

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**POLIANA DE OLIVEIRA FIGUEIREDO**

**DETECÇÃO E EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE DOENÇAS  
VESICULARES NO BRASIL**

**Belo Horizonte, Fevereiro de 2015**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**POLIANA DE OLIVEIRA FIGUEIREDO**

**DETECÇÃO E EPIDEMIOLOGIA DE DOENÇAS VESICULARES NO BRASIL**

Dissertação apresentada  
ao Programa de Pós-Graduação em  
Microbiologia do Instituto de Ciências  
Biológicas da Universidade Federal  
de Minas Gerais

**Orientadora:** Giliane de Souza Trindade

**Colaboradores:** Danilo Bretas de Oliveira

Pedro Augusto Alves

**Belo Horizonte, Fevereiro de 2015**

## **AGRADECIMENTOS**

O fim de cada etapa na vida representa a renovação de expectativas e a certeza de que conquistas não são frutos apenas de esforços individuais. Seria impossível chegar até aqui sem a presença, apoio e a paciência dos meus familiares e amigos.

Agradeço em especial ao meu pai e minha mãe pelo amor, seriedade, compreensão, dedicação e pelo apoio incondicional. A todos os familiares por torcerem por mim sempre!

Aos meus amigos, pelo carinho, companheirismo e por estarem sempre presentes na minha vida.

À minha orientadora Giliane pelos ensinamentos que vão muito além da virologia, por acreditar na minha capacidade e no meu crescimento profissional e pessoal. Obrigada pela atenção e por toda orientação recebida, pelo apoio e seriedade profissional.

Aos professores e colegas do Laboratório de vírus pela companhia, aprendizado e convivência diária.

Ao Danilo e Pedro pelos ensinamentos, paciência e disponibilidade. À Leandra pela atenção ao revisar a dissertação e por estar sempre disposta a ensinar e ajudar.

A todos aqueles que direta ou indiretamente colaboraram na execução deste trabalho.

À CAPES, CNPq e FAPEMIG, pelo auxílio financeiro, sem o qual seria impossível a execução deste projeto.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>VII</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>XI</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>XIII</b>
<b>1.0 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2.0 VIRUS RELACIONADOS À DOENÇAS VESICULARES</b> .....	<b>2</b>
2.1.0 <i>Bovine viral Diarrhea virus</i> (BVDV).....	2
2.1.1 Estrutura Genética.....	2
2.1.2 Segregação de BVDV em genótipos e subgenótipos.....	3
2.1.3 Epidemiologia.....	5
2.1.4 Patologias associadas ao BVDV.....	11
2.2.0 <i>Vesicular stomatitis virus</i> (VSV).....	13
2.2.1 Estrutura genética .....	14
2.2.2 Epidemiologia.....	17
2.2.3 Patologia associada ao VSV .....	18
2.3.0 Bovine herpesvirus .....	22
2.3.1 Estrutura Genética.....	23
2.3.2 Epidemiologia.....	26
2.3.2 Subgenótipos de BoHV e patologias associadas.....	30
2.3.2.1 <i>Bovine herpesvirus 1</i> (BoHV 1) .....	31
2.3.2.2 <i>Bovine herpesvirus 5</i> (BoHV-5).....	31
2.3.2.3 <i>Bovine herpesvirus 2</i> (BoHV-2).....	32

<b>3.0 DIAGNÓSTICO DAS DOENÇAS VESICULARES</b> .....	33
<b>4.0 JUSTIFICATIVA</b> .....	35
<b>5.0 OBJETIVOS</b> .....	37
5.1 Objetivos gerais.....	37
5.2 Objetivos específicos.....	<u>37</u>
<b>6.0 ESTRATÉGIA DE TRABALHO</b> .....	38
<b>7.0 METODOLOGIA</b> .....	39
7.1 Banco de amostras .....	39
7.2 Diluição das amostras .....	43
7.3 Fracionamento das células sanguíneas para obtenção de PBMCs .....	43
7.4 Extração de DNA.....	43
7.5 Extração de RNA total .....	44
7.6 Transcrição reversa.....	44
7.6.1 transcrição reversa com iniciadores específicos .....	45
7.7.0 Triagem das amostras de crosta e soro por PCR em tempo real.....	45
7.8 Padronização da qPCR para detecção de BVDV em PBMC .....	47
7.9 Padronização da qPCR para detecção de VSV em PBMC .....	47
7.10 Padronização da qPCR para detecção de BoHV 1/5 em PBMC .....	47
7.11 Critério para análise das reações de qPCR .....	48
7.12 Controles usados nas reações de PCR em tempo real.....	48
7.13 PCR convencional .....	48
7.14 PCR convencional com enzima taq hot start.....	51
7.15 Padronização da PCR convencional pra detecção de BVDV em PBMC .....	51
7.16 Controles usados nas reações de PCR convencional.....	52
7.17 Fracionamento dos produtos de PCR por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) .....	52
7.18 Extração de produtos de PCR a partir de gel de poliacrilamida .....	53
7.19 Purificação dos produtos de PCR a partir de gel de poliacrilamida .....	53
7.20 Sequenciamento e inferências filogenéticas .....	53

8.0 Resultados para BVDV.....	54
8.1.0 Padronização da transcrição reversa .....	54
8.1.2 qPCR em amostras de soro e crostas.....	57
8.1.3 Padronização da qPCR para matriz de PBMC .....	57
8.1.4 Padronização da PCR convencional para triagem dos PBMCs .....	60
8.1.5 Triagem das amostras de PBMC.....	61
8.1.6 PCR convencional para sequenciamento.....	62
8.1.7 Resultados epidemiológicos.....	63
8.1.8 Inferências filogenéticas .....	65
8.2.0 Resultados para VSV .....	67
8.2.1 qPCR para triagem de soros e crostas.....	67
8.2.2 Padronização da qPCR para detecção de VSV em PBMC .....	67
8.2.3 Padronização da PCR convencional para caracterização de VSV .....	73
8.2.4 PCR, sem controles, para detecção de VSIV1, VSIV2 e VSIV 3.....	76
8.2.5 Resultados epidemiológicos.....	77
8.3.0 Resultados para BoHV 1/5 .....	78
8.3.1 qPCR das amostras de soro e crosta para detecção de BoHV1/5 em PBMC .....	79
8.3.2 Padronização da qPCR para detecção de BoHV1/5 em PBMCs .....	79
8.3.3 Padronização da PCR convencional para caracterização de BoHV 1/5.....	81
8.3.4 Resultados epidemiológicos.....	83
8.4.0 Detecção de BoHV-2.....	84
8.5.0 Co infecções.....	84
<b>9.0 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO.....</b>	<b>88</b>
<b>10.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>94</b>
<b>11.0 ANEXO.....</b>	<b>106</b>

## LISTA DE FIGURAS

**FIGURA 1:** Organização genômica do BVDV

**FIGURA 2:** Subgenótipos de BVDV-1 e BVDV-2

**FIGURA 3:** Organização genômica do VSV

**FIGURA 4:** Lesões provocadas pelo VSV em bovinos

**FIGURA 5:** Organização genômica dos *Alphaherpesvirus*

**FIGURA 6:** Distribuição geográfica das amostras analisadas

**FIGURA 7:** Padronização da transcrição reversa para detecção de BVDV a partir de PBMC

**FIGURA 8:** Comparação da eficiência transcrição reversa na qPCR e PCR convencional

**FIGURA 9:** Perfil de amostra de soro positivo para BVDV na qPCR

**FIGURA 10:** Perfil da qPCR na matriz de PBMC com contaminação deliberada por BVDV e sem contaminação

**FIGURA 11:** Avaliação da quantidade inicial de cDNA de PBMC na qPCR

**FIGURA 12:** Produto da reação de qPCR separado por eletroforese em gel de agarose 2%

**FIGURA 13:** Gradiente de temperatura de pareamento dos iniciadores usados na PCR convencional

**FIGURA 14:** Perfil geral das amplificações dos PBMCs na PCR convencional para detecção de BVDV

**FIGURA 15:** Produtos da PCR convencional a partir de fragmentos extraídos de gel de poliacrilamida 8%.

**FIGURA 16:** Positividade total e por matriz de detecção para BVDV

**FIGURA 17:** Positividade de BVDV por Estado

**FIGURA 18:** Positividade de BVDV na matriz PBMC por local de coleta em Minas Gerais

**FIGURA 19:** Inferência filogenética para BVDV

**FIGURA 20:** Perfil de amostra de soro positiva para VSV

**FIGURA 21:** Perfil da qPCR na matriz de PBMC com contaminação deliberada por VSV e sem contaminar

**FIGURA 22:** Perfil de diferentes diluições do VSV na qPCR

**FIGURA 23:** Influência da quantidade de cDNA de PBMC na qPCR para detecção de VSV

**FIGURA 24:** Resultado de qPCR para detecção de VSV a partir de cDNA de PBMC com iniciadores para região da nucleoproteína

**FIGURA 25:** Resultado da qPCR para detecção de VSV a partir de cDNA de PBMC com iniciadores para a polimerase

**FIGURA 26:** Resultado de qPCR para detecção de VSV a partir de cDNA de PBMC com iniciadores para a nucleoproteína descrito por Hole *et al.*, 2006



**FIGURA 27:** Produtos da qPCR com diferentes iniciadores para detecção de VSV a partir de PBMC

**FIGURA 28:** Produto do gradiente de temperatura e variação da concentração de iniciadores para detecção de VSV por PCR convencional

**FIGURA 29:** Produto da PCR resultante de variações na concentração de magnésio, de iniciadores e temperatura de pareamento para detecção de VSV

**FIGURA 30:** Produto da PCR para detecção de VSIV2

**FIGURA 31:** Positividade total e por matriz de detecção para VSV

**FIGURA 32:** Positividade de VSV por Estado

**FIGURA 33:** Perfil de amostra de soro positiva para BoHV 1/5 na qPCR.

**FIGURA 34:** Avaliação da quantidade de DNA de PBMC na qPCR para detecção de BoHV1/5

**FIGURA 35:** Perfil de amplificação da qPCR na matriz de PBMC contaminado deliberadamente por diferentes quantidades de BoHV

**FIGURA 36:** Produto da PCR resultante do gradiente de temperatura dos iniciadores para caracterização de BoHV1/5.

**FIGURA 37:** Gradiente de temperatura dos iniciadores na matriz soro para caracterização de BoHV1/5

**FIGURA 38:** Positividade Total e por matriz de detecção para BoHV1/5

**FIGURA 39:** Positividade de BoHV 1/5 por Estado

**FIGURA 40:** Detecção de co-infecções

**FIGURA 41:** Positividade e distribuição geográfica de BVDV, VSV, BoHV-1, BoHV-2 e BoHV-5 no Brasil nos anos de 2012 a 2014

## **LISTA DE TABELAS**

**TABELA 1:** Levantamento bibliográfico das regiões gênicas utilizadas para caracterização molecular e inferências filogenéticas de BVDV

**TABELA 2:** Distribuição mundial e hospedeiros de BVDV

**TABELA 3:** Estudos sorológicos de BVDV no Brasil

**TABELA 4:** Levantamento bibliográfico das regiões gênicas utilizadas para detecção e inferências filogenéticas de VSV

**TABELA 5:** VSV isolados no Brasil

**TABELA 6:** Levantamento bibliográfico das regiões gênicas utilizadas para detecção e filogenia de BoHV1/5

**TABELA 7:** Estudos sorológica de BoHV-1 no Brasil

**TABELA 8:** Características dos iniciadores utilizados na reação de PCR em tempo real

**TABELA 9:** Condições das reações de PCR convencional

**TABELA 10:** Reagentes e condições utilizadas na PCR com a enzima Taq Hot Start

## LISTA DE ABREVIATURAS

A – Adenina  
BDV - *Border disease virus*,  
BHM – mamilite herpética bovina  
BoHV-1 – *Bovine herpesvirus 1*  
BoHV-2 – *Bovine herpesvirus 2*  
BoHV-5 – *Bovine herpesvirus 5*  
BVDV-1 – *Bovine viral diarrhea virus 1*  
BVDV-2 – *Bovine viral diarrhea virus 2*  
BVDV-3 – *Bovine viral diarrhea vírus 3*  
C – Citosina  
°C – graus Celsius  
cDNA – DNA complementar  
CI – Controle interno  
CO<sub>2</sub> – Dióxido de Carbono  
COCV – Cocal virus  
CSFV – *Classical swine fever virus*  
Ct – Cycle threshold  
DNA – Ácido desoxirribonucléico  
dNTP – desoxirribonucleotídeos fosfatados  
ECP – Efeito citopático  
EDTA – ácido etilenodiaminotetracético  
ELISA – Enzyme-linked immunosorbent assay  
fg - fentograma  
g – grama  
G – Guanina  
h – hora  
ICB – Instituto de Ciências Biológicas  
ICTV – *International Committee on Taxonomy of Viruses*  
kb - quilobases  
KCl – Cloreto de potássio  
M – Molar

MEM – Meio mínimo essencial de Eagle  
MG- Minas Gerais  
MgCl<sub>2</sub> – Cloreto de Magnésio  
min – minuto  
mL – mililitro  
mM – micro Molar  
M-MLV – *Moloney Murine Leukemia Virus*  
NaCl – Cloreto de Sódio  
NaHCO<sub>3</sub> – Bicarbonato de sódio  
NCP – não citopático  
N<sup>pro</sup> – autoprotease N terminal  
NS2-3 - segunda e terceira proteínas não estruturais fundidas  
NS4- quarta proteína não estrutural  
NS5- porção amino-carboxi terminal da quinta proteína não estrutural (NS5)  
ng – nanograma  
ng/μL – nanogramas/microlitro  
nm – nanômetro  
nM – nanomolar  
OIE - Organização Internacional das Epizootias  
OMS – Organização Mundial de Saúde  
OPV - *Orthopoxvirus*  
ORF – região aberta de leitura  
p/v – peso/volume  
PANAFTOSA – Centro Pan-Americano de Febre Aftosa  
pb – pares de bases  
PBS – Tampão salina fosfato  
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase  
pH – Potencial hidrogeniônico  
PI – Persistentemente infectados  
qPCR- reação em cadeia da polimerase quantitativa  
RIB – Rinotraqueíte Infecciosa Bovina  
RIB/VPI – vulvovaginite pustular infecciosa  
RNA – Ácido ribonucléico

