da diarréia viral bovina no soro sanguíneo, no leite individual e no leite de conjunto de tanque de expansão de rebanhos não vacinados. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.40, p.161-168, 2003.

DIEGUEZ, F.J.; YUS, E.; VILAR, M.J.; SANJUÁN, M.L.; ARNAIZ, I. Effect of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection on dairy calf rearing. **Research in Veterinary Science**, v.87, n.1, p.39-40, 2009.

DONIS, R.O. Molecular biology of bovine viral diarrhoea virus and its interactions with the host. In: Baker, J.C., Houe, H. (Eds.), *Bovine Viral Diarrhoea Virus*. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.11, p.393-424, 1995.

DREW, T.W.; YAPP, F.; PATON, D.J. The detection of bovine viral diarrhoea virus in bulk milk samples by the use of a single-tube RT-PCR. **Veterinary Microbiology**, v.64, p.145-154, 1999.

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

DUNCAN, C.; RIDPATH, J.; PALMER, M.V.; DRISKELL, E.; SPRAKER, T. Histopathologic and immunohistochemical findings in two white-tailed deer fawns persistently infected with Bovine viral diarrhoea virus. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.20, n.3, p.289-296, 2008.

EDGAR, R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, v.32, n.5, 1792-1797, 2004.

EDMONDSON, M.A.; GIVENS, M.D.; WALZ, P.H.; GARD, J.A.; STRINGFELLOW, D.A.; CARSON, R.L. Comparison of tests for detection of bovine viral diarrhoea virus in diagnostic samples. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.19, n.4, p.376-381, 2007.

ELLIS, J.A.; MARTIN, K.; NORMAN, G. R.; HAINES, D. M. Comparison of detection methods for bovine viral diarrhoea virus in bovine abortions and neonatal death. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.7, p.433-436, 1995.

EVERMANN, J.F.; RIDPATH, J.F. Clinical and epidemiologic observations of bovine viral diarrhoea virus in the northwestern of United States. **Veterinary Microbiology**, v.89, n.2-3, p.129-139, 2002.

EVERMANN, J.F.; BARRINGTON, G.M. Clinical Features. In: GOYAL, S.M.; RIDPATH, J.F. (Eds) *Bovine Viral Diarrhoea Virus: Diagnosis, management and control*. Iowa: Blackwell Publishing, 2005, cap.6, p.105-129.

EZANNO, P.; FOURICHON, C.; SEEGER, H. Influence of herd structure and type of virus introduction on the spread of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) within a dairy herd. **Veterinary Research**, v.39, n.5, p.39-51, 2008.

FLORES, E.F.; WEIBLEN R.; VOGEL, F.S.F.; ROEHE, P.M.; ALFIERI, A.A.; PITUCO, E.M. Infecção pelo vírus da diarréia viral bovina no Brasil – histórico, situação atual e perspectivas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.25, n.3, p.125-134, 2005.

FLORES, E.F.; SCHUCH, L.F.D. Diarréia viral bovina. In: RIET-CORREA, F. et al. *Doenças de ruminantes e eqüídeos*, 3th Ed, Santa Maria: Pallotti, 2007, v.1, p.81-93.

FRANCKI, R.I.B.; FAUQUET, C.M.; KNUDSON, D.L.; BROWN, F. Classification and Nomenclature of Viruses, Fifth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses. **Archives of Virology**, [suppl.2], p.228-229, 1991.

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

FRESHNEY, R.I. Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, Fifth Edition, Copyright 2005 John Wiley & Sons, Inc. cap.23, p.375-420.

FULTON, R.W.; RIDPATH, J.F.; ORE, S.; CONFER, A.W.; SALIKI, J.T.; BURGE, L.J.; PAYTON, M.E. Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) subgenotypes in diagnostic in laboratory accessions: Distribution of BVDV1a, 1b, e 2a subgenotypes. **Veterinary Microbiology**, v.111, n.1-2, p.35-40, 2005.

FULTON, R.W.; WHITLEY, E.M.; JOHNSON, B.J.; RIDPATH, J.F.; KAPIL, S.; BURGE, L.J.; COOK, B.J.; CONFER, A.W. Prevalence of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in persistently infected cattle and BVDV subtypes in affected cattle in beef herds in south central United States. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v.73, n.4, p.283-291, 2009.

FULTON, R.W. Vaccines. In: GOYAL, S.M.; RIDPATH, J.F. (Eds) Bovine Viral Diarrhoea Virus: Diagnosis, management and control. Iowa:Blackwell Publishing, 2005, cap.13, p.209-222.

FULTON, R.W.; BURGE, L.J. Bovine viral diarrhoea virus types 1 and 2 antibody response in calves receiving modified live virus or inactivated vaccines. **Vaccine**, v.19, n.2-3, p.264-274, 2000.

GARD, J.A.; GIVENS, M.D.; STRINGFELLOW, D.A. Bovine viral diarrhoea virus (BVDV): epidemiologic concerns relative to semen and embryos. **Theriogenology**, v.68, p.434-442, 2007.

GARD, J.A.; GIVENS, M.D.; STRINGFELLOW, D.A. Bovine viral diarrhoea virus (BVDV): Epidemiologic concerns relative to semen and embryos. **Theriogenology**, v.68, n.3, p.434-442, 2007.

GIANGASPERO, M.; HARASAWA, R. Numeral taxonomy of the genus Pestivirus based on palindromic nucleotide substitutions in the 5'- untranslated region. **Journal Virology Methods**, v.88, p.146-375, 2007.

GILBERT, S.A.; BURTON, K.M.; PRINS, S.E.; DEREGT, D. Typing of bovine viral diarrhoea viruses directly from blood of persistently infected cattle by multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, p.2020-2023, 1999.

GIVENS, M.D.; RIDDELL, K.P.; EDMONDSON, M.A.; WALZ, P.H.; GARD, J.A.; ZHANG, Y.; GALIK, P.K.; BRODERSEN, B.W.; CARSON, R.L.; STRINGFELLOW, D.A. Epidemiology of prolonged testicular infection with bovine viral diarrhoea virus. **Veterinary Microbiology**, v.139, n.1-2, p.42-51, 2009.

GIVENS, M.D. Noncytopathic bovine viral diarrhoea virus can persist in testicular tissue after vaccination of peri-pubertal bulls but prevents subsequent infection. **Vaccine**, v.25, n.5, p.867-876, 2007.

GIVENS, M.D.; WALDROP, J.G. Bovine viral diarrhoea virus in embryo and semen production systems. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.20, n.1, p.21-38, 2004.

GOENS, S.D. The evolution of bovine viral diarrhoea: a review. **The Canadian Veterinary Journal**, v.43, n.12, p.946-954, 2002.

GOYAL, S.M. Diagnosis. In: Goyal, S.M & Ridpath, J.F. (Eds) Bovine Viral Diarrhoea Virus: Diagnosis, management and control. Iowa:Blackwell Publishing, 2005, cap.12, p.197-208.

GREISER-WILKE, I.; BLOME, S.; MOENNIG, V. Diagnostic methods for detection of classical swine fever virus: status quo and new developments. **Vaccine**, v.25, p.5524-5530, 2007.

GREISER-WILKE, I.; GRUMMER, B.; MOENNIG, V. Bovine viral diarrhoea eradication and control programmes in Europe. **Biologicals**, v.31, n.2, p.113-118, 2003.

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

GROOMS, D.L. Reproductive losses caused by bovine viral diarrhoea virus and leptospirosis. **Theriogenology**, v.66, n.3, p.624-628, 2006.

GROOMS, D.L.; KEILEN, E.D. Screening of neonatal calves for persistent infection with bovine viral diarrhoea virus by immunohistochemistry on skin biopsy samples. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.9, n.4, p.898-900, 2002.

HEFFERNAN, C.; MISTURELLI, F.; NIELSEN, L.; GUNN, G.J.; YU, J. Analysis of Pan-European attitudes to the eradication and control of bovine viral diarrhoea. **The Veterinary Record**, v.164, n.6, p.163-167, 2009.

HILBE, M.; STALDER, H.; PETERHANS, E.; HAESSIG, M.; NUSSBAUMER, M.; EGLI, C.; SCHELP, C.; ZLINSZKY, K.; EHRENSPERGER, F. Comparison of five diagnostic methods for detecting bovine viral diarrhoea virus infection in calves. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.19, n.1, p.28-34, 2007.