RNAm – RNA mensageiro  
RPM – rotações por minuto  
RT – Transcrição Reversa  
s - segundo  
T – Timina  
T<sub>m</sub> – Temperatura de *Melting*  
U - Unidades  
U/μL – unidades/microlitro  
U/mL – unidades/mililitro  
UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais  
UFSM – Universidade Federal de Santa Maria  
UTR – *untranslated region*  
V – Volt  
VSAV – Vesicular stomatitis Alagoas virus  
VSIV – *Vesicular stomatitis Indiana virus*  
VSNJV – *Vesicular stomatitis New Jersey virus*  
VSV – *Vesicular stomatitis virus*  
YFV – *Yellow fever virus*  
5'UTR- 5' não traduzida  
μg/mL – microgramas/mililitro  
μg – micrograma  
μL - microlitro  
pmol/μL – picomol/microlitro

## RESUMO

No Brasil, a bovinocultura é uma atividade em franca expansão e o país tem posição de destaque mundial na produção e exportação de derivados bovinos. Entretanto, muitas doenças vesiculares de etiologia viral podem afetar rebanhos de produção, com destaque para diarreia bovina viral, estomatite vesicular e herpes bovina, as quais apresentam sintomatologia muito parecida entre si e também com a febre aftosa, que é altamente contagiosa e provoca enormes prejuízos econômicos e sociais. Dados sobre a circulação de *Bovine viral diarrhoea virus (BVDV)*, *Vesicular stomatitis virus (VSV)*, *Bovine herpesvirus 1 (BoHV-1)*, *Bovine herpesvirus 2 (BoHV-2)* e *Bovine herpesvirus 5 (BoHV-5)* ainda são escassos no Brasil e os poucos disponíveis são principalmente de estudos sorológicos retrospectivos. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi realizar um estudo epidemiológico molecular para detecção e caracterização dos genótipos e subgenótipos mais frequentes desses vírus nos estados de Minas Gerais, Bahia, Espírito Santo e Goiás nos anos de 2012 a 2014. A triagem foi realizada por uma plataforma de diagnóstico molecular por qPCR, seguida da PCR convencional e seqüenciamento. Foram detectados 32% (77/240) de positividade para BVDV, com a maior detecção em Minas Gerais e todas as quatro amostras caracterizadas agrupadas no subgenótipo BVDV-1a. Para VSV 13%, e para *BoHV-1/5*, 8% das amostras foram positivas, sendo em ambos a maioria dos animais provenientes do Espírito Santo. Não foram diagnosticadas amostras positivas para BoHV-2. Casos de co-infecções de BVDV e VSV foram detectados em quatro animais, dois foram positivos para BVDV e BoHV-1/5 e em três bovinos foram detectados VSV e BoHV1/5, simultaneamente.

**Palavras-chave:** epidemiologia molecular, *Bovine viral diarrhoea virus*, *Vesicular stomatitis virus*, *Bovine herpesvirus 1*, *Bovine herpesvirus 2* e *Bovine herpesvirus 5*.

## ABSTRACT

In Brazil, cattle raising is a growing activity and the country holds the world's premier position in the production and exportation of bovine derivatives. Many vesicular diseases caused by viruses can affect livestock production, especially bovine viral diarrhea, vesicular stomatitis and bovine herpes, which present very similar symptoms and with foot and mouth disease, which is highly contagious and causes great economic and social losses. Despite of the wide detrimental effects of these viruses on Brazilian livestock, data about circulation of *Bovine viral diarrhea virus (BVDV)*, *Vesicular stomatitis virus (VSV)*, *Bovine herpesvirus 1(BoHV-1)*, *Bovine herpesvirus 2 (BoHV-2)* e *Bovine herpesvirus 5 (BoHV-5)* are still scarce and the few available data are mainly retrospective serologic studies. Thus, the objective of this study was to perform a molecular epidemiological study for detection and characterization of the most frequent genotypes and subgenotypes in the states of Minas Gerais, Bahia, Espírito Santo and Goiás in the years of 2012 to 2014. Screening was carried out by the use of a qPCR molecular diagnostics platform, followed by conventional PCR and sequencing for characterization. It was detected 32% (77/240) of positivity for BVDV, being the most frequent detection in Minas Gerais and the totality of characterized samples grouped in BVDV-1a subgenotype. For VSV, 13% (18/142) of the samples were positive and for BoHV- 1/5, 8%, and in both cases the majority of these animals were from Espírito Santo state. There were no positive samples diagnosed for BoHV-2. Cases of co-infections with BVDV and VSV were found in four animals, two animals were positive for BVDV and BoHV-5 and in three samples both VSV and BoHV1/5 were detected.

**Key words:** molecular epidemiology, *Bovine viral diarrhea virus*, *Vesicular stomatitis virus*, *Bovine herpesvirus 1*, *Bovine herpesvirus 2* e *Bovine herpesvirus 5*.





## 1.0 INTRODUÇÃO

Segundo dados da ABIEC (Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne), o Brasil é um dos maiores exportadores de carne bovina no mundo, exportando para mais de 170 países. A extensão territorial, condições climáticas, programas voltados para a sanidade animal e segurança do alimento o posicionam como um dos maiores produtores de carne bovina com potencial para atender as exigências específicas de mercado. No entanto, um fator importante que ainda interfere negativamente nos os rebanhos brasileiros são as doenças vesiculares infecciosas. Entre os agentes virais que causam essas doenças pode-se destacar o *Bovine viral diarrhea virus*, *Vesicular stomatitis vírus*, *Bovine herpesvirus 1*, *Bovine herpesvirus 2* e *Bovine herpesvirus 5*. Estas doenças têm sintomatologia semelhante, o que dificulta o diagnóstico clínico, além de apresentarem grande semelhança com a febre aftosa, que é altamente contagiosa e provoca enormes prejuízos econômicos e sociais. Portanto, pela legislação nacional, todo caso suspeito de doença vesicular, independentemente de sua origem, deve ser notificado e investigado pelo serviço veterinário oficial em um prazo de até doze horas (§ 3º, art. 4º, Instrução Normativa nº 44, de 2 de outubro de 2007).

Apesar do grande impacto que provocam na bovinocultura brasileira, dados sobre a circulação dos agentes virais associados às doenças vesiculares em bovinos ainda são escassos. Os poucos estudos disponíveis compreendem principalmente estudos sorológicos retrospectivos, ficando, então, o conhecimento acerca da caracterização molecular dos agentes e sua respectiva distribuição espacial e temporal bastante negligenciado.

## 2.0 VIRUS RELACIONADOS A DOENÇAS VESICULARES

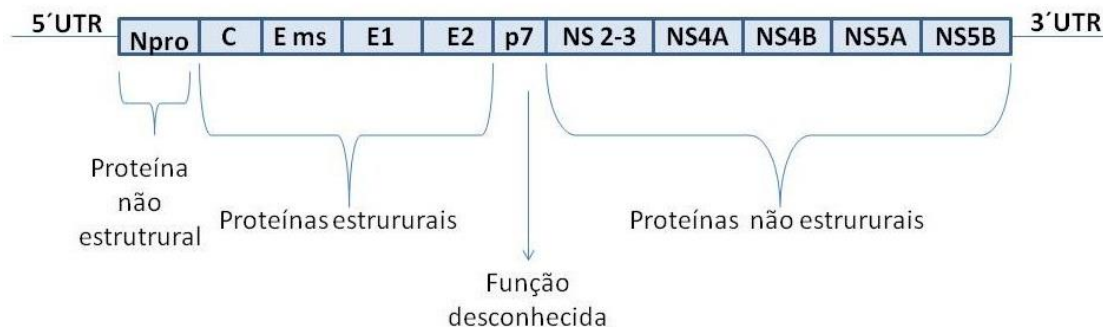
### 2.1.0 *Bovine viral diarrhoea virus (BVDV)*

As infecções pelo *Bovine viral diarrhoea virus (BVDV)* são endêmicas em populações de bovinos em todo o mundo, resultando em grandes perdas econômicas devido a uma alta prevalência combinada com efeitos negativos sobre a reprodução e a condição geral de saúde dos rebanhos afetados (Ståhl e Alenius, 2012). Esse vírus apresenta genoma de RNA fita simples, polaridade positiva de aproximadamente 12,5 kb, é envelopado com morfologia esférica e atualmente classificado na família *Flaviviridae*, gênero *Pestivirus* (Collett *et al.*, 1988).

Além do BVDV, o gênero *Pestivirus* é composto por outros dois vírus antígenicamente relacionados: o vírus da peste suína clássica (*Classical swine fever virus*, CSFV) e o vírus da doença da fronteira, de ovinos (*Border disease virus*, BDV). Os *Pestivirus* podem ser classificados em citopáticos (CP) e não citopáticos (NCP), com base em seu padrão de multiplicação em linhagens celulares mantidas *in vitro*, sendo a grande maioria dos isolados de campo pertencentes ao biótipo NCP (Lindebach *et al.*, 2013).

#### 2.1.1 Estrutura Genética

O genoma do BVDV tem aproximadamente 12 kb e consiste em uma longa janela aberta de leitura (ORF) flanqueada por regiões 5' e 3' não traduzidas (Collett *et al.*, 1988). A ORF é traduzida em uma única poliproteína de aproximadamente 3.898 aminoácidos (Donis, 1995), sendo o genoma estruturado conforme esquematizado na figura seguinte:



**Figura 1. Organização genômica do BVDV.** Adaptado de Newcomer, 2013 (dissertação)

O genoma é composto por proteínas com funções estruturais a proteína do nucleocapsídeo (C), a ribonuclease solúvel do envelope glicoprotéico (Erns) que é específica dos pestivirus (Ridpath, 2010), a principal glicoproteína do envelope (E1) e a glicoproteína secundária do envelope (E2), que é imunodominante e responsável pela variação antigênica entre os isolados (Corapi, Donis e Dubovi, 1990).

As proteínas não estruturais compreendem as autoproteases amino-terminais (N<sup>pro</sup>), segunda e terceira proteínas não estruturais fundidas (NS2-3), porção amino-carboxi terminal da quarta proteína não estrutural (NS4) e a porção amino-carboxi terminal da quinta proteína não estrutural (NS5). Dentre estas, destaca se a (N<sup>pro</sup>) que é exclusiva dos Pestivirus e usada para comparação e caracterização inicial dos isolados de BVDV (Bauermann, Flores e Ridpath, 2012).

A região 5' não traduzida (5' UTR) apresenta aproximadamente 300 bases, sendo muito conservada entre os membros do gênero. Entre os genomas de BVDV a identidade de aminoácidos nessa região excede 90% (Ridpath e Bolin, 1995) e com base em estudos filogenéticos que analisam esta região, os BVDVs são divididos em genótipos e subgenótipos (Vilcek *et al.*, 2001).

### 2.1.2 Segregação de BVDV em genótipos e subgenótipos

De acordo com características genéticas e antigênicas, os isolados de BVDV podem ser divididos em BVDV genotipo 1 (BVDV-1) e BVDV genotipo 2 (BVDV-2) (Ridpath, Bolin e Dubovi, 1994). Os vírus pertencentes aos genótipos 1 abrangem a maioria das amostras

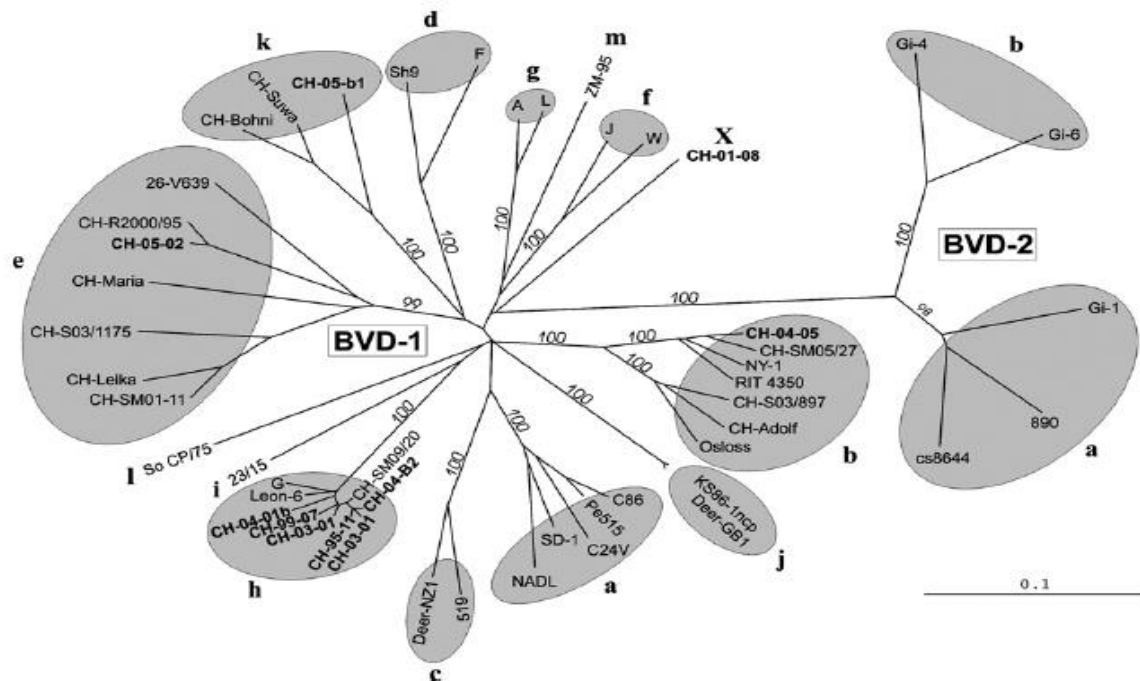
de referência, sendo os vírus usados em vacinas e que possuem baixa virulência. Já os vírus pertencentes ao genótipo 2 foram inicialmente isolados de surtos no Canadá em 1993-1994, mas incluem também os isolados de baixa e moderada virulência (Ridpath & Flores, 2007). O significado prático dessa diferenciação em genótipos foi evidenciado pela falta de vacinas e diagnósticos para controlar e detectar BVDV-2 visto que, a base para pesquisas se concentraram historicamente no BVDV-1 (Ridpath, 2010).

Embora as diferenças antigênicas possam ser usadas para diferenciação dos genótipos, a análise molecular é o critério mais confiável. As diferenças genômicas entre BVDV-1 e BVDV-2 podem ser encontradas ao longo de todo genoma (Ridpath e Bolin, 1995), no entanto as regiões 5'UTR e N<sup>pro</sup> são as mais usadas para a caracterização molecular e filogenia (tabela 1).