HOFFMANN, B.; BEER, M.; REID, S.M.; MERTENS, P.; OURA, C.A.L.; VAN RIJN, P.A.; SLOMKA, M.J.; BANKS, J.; BROWN, I.H.; ALEXANDER, D.J.; KING, D.P.A review of RT-PCR technologies used in veterinary virology and disease control: Sensitive and specific diagnosis of five livestock diseases notifiable to the World Organization for Animal Health. **Veterinary Microbiology**, v.139, p.1-23, 2009.

HOFFMANN, B.; DEPNER, K.; SCHIRRMIEIER, H.; BEER, M. A universal heterologous internal control system for duplex real-time RT-PCR assays used in a detection system for pestiviruses. **Journal of Virological Methods**, v.136, p.200-209, 2006.

HORNBERG, A.; FERNANDEZ, S.R.; VOGL, C.; VILCEK, S.; MATT, M.; FINK, M.; KÖFER, J.; SCHÖPF, K. Genetic diversity of pestivirus isolates in cattle from Western Austria. **Veterinary Microbiology**, v.135, p.205-213, 2009.

HOUE, H. Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections. **Veterinary Microbiology**, v.64, n.1-3, p.89-107, 1999.

HOUE, H. Epidemiology of bovine viral diarrhea virus. **Veterinary Clinics of North America**, v.11, n.3, p.521-548, 1995.

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

HOUE, H.; LINDBERG, A.; MOENNIG, V. Test strategies in bovine viral diarrhea virus control and eradication campaigns in Europe. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.18, n.1, p.427-436, 2006.

HOUE, H.; PEDERSEN, K.M.; MEYLING, A. The effect of bovine virus diarrhoea virus infection on conception rate. **Preventive Veterinary Medicine**, v.15, p.117-123, 1993.

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

KADIR, Y.; CHRISTINE, F.; BARBARA, B.W.; ZEKI, Y.; FERAY, A.; AYKUT, O.; IBRAHIM, B.; SIBILINA CEDILLO, R.; HEINZ-JURGEN, T.; MATTHIAS, K. Genetic heterogeneity of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates from Turkey: identification of a new subgroup in BVDV-1. **Veterinary Microbiology**, v.130, n.3-4, p.258-267, 2008.

KAMPA, J.; STÅHL, K.; RENSTRÖM, L.H.; ALENIUS, S. Evaluation of a commercial E^{ntS}-capture ELISA for detection of BVDV in routine diagnostic cattle serum samples. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.49, p.1-17, 2007.

KAMPA, J.; STAHL, K.; MORENO-LOPEZ, J.; CHAULUN, A.; AIUMLAMAI, S.; ALENIUS, S. BVDV and BHV-1 infections in dairy herds in northern and northeastern Thailand. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.45, p.181-192, 2004.

KELLING, C.L. Evolution of Bovine Viral Diarrhea Virus Vaccines. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.20, n.1, p.115-130, 2004.

KEUSER, V.; SCHYNTS, F.; DETRY, B.; COLLARD, A.; ROBERT, B.; VANDERPLASSCHEN, A.; PASTORET, P.P.; THIRY, E. Improved antigenic methods for differential diagnosis of bovine, caprine and corvine alphaherpesviruses related to bovine herpesvirus. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.42, n.3, p.1228-1235, 2004.

KIRKLAND, P.D.; FROST, M.J.; FINLAISON, D.S.; KING, K.R.; RIDPATH, J.F.; GU, X. Identification of a novel virus in pigs- Bungowannah virus: A possible new species of pestivirus. **Virus Research**, v.129, p.26-34, 2007.

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

KLEIBOEKER, S.B.; LEE, S.M.; JONES, C.A.; ESTES, D.M. Evaluation of shedding of bovine herpesvirus 1, bovine viral diarrhoea virus 1, and bovine viral diarrhoea virus 2 after vaccination of calves with a multivalent modified-live virus vaccine. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.222, n.10, p.1399-403, 2003.

KEUSER, V.; SCHYNTS, F.; DETRY, B.; COLLARD, A.; ROBERT, B.; VANDERPLASSCHEN, A.; PASTORET, P.P.; THIRY, E. Improved antigenic methods for differential diagnosis of bovine, caprine and corvine alphaherpesviruses related to bovine herpesvirus. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.42, n.3, p.1228-1235, 2004.

KREUTZ L.C., DONIS R.O., GIL L.H.V.G., HOFFMAN A.N., GARCEZ D.C., FLORES E.F. & WEIBLEN R. Production and characterization of monoclonal antibodies to Brazilian isolates of bovine viral diarrhoea virus. **Brazilian Journal Medical Biology Research**, v.33, n.12, p.1459-1466, 2000.

LA ROCCA, S.A.; SANDVIK, T. A short target real-time RT-PCR assay for detection of pestiviruses infecting cattle. **Journal of Virological Methods**, v.161, n.1, p.122-127, 2009.

LAUREYNS, J.; RIBBENS, S.; KRUIF, A. Control of bovine virus diarrhoea at the herd level: Reducing the risk of false negatives in the detection of persistently infected cattle. **The Veterinary Journal**, v.184, p.21-26, 2010.

LIEBLER-TENORIO, E.M.; RIDPATH, J.F.; NEIL, J.D. Distribution of viral antigen and tissue lesions in persistent and acute infection with the homologous strain of noncytopathic bovine viral diarrhoea virus. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.16, n.5, p.388-396, 2004.

LIEBLER-TENORIO, E.M.; RIDPATH, J.F.; NEILL, J.D. Distribution of viral antigen and development of lesions after experimental infection of calves with a BVDV 2 strain of low virulence. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.15, n.3, p.221-232, 2003.

LIEBLER-TENORIO. Classification and molecular biology. In: GOYAL, S.M & RIDPATH, J.F. (Eds) Bovine Viral Diarrhea Virus: Diagnosis, management and control. Iowa:Blackwell Publishing, 2005, cap.7, p.121-144.

LINDBERG, A.; STOKSTAD, M.; LØKEN, T.; ALENIUS, S.; NISKANEN, R. Indirect transmission of bovine viral diarrhoea virus at calving and during the postparturient period. **The Veterinary Record**, v.152, n.15, p.463-467, 2004.

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

LINDBERG, AL. Bovine viral diarrhoea virus infections and its control. A review. **Veterinary Questions**, v.25, p.1-16, 2003.

LINDENBACH, B.D.; RICE, C.M. Flaviviridae: The viruses and Their replication. In: kdm fields bn, howley pm, griffin de, lamb ra, martin ma, roizman b, strauss se, editors. Fields Virology. Philadelphia: Lippincott- Raven; 2001, p. 991–1042.

LINDENBACH, B.D.; PRAGAI, B.M.; MONTSERRET, R.; BERAN, R.K.; PYLE, A.M.; PENIN, F.; RICE, C.M. The C terminus of hepatitis C virus NS4A encodes an electrostatic switch that regulates NS5A hiperphosphorylation and viral replication. **Journal of Virology**, v.81, p.8905-8918, 2007.

LIU, L.; XIA, H.; WAHLBERG, N.; BELÁK, S.; BAULE, C. Phylogeny, classification and evolutionary insights into pestiviruses. **Virology**, v.385, n.2, p.351-357, 2009.

LIU, L.; KAMPA, J.; BELÁK, S.; BAULE, C. Virus recovery and full-length sequence analysis of atypical bicine pestivirus Th/04_Khonkaen. **Veterinary Microbiology**, v.138, p. 62-68, 2008.

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

LONERAGAN, G.H.; THOMSON, DU.; MONTGOMERY, D.L.; MASON, G.L.; LARSON, R.L. Prevalence, outcome, and health consequences associated with persistent infection with bovine viral diarrhoea virus in feedlot cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.226, n.4, p.595-601, 2005.

LUNARDI, M.; HEADLEY, S.A.; LISBÔA, J.A.; AMUDE, A.M.; ALFIERI, A.A. Outbreak of acute bovine viral diarrhoea in Brazilian beef cattle: Clinicopathological findings and molecular characterization of a wild-type BVDV strain subtype 1b. **Research in Veterinary Science**, v.83, n.3, p.599-604, 2008.