**Tabela 1. Levantamento bibliográfico das regiões gênicas utilizadas para caracterização molecular e inferências filogenéticas de BVDV**

Referência	Objetivo	Gene	Análise	Tamanho fragmento
Ridpath et al, 1994	Diferenciação BVDV-1 e BVDV-2	5' UTR	Amostras referência	303pb
Ridpath et al, 1998	Diferenciação BVDV-1 e BVDV-2	5'UTR	Amostras referência	282pb
Flores et al, 2002	Filogenia BVDV-2	5'UTR e NS2/3	Amostras referência	5'UTR: 268pb NS2/3: 561pb
Karl Stahl et al, 2007	Deteção e filogenia HoBi	5' UTR	Amostra campo	296 pb
Decaro et al, 2012	Nested PCR para identificação pestivirus	5'UTR, C (nucleocapsídeo) e N <sup>pro</sup>	Tecidos e fezes	501pb, 289 pb e 210 pb
Bachofen et al, 2013	Deteção	5'UTR	Soro e plasma	247 pb
Otonel et al, 2014	Análise diversidade e filogenia	5'UTR e N <sup>pro</sup>	Amostras campo	5'UTR – 290 pb N <sup>pro</sup> - 428 pb

A análise concomitante da região 5'UTR com outros genes, como a N<sup>pro</sup>, E2 e NS3 tem permitido classificar os isolados de BVDV-1 e 2 em subgrupos ou subgenótipos (Vilcek *et al.*, 2001). BVDV-1 pode ser subdividido em pelo menos 11 grupos indicados como tipos 1a, 1b, 1c, 1d, 1e, 1f, 1g, 1h, 1i, 1j e 1k (Vilcek *et al.*, 2001). Já BVDV- 2 é dividido em 2a e 2b.



**Figura 2: Subgenótipos de BVDV-1 e BVDV-2.** Análise baseada em 504 nucleotídeos da região N<sup>pro</sup>. Árvore foi construída pelo método Neighbour Joining, 1000 bootstrap (Bachofen *et al.*, 2008).

As classificações em subgenótipos ainda não possuem um significado clínico conhecido (Flores *et al.*, 2002). Entretanto, estudos têm mostrado diferenças antigênicas entre subgenótipos como, por exemplo, diferenças na neutralização cruzada, ligação de anticorpos monoclonais e resposta de animais com infecção persistente à vacinação (Fulton *et al.*, 2003). Assim, a diversidade genética dos isolados de BVDV não tem somente interesse acadêmico, mas também tem implicações práticas para a epidemiologia viral e para a produção de vacinas (Stahl *et al.*, 2009).

Em 2004, um novo *Pestivirus* foi isolado de soro fetal bovino oriundo do Brasil. Posteriormente foi isolado também em búfalo e bovinos persistentemente infectados (PI) na América do Sul e sudeste da Ásia. Devido a similaridades clínicas com BVDV-1 e BVDV2 e a capacidade de estabelecer persistência em bovinos, alguns pesquisadores sugeriram a criação de um novo grupo de vírus conhecido como BVDV-3 ou HoBi like vírus (Liu *et al.*, 2009).

### 2.1.3 Epidemiologia

O BVDV é o vírus mais prevalente em bovinos e por isso é alvo de uma série de programas de controle e erradicação em todo o mundo (Lanyon *et al.*, 2014). Nos últimos anos, a soroprevalência mundial variou de 18% a 93% (Guarino *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2008; Talafha *et al.*, 2009). O estado global desse vírus está em transição, assim, apesar dos programas de controle em alguns países, como Escandinávia estarem perto da erradicação, há uma detecção cada vez maior na América do Norte, sudeste asiático e África (Ridpath, 2010).

Com base em vários trabalhos já desenvolvidos, atualmente a distribuição geográfica e o espectro de hospedeiros dos genótipos estão conforme explicitado no quadro a seguir:

**Tabela 2- Distribuição mundial e hospedeiros de BVDV**

Distribuição mundial do BVDV		
Genótipo	Distribuição Geográfica	Hospedeiros
<b>BVDV-1</b>	Distribuição mundial Perto da erradicação em alguns países europeus, como Escandinávia	Ruminantes selvagens e domésticos, suínos e coelhos
<b>BVDV-2</b>	Distribuição mundial Predominância na América do Norte e Sul	Ruminantes selvagens e domésticos, suínos e coelhos
<b>BVDV 3</b>	América do Sul e Ásia	Bovinos

Distribuição geográfica dos genótipos e espectro de hospedeiros de BVDV. Tabela Baseado em Flores *et al.*, 2005 e Ridpath *et al.*, 2010. BVDV- 1 Bovine viral diarrhea vírus 1; BVDV-2 Bovine viral diarrhea vírus 2 ; BVDV-3 Bovine Viral Diarrhea Virus 3.

A prevalência de ambos os genótipos é variável. BVDV-2 representa aproximadamente 50% dos isolados na América do Norte, mas é pouco detectado na Europa, onde BVDV-1 é o genótipo predominante (Tajima *et al.*, 2001). Análise de vários isolados de países europeus tem mostrado que diferentes subgenótipos de BVDV-1 circulam em diferentes locais. Na Austrália já foram detectados BVDV-1b, 1d, 1f, 1g e 1h (Vilcek *et al.*, 1999), na Alemanha BVDV-1 a, 1b, 1c, 1d, 1f e 1g (Tajima *et al.*, 2001), na Itália BVDV-1b, 1d, 1e, 1f e 1h (Falcone *et al.*, 2003), no Reino Unido BVDV-1 a, 1b e 1i (Vilcek *et al.*, 1999) e na Espanha BVDV-1 a, 1c e 1h (Arias *et al.*, 2003).

A infecção e doenças associadas a esse vírus têm sido descritas no Brasil desde a década de 60 (Flores *et al.*, 2005). Diversos estudos sorológicos conduzidos em diferentes anos e regiões demonstram a prevalência e disseminação viral no rebanho de leite e corte do país. A tabela abaixo descreve vários estudos sorológicos conduzidos no Brasil e publicados no período de 1987 a 2012 e demonstram que nos últimos anos mais de 50% de rebanhos de diferentes estados brasileiros já foram expostos a esse vírus.



**Tabela 3- Estudos sorológicos de BVDV no Brasil**

Estudos sorológico de BVDV no Brasil					
Referência	Técnica	Ano	Estado	n	Soropositividade
Ribeiro et al., 1987	PRNT	1987	Bahia	1.618	14,0%
Figueiredo et al., 1997	PRNT	1997	Minas Gerais	287	61,5%
Richtzwhain et al., 1997	ELISA	1997	vários estados	2.448	MG (65%), MS (84%), PR (67%) SP (78%), RS (73%), RJ (71%)
Krahl et al., 1997	PRNT	1997	Rio grande do sul	1823	23,4%
Melo et al., 1997	PRNT	1997	Sergipe	102	64,7%
Guimarães <i>et al.</i> , 2001	ELISA/ PRNT	1997-1998	Goiás	207	ELISA(47,83%) PRNT (52,17%)
Canal et al., 1998	ELISA	1998	Rio grande do sul	430	56,0%
Brito., 2004	ELISA	1999	Goiás	184	15,8%
Noronha et al., 2001	PRNT	2000	Bahia	220	56,0%
Brito., 2004 *	ELISA/ PRNT	2000	Goiás	207	54,1%
Dias et al., 2003	ELISA	2000	Minas Gerais e São Paulo	376	57,2%
Samara e Moreira., 2004	ELISA	2000	Minas Gerais e São Paulo	376	MG (57%), SP(56%)
Thompson et al., 2006	PRNT	2000	Paraíba	2343	22,2%
Noronha et al., 2003	PRNT	2001	Bahia	220	56,0%
Brito et al., 2010	PRNT	2002	Goiás	3533	64,0%
Vidor., 2004	PRNT	2002-2003	Rio grande do sul	697	58,8%
Alfaia et al., 2004	PRNT	2003	Goiás	3533	64,0%
Brito., 2004	PRNT	2004	Goiás	160	63,7%
Souza et al., 2009	ELISA	2008	Maranhão	156	67,3%
Quincozes et al., 2007	PRNT	2005	Rio grande do sul	1734	66,3%
Chaves e Bezerra et al., 2010	ELISA	2008	Maranhão	400	61,5%
Chaves et al., 2012	ELISA	2008	Maranhão	920	65,7%

Estudos baseados em técnicas sorológicas para detecção de BVDV no Brasil. Plaque reduction neutralization test (PRNT); Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA); Número amostral (n); Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV)

Entretanto esses dados devem ser analisados com cuidado, já que vários desses estudos foram feitos em rebanhos com problemas reprodutivos. Além disso, houve falhas técnicas em que se destacam a utilização do genótipo de BVDV-1 nos testes de soroneutralização que certamente resultaram na falha de detecção de anticorpos em amostras com títulos baixos a moderados contra o BVDV-2 e a falta de padronização da técnica sorológica utilizada (soroneutralização versus ELISA; diferentes genótipos virais, células e protocolos utilizados na soroneutralização) (Flores *et al.*, 2005). Outro ponto que deve ser considerado é o fato de que em alguns estudos a população analisada não

foi estratificada por idade, fator importante já que o vírus pode ser transmitido por contato sexual, sendo assim quanto maior a idade do animal, maior o número de vezes a que foi exposto durante a cópula. Além disso, alguns estudos desconsideraram a possibilidade de que parte da sorologia positiva pode ser devida à vacinação (Flores *et al.*, 2005). Dessa forma, as ferramentas moleculares se mostram mais adequados para o estudo epidemiológico desse patógeno.

Apesar de serem escassos os estudos moleculares para BVDV no Brasil, os genótipos BVDV1a, BVDV-1b, BVDV-1d , BVDV-2a e BVDV-2b têm sido descritos (Flores *et al.*, 2002; Vilcek *et al.*, 2004 e Cortez *et al.*, 2006)(Flores *et al.*, 2002). Inclusive trabalhos conduzidos por Otonel *et al.*, (2013) relatam a detecção de 3 subgenótipos diferentes em animais PI identificados em um rebanho leiteiro altamente produtivo, regularmente vacinados, que apresentavam falhas reprodutivas.

O ponto chave na epidemiologia do BVDV é a identificação dos animais PI, que são comumente assintomáticos, sorologicamente negativos e eliminam o vírus de forma contínua em suas secreções e excreções (Fulton *et al.*, 2006). Esses animais disseminam o vírus rapidamente para o rebanho, induzindo altos títulos de anticorpos neutralizantes nos animais infectados.

Vários estudos têm demonstrado a prevalência entre 0,5% a 2% de animais PI nos rebanhos (Houe, 1999). Em bovinos dos Estados Unidos, a prevalência foi de 0,4% (Fulton *et al.*, 2006). Estudos feitos no Brasil demonstram a prevalência de 1,2% em rebanhos com problemas reprodutivos (Oliveira *et al.*, 1996). Já Dias *et al.*, (2010) analisaram 26 rebanhos dos estados de Minas Gerais e São Paulo e detectaram 2,63% de animais PI. Brito *et al.*, (2010) detectaram 0,4% em Goiás, o que se aproxima ao percentual de 0,75% no Rio Grande do Sul (Botton *et al.*,1998). Recentemente, foram identificados 0,43% de animais PI em rebanhos com problemas reprodutivos no Paraná (Otonel *et al.*, 2014). Embora aparentemente baixa, essa prevalência é suficiente para manter o vírus na população (Baker *et al.*,1995).

A transmissão horizontal pode ocorrer pelo contato direto entre animais, principalmente pelas mucosas, o que inclui o coito, ou contato indireto, por meio de secreções como

aerossóis, nasais, oculares, saliva, leite, sêmen e fômites contaminados. A transmissão vertical e suas diversas manifestações reprodutivas já foram extensivamente documentadas e segundo Flores *et al.*, (1997) o maior impacto econômico da infecção pelo BVDV na pecuária deve-se aos problemas reprodutivos.

A quarentena de todos os animais recém-adquiridos é primordial para evitar o contato com o vírus. Além disso, é importante a adoção de práticas adequadas de higiene e desinfecção dos fômites e das instalações, especialmente dos locais de quarentena (Fino *et al.*, 2012). De modo geral, preconiza-se a vacinação para rebanhos com sorologia positiva e/ou histórico de doença clínica ou reprodutiva ou onde já foi detectada a circulação viral. Adicionalmente, esta prática também é indicada em criações com alta rotatividade de animais, propriedades onde são reunidos animais de diferentes procedências ou que tenham constante aquisição de animais (Flores *et al.*, 2003).

No Brasil, somente vacinas inativadas estão disponíveis. A grande vantagem desse tipo de imunógeno é a segurança de administração, principalmente para vacinação de vacas prenhes já que não apresentam reversão de virulência. Algumas desvantagens como indução de resposta imune fraca, de curta duração, necessidade de revacinação anual ou semestral, além de reforço na primo-vacinação por interferência de anticorpos maternos, fazem com que o uso desse tipo de vacina seja mais oneroso para o proprietário (Flores *et al.*, 2003). Outro ponto que merece destaque é a formulação das vacinas comercializadas no país, que têm como base os subgenótipos virais norte-americanos ou europeus de BVDV1, antigenicamente diferentes dos circulantes no território brasileiro. A tendência atual é que o genótipo 2, já detectado no Brasil, seja incluído nas formulações vacinais visando mitigar as falhas e o insucesso de programas de prevenção freqüentemente relatados (Fino *et al.*, 2012).

Dessa forma o conhecimento epidemiológico, através da detecção e caracterização contínua de isolados é importante para o conhecimento do perfil epidemiológico desse vírus, bem como para a eventual identificação de outros subgenótipos circulantes no país, o que contribuirá para a adoção de medidas efetivas de controle.

#### **2.1.4 Patologias associadas ao BVDV**

A infecção de bovinos pelo BVDV tem sido associada a uma variedade de manifestações clínicas, que incluem desde infecções inaparentes até doença aguda fatal. No entanto, a maioria das infecções em animais imunocompetentes parece ocorrer de forma subclínica (Flores *et al.*, 2005).

Enfermidade gastroentérica aguda ou crônica, doença respiratória em bezerros, síndrome hemorrágica com trombocitopenia, patologias cutâneas e imunossupressão estão entre as conseqüências mais freqüentes da infecção (Baker, 1995). A imunossupressão é decorrente dos efeitos diretos do vírus em linfócitos T e B (Bolin, 1995) e apoptose dos linfócitos associados ao tecido intestinal (Pedrera *et al.*, 2012). Além disso, induzem efeitos na resposta imune que propiciam infecções secundárias.