MEYERS, G.; TAUTZ, N.; STARK, R. Rearrangement of viral sequences in cytopathogenic pestiviruses. **Virology**, v.191, p.368-376, 1992.

MEYERS, G.; TAUTZ, N.; BECHER, P.; THIEL, H.J.; KÜMMERER, B.M. Recovery of cytopathogenic and noncytopathogenic bovine viral diarrhea from cDNA constructs. **Journal of Virology**, v.70, p.8606-8613, 1996.

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

MILLER, M.A.; RAMOS-VARA, J.A.; KLEIBOEKER, S.B.; LARSON, R.L. Effects of delayed or prolonged fixation on immunohistochemical detection of bovine viral diarrhea virus type 1 in skin of two persistently infected calves. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.17, n.5, p.461-463, 2005.

MINAMI F.; NAGAI, M.; ITO, M.; MATSUDA, T.; TAKAI, H.; JINKAWA, Y.; SHIMANO, T.; HAYASHI, M.; SEKI, Y.; SAKODA, Y.; SUGIURA, K.; AKASHI, H. Reactivity and prevalence of neutralizing antibodies against Japanese strains of bovine viral diarrhea virus subgenotypes. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, doi:10.1016/j.cimid.2009.10.007. 2009.

MOENNIG, V.; PLAGEMANN, P.G.W. The pestiviruses. **Advances Virus Research**, Academic Press, v.41, p.53-98, 1992.

NAGAI, M.; HAYASHI, M.; ITOU, M.; FUKUTOMI, T.; AKASHI, H.; KIDA, H.; SAKODA, Y. Identification of new genetic subtypes of bovine viral diarrhea virus genotype 1 isolated in Japan. **Virus Genes**, v.36, n.1, p.135-139. 2008.

NJAA, B.L.; CLARK, E.G.; JANZEN, E.; ELLIS, J.A.; HAINES, D.M. Diagnosis of persistent bovine viral diarrhea virus infection by immunohistochemical staining of formalin-fixed skin biopsy specimens. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.12, n.5, p.393-399, 2000.

NORONHA, R.P.; CAMPOS, G.S.; SARDI, S.I. Pesquisa do vírus da diarréia viral bovina em bovinos jovens. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.40, p.424-430, 2003.

OLIVEIRA, E.A.S. Caracterização antigênica de amostras de vírus da diarréia viral bovina com anticorpos monoclonais. Dissertação de Mestrado em Ciências Veterinárias – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 59 p.1996.

PASSLER, T.; WALZ, P.H. Bovine viral diarrhea virus infections in heterologous species. **Animal Health Research Reviews**, v.3, p.1-5, 2009.

PATON, D.; SANDS, J.; ROEHE, P. M. BVD Monoclonal Antibodies: Relationship Between Viral Protein Specificity By Radioimmunoprecipitation And Viral Strain Specificity By Peroxidase Linked Assay. **Archives of Virology**, Austria, v.23, n.3, p.47-54, 1991.

PATON, D.J.; MCGOLDRICK, A.; GREISER-WILKE, I.; PARCHARIYANON, S.; SONG, J.Y.; LIOU, P.P.; STADEJEK, T.; LOWINGS, J.P.; BJORKLUND, H.

BELÁK, S. Genetic typing of classical swine fever virus. **Veterinary Microbiology**, v.73, p.137–157. 2000.

PETERAHNS, E.; SCHWEIZER, M. Pestiviruses: How to outmaneuver your hosts. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.142, p.18-25, 2010.

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

POLETTO, R.; KREUTZ, L.C.; GONZÁLES, J.C.; BARCELLOS, L.J.G. Prevalência de tuberculose, brucelose e infecções víricas em bovinos leiteiros do município de Passo Fundo, RS. **Ciência Rural**, v.34, n.2, p.595-598, 2004.

POTGIETER, L.N.D. Bovine viral diarrhoea and mucosal disease. In: Coetzer, J.A.W.; Tustin, R.C. *Infectious Diseases of Livestock*. 2nd ed. Cape Town: Oxford University, 2004, v.2, p.946-969.