Esse vírus infecta uma ampla variedade de tipos celulares, mas tem tropismo por células do sistema imune, como os monócitos/macrófagos, células dendríticas e linfócitos. As conseqüências mais drásticas da infecção incluem a morte dessas populações celulares e efeitos mais sutis na expressão de citocinas e síntese de coestimuladores celulares (Brodersen, 2014)

A infecção dos gânglios mesentéricos do trato gastrointestinal e a interrupção da função neural no intestino pode ser a causa da diarreia observada em alguns animais com infecção aguda (Wilhelmsen *et al.*, 1990). Nessa situação eles podem se recuperar completamente em três semanas, mas mesmo após recuperado, o animal pode carrear o vírus nas células periféricas mononucleares sanguíneas (PBMC) por 98 dias ou mais.

Em muitos rebanhos onde a infecção é endêmica, falhas reprodutivas representam os sinais mais evidentes da infecção e às vezes, são os únicos indícios da presença viral. Fêmeas expostas ao vírus durante o estro podem apresentar baixas taxas de fertilização após a inseminação artificial ou monta natural devido a falhas ou atrasos na ovulação provocados pela atividade do patógeno no tecido ovariano. De maneira semelhante, reprodutores com infecções agudas apresentam uma queda na qualidade do sêmen,

devido a reduzida densidade e mobilidade dos espermatozoides. Os animais podem apresentar também anomalias morfológicas, apesar de estarem clinicamente saudáveis (Grooms, 2004). Já em fêmeas prenhes a presença do BVDV é caracterizada por diversas manifestações clínicas, que variam desde absorção embrionária até o nascimento de bezerros fracos e inviáveis, dependendo do estágio gestacional em que ocorreu a infecção (Ridpath & Flores, 2007).

A geração de animais persistentemente infectados (PI) é mais freqüente quando a infecção fetal ocorre entre 30 e 90 dias de gestação, podendo ser estabelecida tanto pelo BVDV-1 quanto pelo BVDV-2 (Lieber-Tenorio *et al.*, 2005). Nessa fase o sistema imunológico do feto é imaturo e as proteínas virais são reconhecidas como próprias, o que torna o animal imunologicamente tolerante ao vírus (Dubovi *et al.*, 1998). Esses animais podem ser clinicamente saudáveis, mas com baixa expectativa de vida, já que todos apresentam o risco de desenvolver a doença das mucosas (Brownlie, 1990). Essa doença acomete exclusivamente animais PI imunotolerantes ao biótipo não citopático (NCP) de BVDV, que sofrem uma superinfecção com o tipo citopático (CP) do vírus. O biótipo CP é geralmente originado a partir de mutações ou recombinações genéticas do biótipo NPC do próprio animal. Fontes virais externas, como a aplicação de vacinas vivas modificadas ou infecção com o biótipo CP decorrente da transmissão por outros animais, também podem resultar na manifestação da doença (Baker, 1995; Silva *et al.*, 2007). A doença das mucosas ocorre principalmente em animais entre seis meses e dois anos de idade e é invariavelmente fatal, podendo apresentar diferentes cursos evolutivos (Fino *et al.*, 2012).

A taxa de letalidade dos bezerros PI é superior a 50% no primeiro ano de vida, principalmente porque muitos deles nascem prematuros, fracos, letárgicos ou apresentam algum tipo de malformação congênita. Geralmente os bezerros morrem logo após o nascimento e, aqueles que sobrevivem, podem apresentar retardo no crescimento e baixa resistência a outras enfermidades (Bolin, 1995). Segundo Houe *et al.*, 1999, a ocorrência de bovinos adultos PI tende a ser geralmente baixa, provavelmente porque os animais morrem antes de chegar à idade adulta por complicações da persistência viral. Contudo, existem relatos de animais nessa condição que sobrevivem até a idade adulta e são capazes de se reproduzir, gerando progênes

imunotolerantes ao BVDV (Flores *et al.*, 2007) .

Além da evidente perda econômica que a doença provoca, outro aspecto relevante da infecção por esse vírus é a sintomatologia parecida com a febre aftosa, que é uma doença altamente contagiosa, de fácil disseminação e de notificação compulsória.

### **2.2.0 Vesicular stomatitis virus (VSV)**

A estomatite vesicular bovina, que tem como agente etiológico o *Vesicular stomatitis virus* (VSV) assume papel importante para os programas de saúde animal, principalmente por ser clinicamente semelhante à Febre Aftosa. Essa é uma doença transmissível com grande potencial de propagação, de graves conseqüências sócio-econômicas para a saúde pública e de grande importância para o comércio nacional e internacional de animais e seus derivados (Stepano *et al.*, 2003). Além disso, é uma doença de notificação obrigatória ao ministério da agricultura pecuária e abastecimento (MAPA).

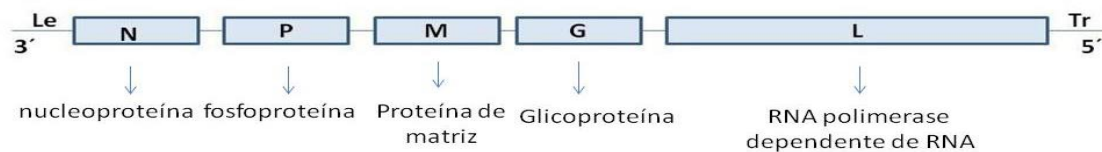
Pertencente à família *Rhabdoviridae*, gênero *Vesiculovirus*, os VSV são vírus envelopados, com nucleocapsídeo helicoidal, genoma de RNA fita simples, senso negativo, que compartilham entre si uma forma alongada ou de projétil com aproximadamente 45 a 100 nm de diâmetro e 100 a 430 nm de comprimento. Essa morfologia distinta separa os rabdovírus dos outros táxons na ordem *Mononegavirales*, que inclui também as famílias *Bornaviridae*, *Filoviridae* e *Paramyxoviridae*, que infectam vertebrados. Entretanto, os rabdovírus possuem um amplo espectro de hospedeiros, podendo se multiplicar em plantas, vertebrados e invertebrados e os que infectam animais estão compreendidos em quatro gêneros: *Lyssavirus*, *Vesiculovirus*, *Ephemerovirus* e *Novirhabdovirus* (Lyles & Rupprecht, 2007).

Existem dois tipos imunologicamente distintos do VSV, classificados como New Jersey (VSNJ) e Indiana (VSIV), sendo o sorotipo Indiana subdividido em três subtipos com características antigênicas distintas: Indiana I (VSIV1), Indiana II (VSIV2) e Indiana III

(VSIV3) que tem como protótipo o *Cocal virus* (COCV) e *Alagoas virus* (VSAV), respectivamente (Federer, Burrows e Brooksby, 1967). Segundo o Comitê Internacional de taxonomia de vírus (ICTV), neste gênero estão incluídos ainda espécies que circulam em outros continentes como *Chandipura virus* (circulante na Índia) e *Isfahan virus* (circulante no Irã) (Murphy *et al.*, 1999).

### 2.2.1 Estrutura Genética

O VSV é um vírus com genoma RNA fita simples, não segmentado de polaridade negativa, sem cap 5' nem cauda 3' poli-A, sendo incapaz de atuar como um RNA mensageiro. O genoma desse vírus tem aproximadamente 11 kb e contém cinco genes ladeados por regiões não transcritas sendo elas a *leader* (le) e a *trailer* (tr) que possuem funções importantes na regulação da transcrição e replicação viral (Rodriguez, *et al.*, 2007). O RNA codifica sucessivamente, a partir da região 3' terminal, a nucleoproteína (N), a fosfoproteína (P), a proteína de matriz (M), a glicoproteína (G) e a subunidade maior da polimerase de RNA dependente de RNA (L) (figura 3).



**Figura 3: Organização genômica do VSV.** *Leader*(le) e *Trailer*(Tr) são regiões não traduzidas. Adaptado de Ivanov *et al.*, 2011.

A nucleoproteína, fosfoproteína e a polimerase envolvem o RNA genômico formando o ribonucleocapsídeo. A proteína de matriz está intimamente associada com a ribonucleoproteína, constituindo a base estrutural que confere aos vírus o formato de projétil (Lyles *et al.*, 2013). A polimerase, que é multi-enzimática, participa dos processos de metilação, poliadenilação, adição de *capping* ao RNA mensageiro viral e catalisa a síntese de RNA.

A transcrição do genoma é regulada por um mecanismo simples e eficiente, em que o nível de expressão de cada gene é determinado pela sua distância em relação ao promotor único, localizado próximo à extremidade 3'. Esse mecanismo é denominado de atenuação da transcrição em que o gradiente de produção de transcritos segue a ordem N>P>M>G>L, assim, nucleocapsídeo (N) e a polimerase são as proteínas mais e menos expressas, respectivamente (Rodriguez et al., 2007).

A polimerase, que não possui atividade revisora, apresenta altas taxas de erro, sendo a taxa de substituições de aproximadamente 1 a cada  $10^4$  bases. Como esses vírus têm um genoma ligeiramente maior do que  $10^4$  bases, em média há uma substituição a cada replicação, característica essa que leva à formação de *quasiespecies* (Lyles et al., 2013). Dessa forma, mesmo populações clonais são, na verdade, coleções de vírus. Isso pode ser vantajoso por permitir uma rápida adaptabilidade, o que no caso do VSV permitiu a habilidade de replicação em vários hospedeiros diferentes, por exemplo, a capacidade de infectar artrópodes, estabelecendo infecção persistente e em mamíferos, causando infecção aguda. Essa transferência de um tipo de hospedeiro para outro requer aumento no *fitness* viral para manter uma replicação eficiente no novo hospedeiro (Lyles et al., 2013).

A elevada variabilidade genética tem implicações diretas no diagnóstico molecular, como na dificuldade no desenho de oligonucleotídeos. O gene que codifica a polimerase, devido à sua função primordial na biologia viral, é a região mais conservada do genoma e por isso é amplamente usada para a detecção viral. Por outro lado, não há uma única região de 50 ou mais nucleotídeos completamente conservados no gene da nucleoproteína entre o sorotipo Indiana e New Jersey (Wilson et al., 2009).

Segundo o levantamento bibliográfico (tabela 4) a região da fosfoproteína é a mais extensivamente usada para análises filogenéticas devido à região hipervariável de 450 bases que acumula um alto número de substituições de nucleotídeos (Lovetti, 2008).



**Tabela 4- Levantamento bibliográfico das regiões gênicas utilizadas para detecção e inferências filogenéticas de VSV**

Referência	Objetivo	Gene	Matriz detecção
Rodriguez, 1993	Detecção	P	Epitélio
Wilson, 2009	Detecção	N- detecção P-sequenciamento	Epitélio
Hole, 2010	Detecção	L e N	Epitélio
Hole, 2006	Detecção	L	Epitélio
Perez, 2010	Filogenia	P	Epitélio
Lovett, 2007	Filogenia	P	Epitélio
Steven, 2008	Filogenia	P, L, M, G,N	Isolados de campo
Steven, 2011	Filogenia	P e G	Isolados de campo
Salinas, 2014	Filogenia	P	Isolados de campo

Regiões genicas mais descritas na literatura para detecção e filogenia de VSV. Nucleoproteína (N); fosfoproteína (P); proteína de matriz (M); glicoproteína (g); polimerase (L); *Vesicular stomatitis vírus* (VSV)

Análises filogenéticas baseadas em várias regiões genômicas agrupam o sorotipo VSIV e os subsorotipos VSIV 2, e VSIV 3 em um grupo monofilético distinto do sorotipo New Jersey (VSV 1). Trabalhos conduzidos por Pauszek *et al.*, 2001, com amostras de campo isoladas no Brasil e Argentina no período de 35 anos (1963 a 1998) mostraram que as regiões da glicoproteína e fosfoproteína fornecem informações evolutivas diferentes. A fosfoproteína indica que VSIV2 é ancestral de VSIV1 e VSIV3, já a inferência baseada na região da glicoproteína mostra que VSIV3 é o ancestral dos outros dois sorotipos, o que é consistente com os dados sorológicos. Em adição a isso, as análises moleculares desses isolados evidenciaram pouca variação genética entre os vírus de áreas geográficas próximas, o que também já foi observado para os isolados de VSNJV. A análise de um número maior de isolados associada a dados geográficos poderão ajudar a determinar se fatores ecológicos influenciam nos padrões evolutivos desses vírus (Pauszek *et al.*, 2011).

A análise da fosfoproteína do VSIV3 evidenciou a ausência de uma região denominada C'/C, que é codificada em uma segunda ORF dentro desse gene e expressa uma pequena proteína, não estrutural presente nos VSIV e VSNJV. Até o momento nenhuma

função específica tem sido atribuída a essa região, entretanto, essa característica fornece forte evidência para a classificação taxonômica. Além disso, visto que vírus recombinantes de VSIV sem proteínas C'/C se multiplicam normalmente *in vitro*, isso pode representar uma adaptação do VSIV3 a um vetor ou outro fator ambiental ainda desconhecido (Spiropoulou *et al.*, 1993).

### 2.2.2 Epidemiologia

Como protótipo da família *Rhabdoviridae*, o VSV tem sido extensivamente estudado nos laboratórios. Entretanto, várias questões ainda permanecem sobre o modo pelo qual o vírus é mantido na natureza durante os surtos endêmicos e epidêmicos e a forma de transmissão. Há evidências de que os insetos possam transportar o vírus de áreas endêmicas e infectar animais domésticos e humanos (Rodríguez, 2002). Um dos primeiros relatos de insetos encontrados naturalmente infectados com VSV foram flebotomíneos capturados em áreas florestais no Panamá (Tesh, Peralta e Johnson, 1969). Outras evidências incluem isolamento desse vírus a partir de insetos hematófagos e não hematófagos. Estudos sorológicos demonstraram que além de animais domésticos e dos seres humanos, muitas espécies silvestres como, morcegos, veados e macacos, quando expostos ao vírus, podem desenvolver anticorpos neutralizantes (Jiménez *et al.*, 1996).