PRESI, P.; HEIM, D. BVD eradication in Switzerland-A new approach. **Veterinary Microbiology**, v.142, p.137-142, 2010.

QUINCOZES, C.G.; FISCHER, G.; HÜBNER, S. O.; VARGAS, G. D.; VIDOR, T.; BROD, C.S. Prevalência e fatores associados à infecção pelo vírus da diarreia viral bovina na região Sul do Rio Grande do Sul. **Semina: Ciências Agrárias**, v.28, n.2, p.269-276, 2007.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.; BLOOD, D.C.; HINCHCLIFF, K.W. Diarreia viral bovina, doença das mucosas, complexo doença pestivirus bovino, p.974-993. In: ____ (ed.), *Clínica Veterinária: um tratado de doenças de bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos*. 9ª ed. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 2002.

RADOSTITS, O. M. *et al.* Bovine virus diarrhea, mucosal disease, bovine pestivirus disease complex. In: *Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. 10th ed. Philadelphia:Saunders Elsevier, p.1248-1276, 2007.

RADWAN, G.S.; BROCK, K.V.; HOGAN, J.S.; SMITH, K.L. Development of a PCR amplification assay as a screening test using bulk milk samples for identifying dairy herds infected with bovine viral diarrhoea virus. **Veterinary Microbiology**, v.44, p.77–91, 1995.

RAUE, R.; HARMMEYER, S.; NANJIANI, I.A. Antibody responses to inactivated vaccines and natural infection in cattle using bovine viral diarrhoeavirus ELISA kits: Assessment of potential to differentiate infected and vaccinated animals. **The Veterinary Journal**, doi:10.1016/j.tvjl.2009.12.013. 2010.

REED, L.S. & MÜENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent end points. **American Journal of Hygiene**, v. 27, p. 493-7, 1938.

REINHARDT, G.; CARRASCO, L.; TADICH, N.; RIEDEMANN, S. Comparación entre dos técnicas de diagnóstico para diarrea viral bovina (DVB) en 50 predios de la X región, Chile. Seroneutralization y enzimoimmunoensayo indirecto (ELISA-I). **Archives of Medicine Veterinary**, v.33, n.2, p.1-15, 2001.

RENSHAW, R.W; RAY, R.; DUBOVI, E.J. Comparison of virus isolation and reverse transcription polymerase chain reaction assay for detection of bovine viral diarrhea virus in bulk milk tank samples. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.12, n.2, p.184-6, 2000.

RIDIPATH, J.F. Classification and molecular biology. In: GOYAL, S.M & RIDPATH, J.F. (Eds) *Bovine Viral Diarrhea Virus: Diagnosis, management and control*. Iowa:Blackwell Publishing, 2005, cap.3, p.65-80.

RIDIPATH, J.F. Classification and molecular biology. In: GOYAL, S.M & RIDPATH, J.F. (Eds) *Bovine Viral Diarrhea Virus: Diagnosis, management and control*. Iowa:Blackwell Publishing, 2005, cap.3, p.65-80.

RIDPATH, J.F. BVDV genotypes and biotypes: practical implications for diagnosis and control. **Biologicals**, v.31, n.2, p.127-131, 2003.

RIDPATH, J.F.; HIETALA, S.K.; SORDEN, S.; NEILL, J.D. Evaluation of the reverse transcription-polymerase chain reaction/probe test serum samples and immunohistochemistry of skin section for detection of acute bovine viral diarrhea infections. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.14, n.4, p.303-307, 2002.

RIDPATH, J.F.; BOLIN, S.R.; DUBOVI, E.J. Segregation of Bovine Viral Diarrhea Virus into Genotypes. **Virology**, v.205, n.1, p.56-74, 1994.

RIDPATH, J.F.; FLORES, E.F. Flaviviridae. In: FLORES, E.F. (Org) *Virologia Veterinária*. Santa Maria: UFSM, 2007, cap.22. p.563-592.

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

ROSSMANITH, W. Voluntary and compulsory eradication of bovine viral diarrhoea virus in Lower Austria. **Veterinary Microbiology**, v.142, p.143-149, 2010.

SALIKI, J.T.; FULTON, R.W.; HULL, S.R.; DUBOVI, E.J. Microtiter virus isolation and enzyme immunoassays for detection of bovine viral diarrhea virus in cattle serum. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, p.803-807, 1997.

SALIKI, J.T.; DUBOVI, E.J. Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhea virus infections. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.20, n.1, p.69-83, 2004.

SANDVIK, T. Progress of control and prevention programs for bovine viral diarrhoea virus in Europe. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.20, p.151-69. 2004.

SANDVIK, T. Laboratory diagnostic investigation for bovine viral diarrhoea virus in cattle. **Veterinary Microbiology**, v.64, n.2-3, p.123-134, 1999.

SANDVIK, T. Selection and use of laboratory diagnostic assays in BVD control programmes. **Preventive Veterinary Medicine**, v.72, n.1-2, p.3-16, 2005.

SANTOS, A. Caracterização Clínica, Patológica e Molecular da Infecção pelo Vírus da Diarreia Viral Bovina Tipo 2 Não-Citopático em Propriedade do Rio Grande do Sul. Dissertação de Mestrado, Faculdade Federal do Rio Grande do Sul, 2010, p.35.

SAUNDERS, G.C. Development and evaluation of an enzyme-labeled antibody test for rapid detection of hog cholera antibodies. **American Journal of Veterinary Research**, v.38, n.1. p 21-25. 1977.

SCHIRRMIEIER, H.; STREBELOW, G.; DEPNER, K.; HOFFMANN, B.; BEER, M.; Genetic and antigenic characterization of atypical pestivirus isolate, a putative member of a novel pestivirus species. **Journal of General Virology**, v.85, p.3647-3652, 2004.

STAHL, K.; KAMPA, J.; ALENIUS, S.; PERSSON WADMAN, A.; BAULE, C.; AIUMLAMAI, S.; BELÁK, S. Natural infection of cattle with an atypical 'HoBi'-like pestivirus - Implications for BVD control and for the safety of biological products. **Veterinary Research**, v.38, n.3, p.517-523, 2007.

STALDER, H.P.; MEIER, P.; PFAFFEN, G.; WAGECK-CANAL, C.; RÜFENACHT, J.; SCHALLER, P.; BACHOFEN, C.; MARTI, S.; VOGT, H.R.; PETERHANS, E. Genetic heterogeneity of pestiviruses of ruminants in Switzerland. **Preventive Veterinary Medicine**, v.45, p.354-358, 2005.

STHAL, K.; BENITO, A.; FELMER, R.; ZUÑIGA, J.; REINHARDT, G.; RIVERA, H.; BAULE, C.; MORENO-LÓPEZ, J. Genetic diversity of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) from Peru and Chile. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.29, n.1, p.41-44, 2009.

SYNGE, B.A.; CLARK, A.M.; MOAR, J.A.; NICOLSON, J.T.; NETTLETON, P.F.; HERRING, J.A. The control of bovine virus diarrhoea virus in Shetland. **Veterinary Microbiology**, v.64, n.2-3, p.223-229, 1999.

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

TEIXEIRA, M.F.B.; ESTEVES, P.A.; COELHO, C.S.S.; SILVA, T.C.; THIEL, H.J.; PLAGEMANN, P.G. W.; MOENNIG, V. Pestiviruses. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (eds.) *Fields Virology* (3rd ed.), Philadelphia: Lippincott-Raven Co., p.1059-1074, 1996.