Em conjunto, esses fatos sugerem que poderia haver um ciclo do vírus envolvendo animais silvestres e artrópodes. Uma parte do ciclo em artrópodes e a existência de vários animais susceptíveis ou reservatórios são capazes de produzir altos níveis de viremia. Assim, vetores se alimentariam desses hospedeiros infectados e completariam o ciclo do vírus, tal como acontece com alguns arbovírus como *Yellow fever virus* e *Dengue virus* (McCluskey, Beaty e Salman, 2003)

As primeiras descrições da estomatite vesicular ocorreram no século XIX, no sudeste dos Estados Unidos e na América Central. Em 1862, foi relatada a ocorrência de uma doença vesicular e febril em eqüinos do exército americano durante a guerra civil. O primeiro grande surto dessa doença, descrita em detalhes, ocorreu em 1916, acometendo um grande número de eqüinos, mulas e bovinos. Porém o agente etiológico

foi descrito pela primeira vez na Indiana, em 1926, recebendo o nome do vírus da estomatite vesicular Indiana (VSIV). No ano seguinte, um agente sorologicamente relacionado ao VSIV foi isolado de bovinos em New Jersey, sendo denominado vírus da Estomatite Vesicular New Jersey (VNIV). Estudos subseqüentes demonstraram que esses vírus eram sorologicamente distintos, sendo, assim, classificados em sorotipos separados (Rodriguez et al., 2007).

Atualmente o VSV é endêmico do norte da América do Sul (Colômbia, Equador, Peru e Venezuela) ao norte do México e sudeste dos Estados Unidos. A ocorrência geralmente corre no sul da América do Sul, Estados Unidos e Canadá (Rodríguez, Fitch e Nichol, 1996)(Arboleda et al., 2002). A irregularidade na ocorrência dos surtos é uma característica marcante desse vírus. De acordo com Flores, *et al.*, 2012, análises moleculares demonstram que em regiões endêmicas várias amostras virais causam surtos simultaneamente. Já em áreas não endêmicas há uma única amostra viral e cada surto é, geralmente, causado por uma amostra diferente. Esses padrões de ocorrência sugerem que os surtos em locais não endêmicos resultam da introdução de amostras virais a partir de áreas endêmicas, que se disseminam e se tornam, posteriormente extintas.

Nos Estados Unidos, o sorotipo New Jersey é o responsável pela maioria dos casos. Os surtos causados por VSIV foram relatados em apenas duas ocasiões nos últimos 40 anos, em 1966 e 1997-1998 (Loverri et al., 2008) e os fatores responsáveis pelas epidemias cíclicas desse vírus no país ainda não estão esclarecidos. Atualmente, existem duas hipóteses sobre o ciclo natural da VSV no sudoeste dos EUA, a primeira propõe que o vírus tem um ciclo de transmissão endêmica em alguma espécie de reservatório a partir do qual infecta periodicamente animais doméstico (Webb *et al.*, 1987). A segunda hipótese é a de que os surtos são causados pela introdução do vírus nos EUA a partir de áreas endêmicas de outros lugares (Rodriguez *et al.*, 2000). Análises filogenéticas das amostras virais de vários surtos anteriores têm sugerido que esses vírus são estritamente relacionados a amostras de áreas endêmicas no México (Nichol, Rowe e Fitch, 1993)

No Brasil ainda não há relatos da ocorrência do sorotipo Indiana clássico nem New Jersey. Provavelmente a não detecção do sorotipo New Jersey pode estar associada a fatores climáticos, já que até o momento esse sorotipo só foi detectado em climas temperados (Stefano *et al.*, 2003). Os surtos descritos no Brasil são relacionados ao sorotipo Indiana 2 (VSIV2), que tem como protótipo o Cocal vírus (COCV) e Indiana 3 (VSIV3), que possui como protótipo o Alagoas Vírus (VSAV), sendo a maioria dos surtos causada pelo VSIV3, enquanto o VSIV2 ocorre apenas esporadicamente e mais ao sul do país (Rodriguez *et al.*, 2007).

O *Vesicular Stomatitis Cocal virus* que inicialmente era associado a surto em cavalos, foi isolado pela primeira vez na cidade de Salto em 1963 e novamente em Maipu em 1986, ambas as cidades localizadas na Argentina. No Brasil esse vírus foi isolado a partir de cavalos nas cidades de Rancharia (SP), em 1966 e Ribeirão (SP), em 1979 (Pauszek, Allende e Rodriguez, 2008). Entretanto, esse agente etiológico foi o responsável por surtos que acometeram principalmente bovinos nos estados de Santa Catarina e Paraná em 1998. Análises do gene da glicoproteína e fosfoproteína desse vírus demonstraram ser intimamente relacionados com os vírus equinos isolados nos surtos de 1963 e 1979, indicando a capacidade da mesma amostra viral de infectar diferentes espécies hospedeiras (Pauszek *et al.*, 2011).

O *Vesicular Stomatitis Alagoas virus* (VSIV3) tem causado surtos esporádicos em bovinos no Nordeste do Brasil como em Espinosa (1977), Sergipe (1984) e Agulhas Negras (1986) (Pauszek, Allende e Rodriguez, 2008). Recentemente, Cargnelutti *et al.*, 2014 descreveram um surto acometendo cavalos e bovinos no ano de 2013 nos estados da Paraíba e Rio Grande do Norte, sendo o vírus isolado de ambos os hospedeiros. A análise genômica do gene da fosfoproteína indicou 100% de identidade entre os isolados e alta similaridade com vírus que já causaram outros surtos na mesma região. No quadro a seguir são mostrados os sorotipos já isolados no país até o momento.

**Tabela 5 - VSV isolados no Brasil.** São evidenciados o ano, estado, hospedeiro e subserotipos desse vírus.

VSV isolados no Brasil				
Autor	Ano	Estado	hospedeiro	Subserotipo
Andrade et al., 1980	1964	Alagoas	equinos	VSIV3
Pustiglione Netto et al., 1967	1966	São Paulo	equinos	VSIV2
Arita & Arita., 1983	1969	São Paulo	equinos	VSIV
-----	1983	Pará	inseto	MARAV
Arita et al., 1985	1984	Ceará	bovinos	VSIV3
Pituco et al., 1989	1986	São Paulo	bovinos	VSIV3
-----	1986	Rio de Janeiro	bovinos	VSIV3
Rocha Araújo et al., 1997	1997	Minas Gerais	bovinos	VSIV3
Alonso Fernandes & Sondahl., 1985	1994	Sergipe	equinos	VSIV3
Lopes et al. 1999	1998	Santa Catarina	bovinos	VSIV3
Cargnelutti et al., 2014	2013	Paraíba	bovino/equino	VSIV3

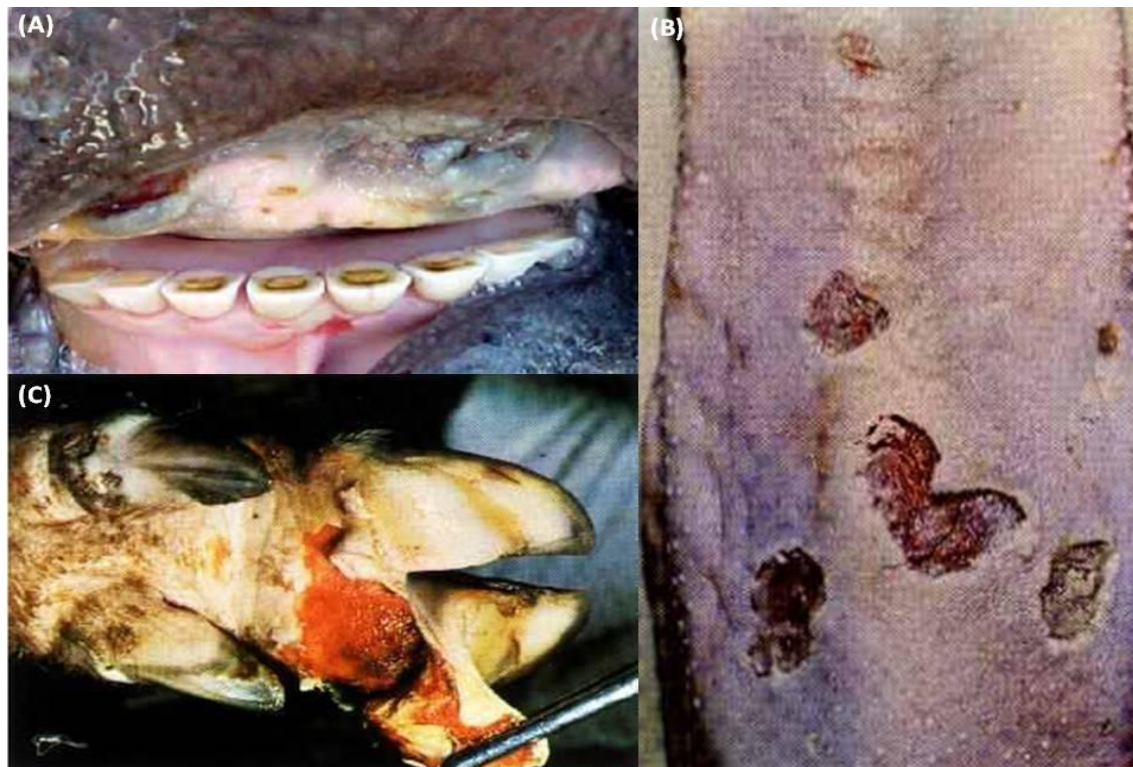
Vírus da estomatite vesicular isolados no Brasil. *Vesicular Stomatitis Cocal virus* (VSIV2); *Vesicular Stomatitis Alagoas virus* (VSIV3) ; *Maraba virus* (MARAV)

Apesar da obtenção de vários isolados brasileiros pouco se sabe sobre a circulação desse vírus no Brasil. Levantamentos sorológicos conduzidos por Kotait *et al* 1990 e Stefano *et al.*, 2003 detectaram uma soropositividade de 1,64% (35/2181) e 2,6% (28/1090), ambos no estado de São Paulo. De acordo com o ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento de 2005 a 2009 houve 169 casos registrados nos estados da Bahia, Ceará, Goiás, Pernambuco, Maranhão, Mato Grosso, Minas Gerais, Pará, Paraíba, Piauí, Rio Grande do Norte, Rio de Janeiro, São Paulo e Tocantins. Foram registrados 16 casos em 2011, 1 em 2012, 55 em 2013 e até julho de 2014 foram 54 casos. ([www.agricultura.gov.br](http://www.agricultura.gov.br)). Entretanto não foram divulgados o número de animais, nem quantas propriedades foram afetadas.

Apesar do grande número de casos nos últimos anos, os relatos de surtos de VSV são praticamente ausentes na literatura científica, o que reflete o baixo número de grupos de pesquisa estudando esse vírus no país. Além disso, provavelmente, há uma subnotificação dos casos, devido ao desconhecimento dos produtores ou uma não comunicação intencional aos órgãos oficiais, em decorrência das perdas financeiras. Todos esses fatores contribuem para um incompleto conhecimento da real situação epidemiológica do VSV no país.

### 2.2.3 Patologias associadas ao VSV

A estomatite vesicular é uma doença caracterizada por lesões indistinguíveis daquelas causadas pela febre aftosa (Riet-correa, 1996). As vesículas ocorrem na boca, lábios e gengivas causando salivação excessiva, o que dificulta a alimentação. O animal perde peso, pois não se alimenta adequadamente e reluta em andar devido às dores provocadas pelas lesões na banda coronária das patas (figura 4). Uma mastite grave pode ocorrer em virtude das vesículas nas tetas dificultando a amamentação dos bezerros, que podem se infectar por essa via (Mass *et al.*, 2009). Todos esses sintomas estão relacionados às perdas econômicas principalmente na produção de carne e leite.



**Figura 4: Lesões provocadas pelo VSV em bovinos.** Vesículas e ulcerações na mucosa oral (A). Ulceração na língua (B). Desprendimento do epitélio do rodete coronário (C). Figuras adaptadas de Lopes et al., 2008

Os sinais clínicos aparecem após um período de incubação de 24 a 72 horas e como medida de controle da doença é necessário o isolamento dos animais com lesões até que os sinais clínicos desapareçam. Abrasões na mucosa oral assim como ordenha mecânica são considerados importantes fontes de transmissão viral, portanto, é

necessária a correta higienização das máquinas e aparatos. Cochos de alimentação devem ser desinfetados e antibióticos podem ser usados nas lesões de pele e boca para prevenir ou tratar infecções bacterianas secundárias (Schmitt, 2002). Dessa forma, as implicações econômicas mais relevantes estão relacionadas à perda da produção leiteira dos rebanhos, queda no preço da carne no mercado, trabalho adicional durante o surto, custos associados à imposição de quarentena e suspensão da comercialização internacional de carne, como aconteceu no estado de Goiás, em junho de 2008 (IBGE, 2008)

Os seres humanos são suscetíveis ao VSV. Os sorotipos New Jersey e Indiana geralmente causam sintomas clínicos semelhantes à gripe, com duração de aproximadamente uma semana, mas raramente há a formação de vesículas, por isso, é recomendável o uso de luvas e óculos de segurança ao manusear animais infectados e amostras para diagnóstico clínico (Schmitt, 2002).

### **2.3.0 Bovine herpesvirus**

Os herpesvírus bovinos são apontados como um dos principais agentes de redução da eficiência produtiva e reprodutiva de bovinos no Brasil e no mundo, o que demanda um alto investimento em campanhas de controle e erradicação desses vírus, além do comprometimento na comercialização de animais, sêmen e embriões.

Pertencente a família *Herpesviridae*, ordem *Herpesvirales*, os herpesvirus são vírus de DNA dupla fita, envelopados, que infectam vertebrados. De acordo com diferenças nas sequências nucleotídicas, efeito citopático e tropismo celular a família se divide em três subfamílias, *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* e *Gammaherpesvirinae*. Na subfamília *Alphaherpesvirinae* estão os gêneros *Varicellovirus* e *Simplexvirus*, no qual estão classificados o *Bovine herpesvirus 1* (BoHV1), *Bovine herpesvirus 5* (BoHV5) e *Bovine herpesvirus 2* (BoHV2) que são considerados importantes patógenos bovinos (Pellett, et al., 2013)

O ciclo de multiplicação desses vírus é caracterizado pela regulação temporal da expressão gênica. Inicialmente, o genoma do vírus é liberado no núcleo, com a

expressão de genes imediatamente precoces, que codificam proteínas que exercem função na regulação do ciclo viral. Posteriormente há a tradução de genes precoces que codificam proteínas envolvidas no processo de replicação do DNA e por último os genes tardios que produzem proteínas que compõem a morfogênese de novas partículas virais (Roizmann *et al.*, 1992).