- THOMPSON, J.A.; LEITE, R.M.H.; GONÇALVES, V.S.P.; LEITE, R.C.; BANDEIRA, D.A.; HERRMANN, G.P.; MOREIRA, E.C.; PRADO, P.E.F.; LOBATO, Z.I.P.; BRITO, C.P.T.; LAGE, A.P. Spatial hierarchical variances and covariances for seroprevalence to *Leptospira interrogans* serovar hardjo, BoHV-1 and BVDV for cattle in the State of Paraíba, Brasil. **Preventive Veterinary Medicine**, v.76, p.290-301, 2006.
- THURMOND, M.C. Virus Transmission. In: GOYAL, S.M.; RIDPATH, J.F. (Eds) Bovine Viral Diarrhea Virus: Diagnosis, management and control. Iowa: Blackwell Publishing, 2005, cap.5, p.91-104.
- UTTENTHAL, A.; STORGAARD, T.; OLEKSIEWICK, M.B.; DE STRICKER, K. Experimental infection with the Paderbon isolate of classical swine fever virus in 10-week-old pigs: determination of viral replication kinetics by quantitative RT-PCR, virus isolation and antigen ELISA. **Veterinary Microbiology**, v.92, p.197-212, 2003.
- VAN CAMPEN, H. Epidemiology and control of BVD in the U.S. 2009. **Veterinary Microbiology**, V.142, p.94-98, 2010
- VAN OIRSCHOT, J.T. Diva vaccines that reduce virus transmission. **Journal of Biotechnology**, v.73, p.195-205, 1999.
- VAN REGENMORTEL, M.H.V.; MAHY, B.W.J. Emerging Issues in Virus Taxonomy. **Emerging Infectious Diseases**, v.10, p.8-13, 2004.
- VIET, A.F.; FOURICHON, C.; SEEGER, H. Review and critical discussion of assumptions and modeling options to study the spread of the bovine viral diarrhoea virus (BVDV) within a cattle herd. **Epidemiology and Infections**, v.135, n.5, p.706-721, 2007.
- VILCEK, S.; RIDPATH, J.F.; VAN CAMPEN, H.; CAVENDER, J.L.; WARG, J. Characterization of a novel pestivirus originating from a pronghorn antelope. **Virus Research**, v.108, n.1-2, p.187-193, 2005.
- VILCEK, S.; HERRING, A.J.; HERRING, J.A.; NETTLETON, P.F.; LOWINGS, J.P.; PATON, D.J. Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. **Archives of Virology**, v.136, p.309-323, 1994.
- VILCEK, S.; NETTLETON, P.F. Pestiviruses in wild animals. **Veterinary Microbiology**, v.116, n.1-3, p.1-12, 2006.
- VILCEK, S.; PATON, D.J.; DURKOVIC, B.; STROJNY, L.; IBATA, G.; MOUSSA, A.; LOITSCH, A.; ROSSMANITH, W.; VEJA, S.; SCICLUNA, M.T.; PALFI, V. Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups. **Archives of Virology**, v.146, n.1, p.99-115, 2001.
- VILCEK, S.; URKOVI, B.; KOLESAROVA, M.; GREISER-WILKE, I.; PATON, D. Genetic diversity of international bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates:

identification of a new BVDV-1 genetic group. **Veterinary Research**, v.35, p.609–615, 2004.

VOGEL, F.S.F.; SCHERER, C.F.C.; FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; LIMA, M.; KUNRATH, C.F. Resposta sorológica e avaliação de proteção fetal em ovelhas prenhes vacinadas contra o vírus da diarréia viral bovina (BVDV). **Ciência Rural**, v.31, n.5, p.831-838, 2001.

WALZ, P.H.; BELL, T.G.; STEFICEK, B.A.; KAISER, L.; MAES, R.K.; BAKER, J.C. Experimental model of type II bovine viral diarrhea virus-induced thrombocytopenia in neonatal calves. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.11, n.6, p.505-514, 1999.

XUE, W.; MATTICK, D.; SMITH, L.; MAXWELL, J. Fetal protection against bovine viral diarrhea virus type 1 and 2 after the use of a modified-live virus vaccine. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v.73, n.4, p.292-297, 2009.

YESILBAG, K.; FÖRSTER, C.; BANK-WOLF, B.; YILMAZ, Z.; ALKAN, F.; OZKUL, A.; BURGU, I.; ROSALES, S.C.; THIEL, H.J.; KÖNIG, M. Genetic heterogeneity of bovine viral diarrhea virus (BVDV) isolates from Turkey: Identification of a new subgroup in BVDV-1. **Veterinary microbiology**, v.130, p.258-267, 2008.

YOUNG, N.J.; THOMAS, C.J.; COLLINS, M.E.; BROWNLIE, J. Real-time RT-PCR detection of Bovine Viral Diarrhoea virus in whole blood using an external RNA reference. **Journal of Virology Methods**, v.138, p.218-222, 2006.

ANEXO