Além da regulação temporal da expressão gênica, outras características em conjunto são distintivas dos herpesvirus como a síntese do DNA e montagem do capsídeo viral no núcleo celular. Esses vírus também produzem enzimas utilizadas no metabolismo do ácido nucléico e no processamento de proteínas. E por fim, a capacidade de estabelecer infecção latente, principalmente, mas não exclusivamente, em gânglios nervosos (Pellett, Roizman.,2013).

O mecanismo de latência é caracterizado pela interrupção do ciclo replicativo logo após a penetração viral na célula hospedeira. Com isso, não há expressão gênica significativa, não ocorrendo a produção de proteínas virais, replicação do genoma ou produção de progênie viral. Assim, o DNA viral permanece inativo no núcleo dos neurônios que perdurará por toda a vida do animal, independente da ocorrência de episódios de reativação. Em determinadas situações, geralmente associadas ao estresse, o genoma é ativado e a expressão gênica reiniciada, o que resulta na retomada da infecção produtiva e na produção de progênie viral. O estabelecimento e reativação da latência representam pontos chave na biologia dos herpesvirus, por permitirem a permanência indefinida do vírus nos hospedeiros, acompanhada de episódios esporádicos de reativação e disseminação viral (Franco & Roehle, 2007).

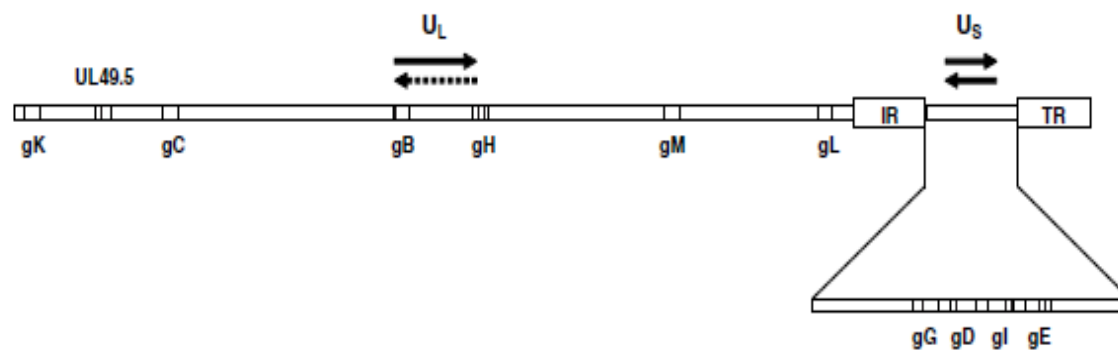
### **2.3.1 Estrutura genética**

O genoma dos *Herpesvirus* possui entre 125 a 235 Kbp, dependendo da espécie viral e codificam aproximadamente 70 proteínas, das quais 33 são estruturais e até 15 são não estruturais (Muylkens *et al.*, 2007). A transcrição de cada gene origina um RNA mensageiro com *cap* na extremidade 5' e poliadenilação na extremidade 3' e poucos



transcritos sofrem *splicing* antes de serem exportados para o citoplasma (Pellett et al., 2013).

O DNA é organizado em uma região longa única ( $U_L$ ) e uma região curta única ( $U_S$ ) que é flanqueada por duas seqüências invertidas repetidas: repetição interna (IR) e terminal (TR). O segmento  $U_S$  pode apresentar duas possíveis orientações, já o segmento  $U_L$  apresenta, na maioria das vezes, uma única orientação (figura 5).



**Figura 5: Organização genômica dos Alphaherpesvirus.** As setas indicam a possível variação na orientação das regiões. (Thiry et al., 2006)).

Os genes situados nas regiões  $U_L$  e  $U_S$  estão presentes em cópias únicas no genoma, enquanto genes localizados nas seqüências repetidas estão presentes em mais de uma cópia. O significado biológico dessas duplicações gênicas ainda não é conhecido. (Pellett et al 2013)

A região  $U_L$  codifica a glicoproteína B que é altamente imunogênica e assim como a glicoproteína K participa do processo de penetração viral. Na região  $U_S$  há genes para a codificação da  $gD$  que também é muito imunogênica e tem função de induzir a apoptose. A  $gE$  e  $gG$  participam na entrada do vírus na célula e a  $gL$  quando complexada a  $gE$ , atua como receptor para a região Fc da imunoglobulina G (Esteves et al, 2001).

A penetração do vírus na célula hospedeira ocorre por fusão única do envelope viral com a membrana plasmática seguida da entrada do vírus no citoplasma, através da formação

de poros. As glicoproteínas envolvidas nesse processo são as gB, gD, gH e gL. A gB e gD são as principais responsáveis pela multiplicação viral, enquanto a gB, gC e gD atuam na interação do vírus com a célula hospedeira (Schwyzer e Ackermann, 1996).

A glicoproteína C, expressa em altos níveis na superfície de células infectadas (Liang, Babiuk e Zamb, 1992), é imunodominante e representa o principal alvo para a resposta imune, tanto em nível humoral quanto celular (Abdelmagid *et al.*, 1998). Além disso, a região 3' da gC (correspondente a parte carboxi terminal da proteína) é moderadamente conservada e por isso usada para análises filogenéticas e classificação do BoHV em tipos e subtipos (Traesel *et al.*, 2013) (tabela 6):

**Tabela 6 - Levantamento bibliográfico das regiões gênicas utilizadas para detecção e filogenia de BoHV1/5**

Referência	Objetivo	Gene	Matriz de análise	Tamanho fragmento
Claus et al, 2005	Diferenciação BoHV 1 e 5	gC amino terminal	Tecidos (rim, neurônio...)	354 (BoHV1) e 159 (BoHV5)
Afonso et al., 2006	Filogenia	gD	Tecido neural	354 (BoHV1) e 159 (BoHV5)
Silva et al, 2007	Caracterização	gC - 1º Região interna 2º Região externa	Tecido neural	1º PCR 653 (BoHV1) e 589 (BoHV2)  2º PCR-575(BoHV1) e 572(BoHV5)
Esteves et al., 2008	Filogenia	gC- carboxi terminal	Tecido neural	575 (BoHV1) e 572(BoHV5)
Traesel et al, 2013	Filogenia	gC 5'gC- diferenciar BoHV 1 e2 3'gC subgenótipos	Isolados de campo	5'gC- Silva et al, 2007.  3'gC- 625 (BoHV1) e 610(BoHV5)
Traesel et al, 2014	Filogenia	gC seguida de gD	amostras referência	gD (346pb)

Regiões genicas de *Bovine herpesvirus* tipo 1 e 5 (BoHV 1/5) mais usadas para detecção e caracterização viral. *Bovine herpesvirus 1* (BoHV 1); *Bovine herpesvirus 5* (BoHV 5); glicoproteína C (gC); glicoproteína D (gD).

O BoHV-1 inicialmente era agrupado em três subtipos: BoHV-1.1, BoHV-1.2 e BoHV-1.3. A identidade gênica entre BoHV-1.1 e BoHV-1.2 é estimada em 95%. Embora os dados epidemiológicos indiquem diferenças nas manifestações clínicas, é difícil determinar a diferença biológica exata entre os genótipos (Rijsewijk *et al.*, 1999). Tem sido sugerido que cada um se adapta melhor a determinado órgão do hospedeiro, sendo o BoHV-1.1

melhor adaptado ao trato respiratório e o BoHV-1.2 ao trato genital (Edwards, White e Nixon, 1990). Devido as diferenças nos padrões de restrição do genoma, microscopia eletrônica, hibridização cruzada e sintomatologia clínica (neurovirulência), o subtipo BHV-1.3 recebeu a denominação de BoHV-5 (Roizmann *et al.*, 1992). Portanto, apenas o BoHV-1.1 e BHV-1.2 são classificados como subtipos do BoHV-1.

A similaridade de nucleotídeos e aminoácidos entre as seqüências totais de gC de BoHV-1 e gC de BoHV-5 é de 87% e 80% respectivamente. No terço amino-terminal dessa molécula, essa relação diminui para 45% de similaridade entre nucleotídeos (Hecht *et al.*, 1995) e 23,5% entre aminoácidos (Chowdhury, 1995).

### **2.3.2 Epidemiologia**

Os herpesvirus bovinos BoHV-1 e BoHV-5, causam infecções freqüentes em rebanhos brasileiros e produzem perdas econômicas por diminuir os índices produtivos e reprodutivos e causar mortalidade de animais (Roizman *et al.*, 1992;Roehe *et al.*, 1997).

O BoHV-1 está presente em bovinos de praticamente todo o mundo, com taxas de prevalência variando consideravelmente de uma região para outra. Na Europa, a taxa de rebanhos positivos varia entre 20 a 90% (Ackermann, 2006). Entretanto, alguns países da comunidade européia como Suíça, Áustria, Dinamarca, Noruega, Suécia e Finlândia têm baixas taxas de animais soropositivos, graças a programas de vigilância epidemiológica seguidos da eliminação de animais portadores (Van Oirschot *et al.*, 1993).

Desde a década de 60, vários inquéritos sorológicos para BoHV-1 têm sido feitos no Brasil e a partir da década de 80, houve um aumento nos estudos relacionados a esse vírus, resultando em mais diagnóstico e descrição de animais infectados. Levantamentos epidemiológicos indicam que nos últimos anos, mais de 50% do rebanho de vários estados do país foram expostos ao BoHV-1(tabela7).

Cabe aqui ressaltar, que esses dados devem ser analisados com cautela, já que técnicas sorológicas não são capazes de diferenciar BoHV-1 e BoHV-5 (Metzler, Schudel e Engels, 1986; D'offay *et al.*, 1995; Oldoni *et al.*, 2004).

**Tabela 7: Estudos sorológica de BoHV-1 no Brasil**

Detecção sorológicos de BoHV- 1 no Brasil				
Referência	Técnica	Estado	n testados	Soropositividade
Galvão et al (1962)	PRNT	BA	458	34,5%
Wizigmann et.al (1972)	PRNT	RS	229	33,0%
Mueller et.al (1981)	PRNT	SP	384	42,2%
Ribeiro et al (1982)	PRNT	BA	2057	74,0%
Nogueira et.al (1986)	PRNT	RJ	21	77,8%
Pituco (1988)	PRNT	MG,PR, SP, RS	1681	22,1%
Ravazzolo et.al (1989)	PRNT	RS	526	81,8%
Langoni et al (1995)	ELISA	SP	184	49,5%
Lovato et.al (1995)	PRNT	RS	7956	18,8%
Silva et al (1995)	PRNT	PE	282	69,5%
Vidor et.al (1995)	PRNT	RS	2341	31,9%
Médici et al (1996)	ELISA	PR	150	54,0%
Tonin et al (1996)	PRNT	SP	532	40,2%
Barros Filho et al(1997)	PRNT	PR	240	27,1%
Krahl et al (1997)	PRNT	RS	1823	29,3%
Melo et al(1997)	PRNT	SE	102	96,0%
Melo et al(1999)	PRNT	PB	142	62,7%
Richtzenhain et al(1999)	ELISA	21 estados	21062	64,3%
Cerqueira et al(2000)	ELISA	BA	558	48,0%
Gregório et al(2000)	ELISA	RJ	235	56,0%
Médici et al(2000)	PRNT	PR	7397	50,8%
Dias et al (2008)	ELISA	PR	291	61,5%
Holz et al(2009)	PRNT	RS	2200	57,7%
Souza et al(2009)	ELISA	MA	156	67,5%

Estudos sorológicos para detecção de BoHV no Brasil. *Bovine herpesvirus 1 (BoHV1)*; Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA); plaque reduction neutralize test (PRNT); Número de amostras testadas (n).

As conseqüências reprodutivas associadas a altas taxas de soropositividade em diferentes regiões do Brasil e a inexistência de tratamento tornam o BoHV-1 alvo de grande importância em pesquisas de caráter epidemiológico. Além disso, medidas de controle são fundamentais para evitar a transmissão viral, que pode ocorrer por inalação de aerossóis contaminados ou por contato direto com secreções nasais de animais infectados. Ambas formas de transmissão são consideradas importantes na dispersão do vírus em rebanhos criados sob condições de confinamento (Van Drunen Littel-Van Den Hurk *et al.*, 1991; Babiuk, Van Drunen Littel-Van Den Hurk e Tikoo, 1996). A transmissão indireta ocorre principalmente pela ingestão de água e alimentos contaminados (Engels e Ackermann, 1996). Outra forma de transmissão é a venérea, pela cópula natural ou inseminação artificial (Philpott, 1993).

Vacinas atenuadas ou inativadas também têm sido usadas para controlar ou reduzir a doença e perdas associadas. Atualmente no mercado brasileiro já existem algumas vacinas que contem como antígenos BoHV-1 e BoHV-5. Para a manutenção de um alto nível imunitário são necessárias revacinações periódicas e sistemáticas. Entretanto, as vacinas comercializadas atualmente previnem o desenvolvimento de sintomas clínicos e reduzem a eliminação de partículas virais, mas não impedem a infecção viral e a latência (Del fava *et al.*, 2002)

As infecções aparentes pelo BoHV-5 apresentam características epidemiológicas peculiares, afetando animais jovens, com baixa morbidade e elevada mortalidade. A doença ocorre, geralmente, de forma esporádica, ou em surtos com uma morbidade de 0,05-30% e letalidade de 75-100%. Não apresenta caráter sazonal, atingindo principalmente animais criados em regime extensivo em pastagens e raramente em bovinos confinados (Riet-Correa *et al.*, 1989). Em função da latência e da ocorrência de infecções subclínicas, a proporção de animais que desenvolvem a forma clínica da doença não é um indicador apropriado do número de animais efetivamente infectado. (Franco *et al.*, 2007).

Vários estudos indicam que surtos de meningoencefalite associados ao BoHV-5 têm alta incidência em países da América do Sul e baixa ocorrência em países Europeus e na

América do Norte. Acredita-se que esse vírus esteja distribuído nos rebanhos bovinos do Brasil, embora, informações sobre prevalência e distribuição geográficas sejam escassas devido a reatividade sorológica cruzada com BoHV-1 (Souza *et al.*, 2002)

A meningoencefalite por BoHV-5 tem sido descrita no Rio Grande do Sul (Riet-Correa *et al.* 1989, Elias *et al.* 2004), Mato Grosso do Sul (Salvador *et al.* 1998), São Paulo (Salvador *et al.* 1998), Paraná (Halfen *et al.*, 2000), Mato Grosso (Colodel *et al.* 2002), Rio de Janeiro, Minas Gerais (Gomes *et al.* 2002) e Pará (Paula *et al.*, 2005).

Devido às semelhanças biológicas e epidemiológicas, as medidas de controle e profilaxia para o BoHV-5 são as mesmas preconizadas para BoHV-1. Não existem até o momento vacinas específicas BoHV-5 no mercado mas, com base na reatividade cruzada entre BoHV-1 e BoHV-5, vacinas contra BoHV-1 vêm sendo utilizadas no controle da meningoencefalite herpética bovina. No entanto, o nível de proteção heteróloga conferido por essas vacinas permanece indeterminado.

No Brasil estudos moleculares para BoHV já são utilizados, principalmente para caracterização de casos clínicos associados a doenças neurológicas (Silva *et al.*, 2007), genitais e respiratórias (Traesel *et al.*, 2014) assim como para a segregação molecular entre BoHV-1 e BoHV-5 (Afonso *et al.*, 2007; Esteves *et al.*, 2008; Traesel *et al.*, 2013).

A mamilite herpética bovina, que tem como agente o BoHV-2 já foi descrita em vários países e possui importante repercussão sanitária e econômica, sobretudo em gado leiteiro (Gibbs *et al.*, 1977). Rweyemamu *et al.* (1969) encontraram na Inglaterra 9,9% de bovinos soropositivos. Letchworth *et al.* (1982) relataram nos Estados Unidos, em 1974, ocorrência de anticorpos contra BoHV-2 em 9,9% (27/273) e em 1976, 9,8% (22/224). No Japão, Imai *et al.* (2005) detectaram 0,99% (18/1819) de animais soropositivos. No Brasil o vírus foi isolado pela primeira vez em 1977, a partir de lesões nas tetas de vacas leiteiras (Alice, 1977) e pouco se conhece sobre a atual situação epidemiológica desse vírus no país.

Estudos soropidemiológicos demonstraram uma prevalência de 27% (187/693) no Rio Grande do Sul, 29,8% (582/1953) nos rebanhos do Paraná (Almeida *et al.*, 2006) e

87,7% (487/555) das novilhas de corte em São Paulo (Stefano *et al.*, 2006). A alta frequência de animais portadores de anticorpos indica um contato prévio dos animais com esse vírus, visto que no Brasil não há vacina contra BoHV-2 (Stefano *et al.*, 2006).

Apesar da mamilite herpética ser uma doença autolimitante em que lesões regridem rapidamente, esse quadro aumenta a suscetibilidade das glândulas mamárias a infecções bacterianas, levando a mamilite crônica, o que pode resultar em perdas importantes devido à redução da produção de leite e tratamento das lesões. Assim, como medidas profiláticas são indicadas a higienização dos equipamentos de ordenha e combate a insetos, possíveis vetores da doença. Além disso, é importante realizar a quarentena de todos os animais introduzidos no rebanho (Franco *et al.*, 2007)

### **2.3.2 Subtipos de BoHV e patologias associadas**

São três as características básicas da infecção pelos herpesvirus: epiteliotropismo, lise celular e capacidade de latência. O vírus penetra principalmente pelas mucosas oral-nasal, genital e ocular. Nas células epiteliais dessas regiões ocorre a replicação e posteriormente a disseminação célula a célula levando a lise celular, o que ocasiona a infecção localizada. A infecção sistêmica ocorre quando partículas virais invadem linfonodos e vasos linfáticos seguidos de uma disseminação pelo organismo (Engels e Ackermann, 1996). Porém, já foi demonstrada a circulação do vírus não associada à célula, sendo detectada no soro de animais experimentalmente infectados (Kaashoek e Van Oirschot, 1996).

Durante este período inicial de infecção, as partículas virais migram para o sistema nervoso via terminações axonais dos neurônios sensitivos da região afetada e atingem os gânglios sensoriais. Na fase aguda há à lise de neurônios e células acessórias (Babiuk, Van Drunen Littel-Van Den Hurk e Tikoo, 1996) e em seguida, o vírus pode tornar-se latente. Em momentos de estresse do animal, o BoHV pode retornar ao seu ciclo de replicação desencadeando a expressão dos genes líticos, que levará ao aparecimento de novos sinais clínicos da doença (Muylkens *et al.*, 2007).

### **2.3.3 Bovine herpesvirus 1 (BoHV-1)**

A rinotraqueíte viral bovina, causada pelo BoHV-1.1, é uma patologia importante em rebanhos do mundo inteiro. Além de doença respiratória, esse agente é responsável por abortos, conjuntivite e infecções agudas em neonatos. As infecções respiratórias podem ser subclínicas ou caracterizadas por febre, dispnéia, tosse e descarga nasal, apresentando morbidade de até 100% e índice de mortalidade freqüentemente baixo (Takiuchi *et al.*, 2001).

O BoHV1.2 é associado a doença genital causando a vulvovaginite em fêmeas e a balanopostite pustular infecciosa em machos. Ambas as doenças são caracterizadas por lesões vesiculares que ulceram e são recobertas por material fibrinoso, localizados na vulva, pênis e prepúcio de bovinos (Franco *et al.*, 2007)

### **2.3.2.2 Bovine herpesvirus 5 (BoHV-5)**

O BoHV-5 é o agente etiológico da meningoencefalite ou encefalite herpética bovina, doença geralmente fatal que afeta principalmente animais jovens. Os sintomas clínicos observados nessa doença têm início com o aumento da temperatura corporal, dificuldade respiratória, depressão profunda com períodos de excitação, anorexia e fraqueza em geral. Outros sintomas como descarga ocular e/ou nasal e discreto a moderado ptialismo podem ocorrer. Após essa fase inicial, surgem os sintomas neurológicos, caracterizados por cegueira, tremores musculares, dificuldade na apreensão de alimentos ou ingestão de água, marcha para trás ou em círculos, bruxismo, paralisia da língua, movimentos de propulsão, convulsões, decúbito lateral permanente e, finalmente, morte (Riet-Correa *et al.*, 1989).

A doença neurológica pode ocorrer em forma de surtos ou acometer animais isoladamente, sendo mais comum em bezerros, sobretudo quando submetidos ao estresse da desmama e confinamento (Franco *et al.*, 2007). É possível que o BoHV-5 também possa produzir infecções genitais, visto que já foi isolado de sêmen de touros e de casos de abortos. Também já foi demonstrado que o vírus, associado a uma pequena



porcentagem de monócitos e linfócitos periféricos, pode produzir viremia transitória, sendo esta uma das possíveis explicações para a origem das infecções fetais e abortos, no entanto, estudos para definir a patogenia desse tipo de quadro ainda não foram realizados. No Brasil, pesquisas clínico-patológicas e virológicas têm demonstrado que o BoHV-5 é um importante agente da encefalite bovina, somente sendo superados em incidência pelo vírus da raiva (Franco et al., 2007).

### **2.3.2.3 Bovine herpesvirus 2 (BoHV-2)**

A mamilite herpética bovina, causada pelo *Bovine herpesvirus 2* (BoHV-2) é uma doença aguda, vesicular que afeta principalmente o úbere e tetos de vacas em lactação (Alice., 1977). Martin et al., (1996) relataram que cerca de 22% de vacas infectadas com BoHV-2 desenvolvem mastite, destacando a importância desse vírus na predisposição dessas vacas a infecções secundárias. Tal fato também foi citado por (Turner, Kovesdy e Morgan, 1976) relacionando mastites a lesões e imunossupressão provocadas pelo vírus, principalmente, em animais de primeira lactação.

Os sintomas iniciam com erupções circunscritas que progridem para vesículas, pústulas, que se rompem formando crostas e ulcerações. No entanto, a maioria das infecções por BoHV-2 são subclínicas (Letchworth e Ladue, 1982).

A conclusão do diagnóstico pelos sinais clínicos é difícil, pois outras doenças virais como a febre aftosa ou infecções por poxvírus podem causar lesões semelhantes à mamilite herpética. Por esse motivo, destaca-se a importância do diagnóstico laboratorial, bem como de dados epidemiológicos para o levantamento da circulação desse vírus na população bovina do país.

### 3.0 DIAGNÓSTICO DAS DOENÇAS VESICULARES

Devido à similaridade clínica entre si e também com a febre aftosa, o diagnóstico clínico das doenças vesiculares é sempre presuntivo, sendo o diagnóstico definitivo o laboratorial. As técnicas de isolamento viral, ELISA e soroneutralização são os testes mais usados tanto para o diagnóstico realizado pelos laboratórios de referência quanto para o realizado no contexto da pesquisa científica. A técnica de isolamento viral é considerada o padrão ouro, entretanto é laboriosa, de custo elevado e para ser executada é primordial que o material clínico esteja bem conservado, já que é imprescindível que as partículas virais estejam viáveis. Além disto, no Brasil, para alguns agentes como o VSV, a recomendação é de que o diagnóstico por isolamento seja conduzido em laboratórios nível 3 de biossegurança.

Entre os testes sorológicos, a soroneutralização é considerada padrão ouro para detecção de anticorpos neutralizantes, mas depende da manutenção de estoque de vírus e cultivo de células adequadas. A técnica de ELISA tem como característica a sensibilidade, especificidade e relativa rapidez de execução, mas os resultados devem ser analisada com cautela quando usada para diagnóstico de doenças que possuem vacina, como é o caso de BoHV e BVDV.

O BVDV pode ser isolado em uma variedade de culturas celulares bovinas, como as linhagens de células renais, pulmonares e testiculares (Bolin *et al.*, 1994). Atualmente existem vários métodos de ELISA baseados na detecção de antígenos e kits comerciais disponíveis, usados para detecção de animais com infecção persistente e normalmente quantificam os antígenos do BVDV (NS2-3) em lisados ou em leucócitos do sangue periférico (Vanderley *et al.*, 2011). A PCR multiplex é geralmente usada para a amplificação e tipagem do vírus em cultura de células ou direto de amostras de sangue (Kim *et al.*, 2003), assim como protocolos mais modernos com a utilização da RT-PCR em tempo real que permite a leitura automatizada da reação (La Rocca *et al.*, 2009).

O diagnóstico de herpes bovino pode ser feito através do isolamento viral, a partir de amostras de sêmen, como recomendado por legislação específica, do *swab* nasal, ocular ou genital. Outra possibilidade é o teste de ELISA direto, mas que geralmente apresenta baixa sensibilidade (OIE, 2010). Recentemente, vários métodos de detecção em amostras clínicas foram e continuam sendo descritos, incluindo técnicas de hibridização e PCR, que possibilitam a detecção viral também durante a fase de latência (Wang *et al.*, 2008).

A identificação do VSV pode ser feita pela fixação de complemento (Alonso, 1986), ELISA (Alonso *et al.*, 1991), imunofluorescência com anticorpos monoclonais e soroneutralização (Federer *et al.*, 1967). Além disso, métodos moleculares como a PCR também vêm sendo usados e, de maneira geral, há um esforço em escala mundial para o desenvolvimento de diagnósticos, que possibilitem um resultado mais rápido e confiável, principalmente devido a semelhança da estomatite vesicular com a febre aftosa (Belák *et al.*, 2007).

#### **4.0 JUSTIFICATIVA**

O Brasil destaca-se no cenário mundial como um dos maiores produtores e exportadores de bovinos. Entretanto, muitas doenças vesiculares podem afetar bovinos de produção causando grandes prejuízos econômicos. Entre estas doenças destacam-se a herpes bovina, estomatite vesicular e diarreia bovina viral que apresentam sintomatologia muito parecida entre si e também com a febre aftosa. Portanto, todo caso suspeito de doença vesicular, independentemente de sua origem, deve ser notificado e investigado pelo serviço veterinário oficial em um prazo de até doze horas.

Apesar do grande impacto econômico que provocam, ainda são escassas as informações literárias disponíveis sobre a circulação de *Bovine viral diarrhea virus*, *Vesicular stomatitis virus* e *Bovine herpesvirus* no Brasil. Muitas questões epidemiológicas importantes para a bovinocultura do país ainda permanecem em aberto. Pouco se sabe sobre a situação epidemiológica e distribuição

geográfica de BoHV , VSV e BVDV. A diversidade de genótipos virais mais freqüentes no país também é pouco conhecida.

A maioria das técnicas utilizadas atualmente para trabalhos epidemiológicos das doenças vesiculares são embasadas em métodos clássicos da virologia, como isolamento viral e técnicas sorológicas. Essas técnicas são, na maioria das vezes, laboriosas e com problemas freqüentes de especificidade e sensibilidade o que dificulta o diagnóstico diferencial dos agentes virais e, portanto os levantamentos epidemiológicos.

Para um estudo mais abrangente da epidemiologia desses vírus no Brasil, foram utilizadas técnicas moleculares para detecção e caracterização de VSV, BoHV1/5, BoHV2 e VSV em amostras coletadas em vários estados brasileiros durante os anos de 2012 a 2014.

Os dados gerados forneceram informações relevantes para a vigilância epidemiológica destes vírus em rebanhos bovinos brasileiros, permitindo assim, uma melhor compreensão da prevalência, genótipos e subgenótipos mais freqüentes e a distribuição geográfica desses agentes virais no país.

## **5.0 OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivos gerais**

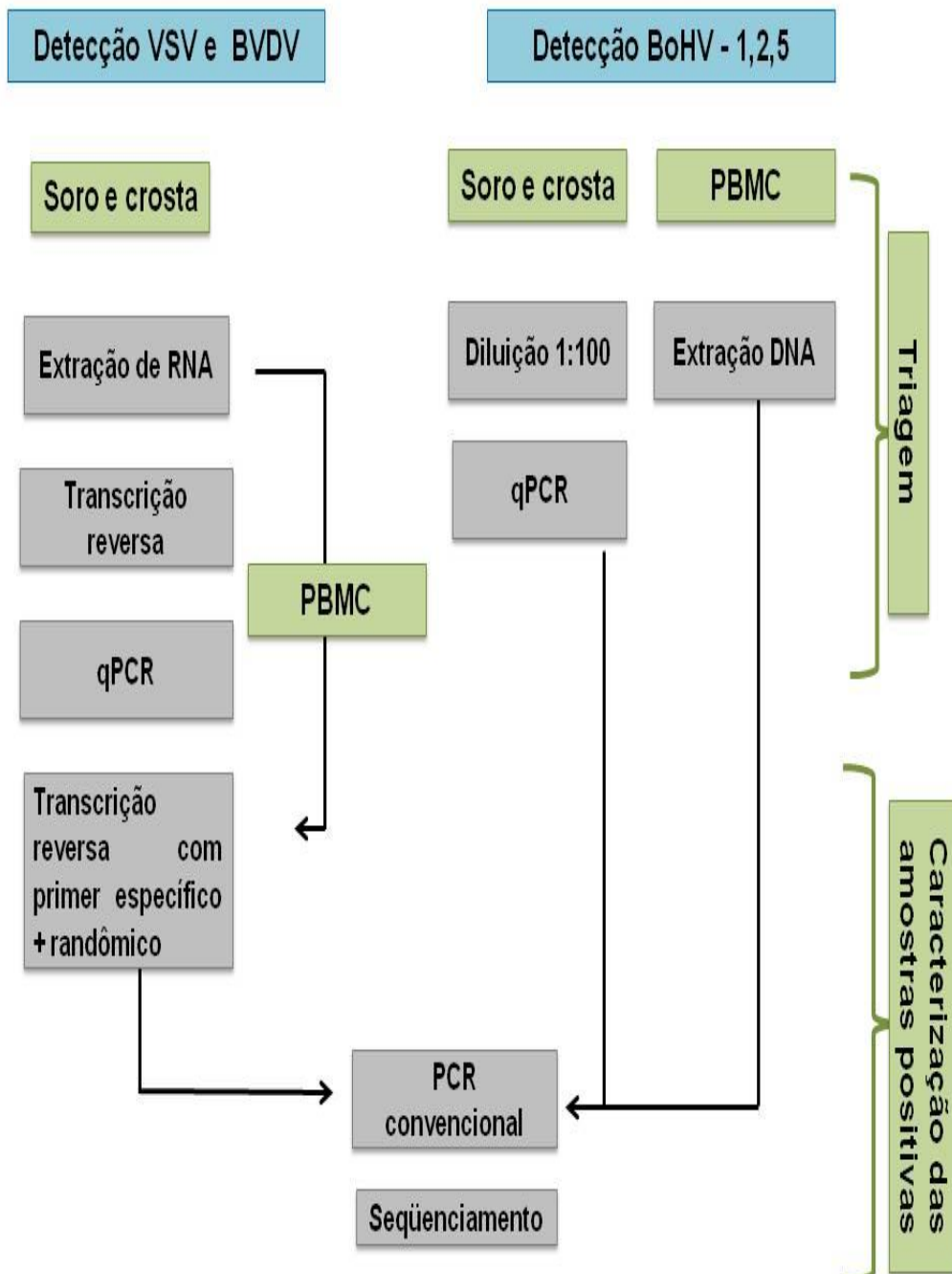
- Realizar um estudo epidemiológico molecular para *Bovine viral diarrhea virus*, *Vesicular stomatitis vírus*, *Bovine herpesvirus 1*, *Bovine herpesvirus 2* e *Bovine herpesvirus 5* em bovinos alguns estados brasileiros

### **5.2 Objetivos específicos**

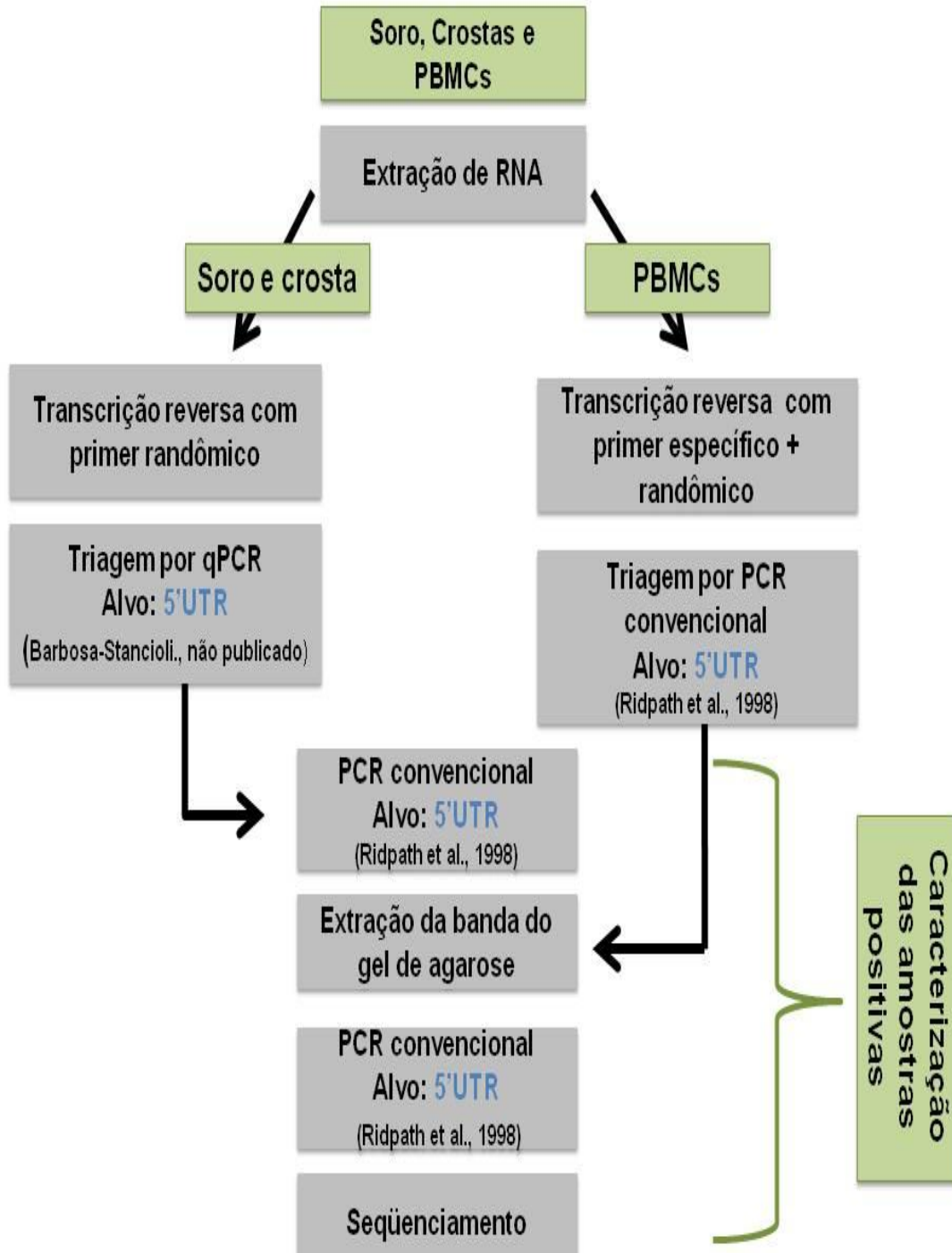
- 1) Utilizar de uma plataforma de qPCR para detecção dos vírus BVDV, VSV e BOHV em um banco de amostras clínicas proveniente de diferentes regiões geográficas brasileiras.
- 2) Padronizar reações de PCR convencional para amplificar fragmentos gênicos das amostras classificadas como positivas pela triagem por qPCR.
- 3) Caracterizar molecularmente e realizar análises filogenéticas dos genótipos/sorotipos de BVDV, VSV e BoHV mais freqüentes no país.
- 4) Mapear a distribuição geográfica das amostras positivas no território nacional nos anos de 2012 , 2013 e 2014.

## 6.0 ESTRATÉGIA DE TRABALHO

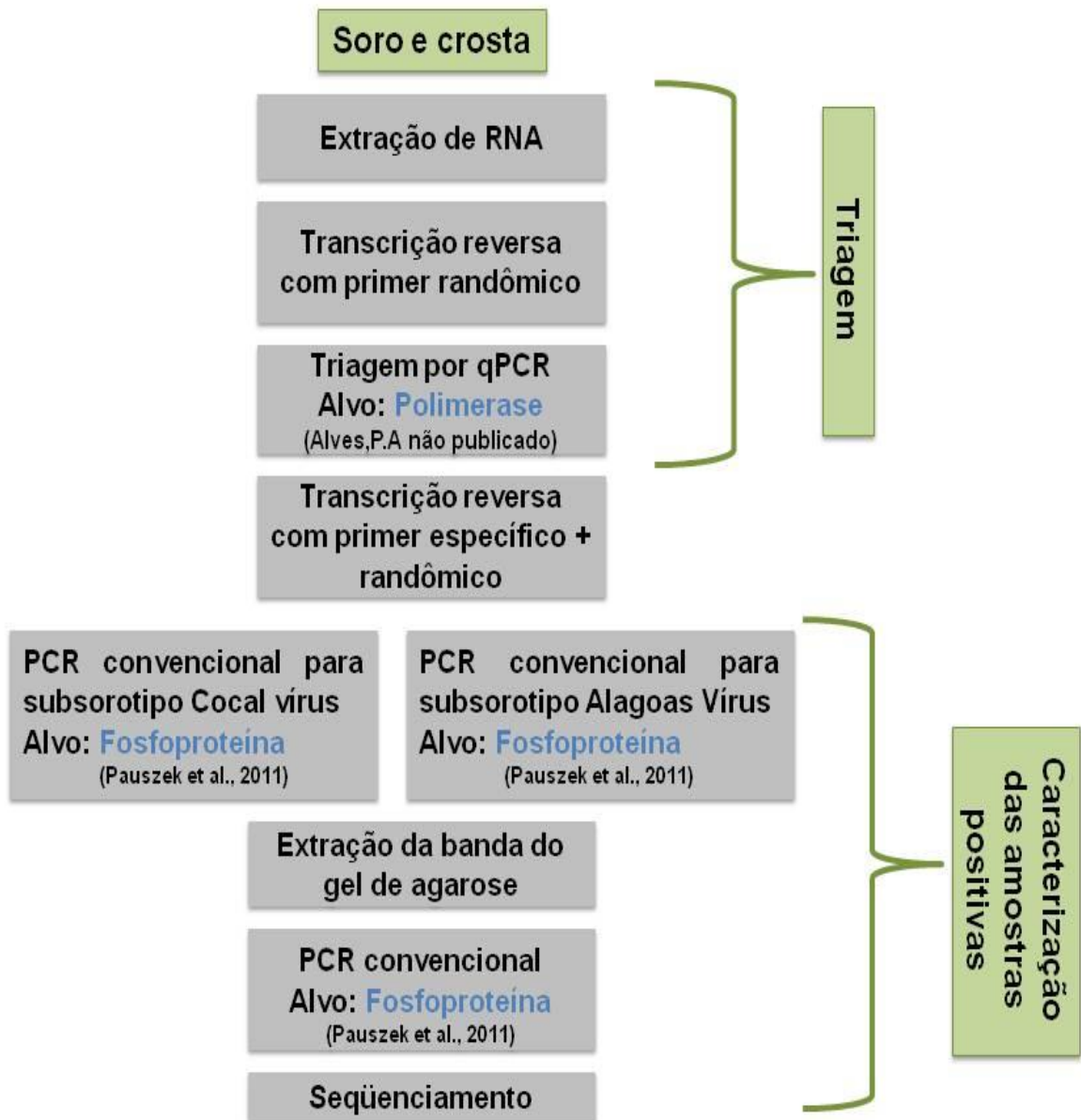
Para a triagem e caracterização dos vírus avaliados neste projeto seguiu-se a estratégia de trabalho apresentada a seguir.



## 6.1 Estratégia específica para detecção de BVDV

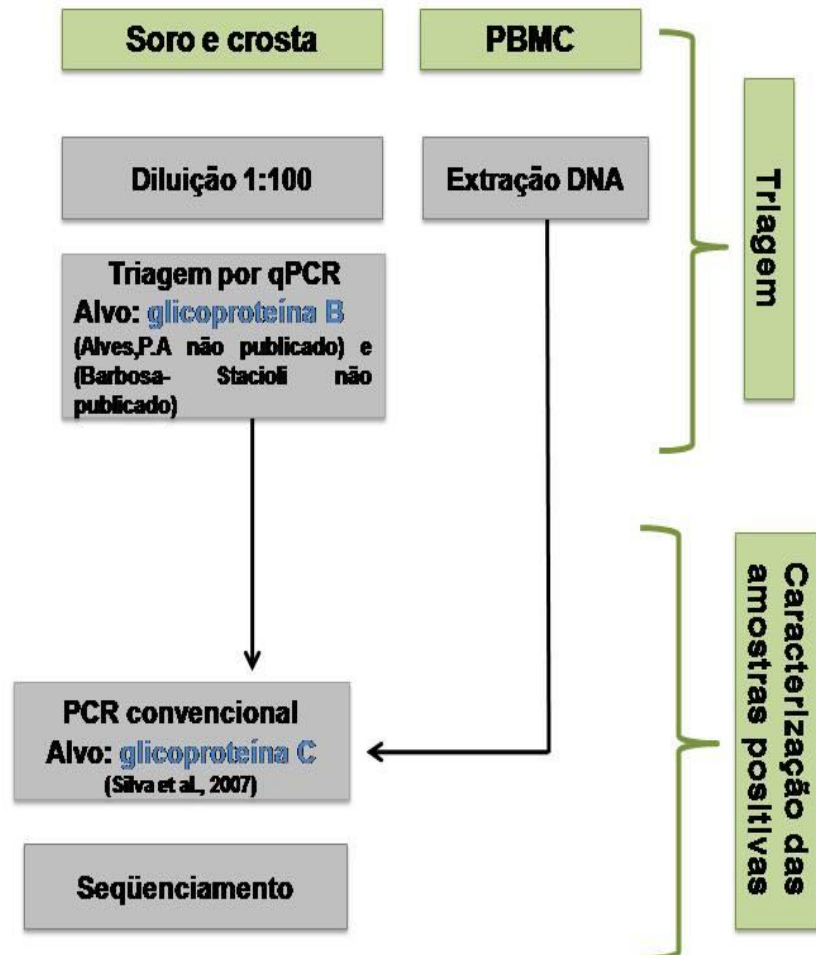


## 6.2 Estratégia específica para detecção de VSV





### 6.3 Estratégia específica para detecção de BoHV



## 7.0 METODOLOGIA

### 7.1. Banco de Amostras

O banco foi composto de 240 amostras, sendo 127 soros e 15 crostas coletadas no período de 2012 e 2013 nos estados da Bahia, Espírito Santo e Goiás, além de 98 amostras de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de bovinos coletados no período de 2013 e 2014 no estados de Minas Gerais.

As amostras de soro e crostas pertencem ao laboratório de Vírus do ICB/UFMG e foram recebidas para o diagnóstico de *Poxvirus*. Já os PBMCs são provenientes da Escola de Veterinária da UFMG, da cidade de Pompéu (MG) e de um abatedouro localizado na região metropolitana de Belo Horizonte.

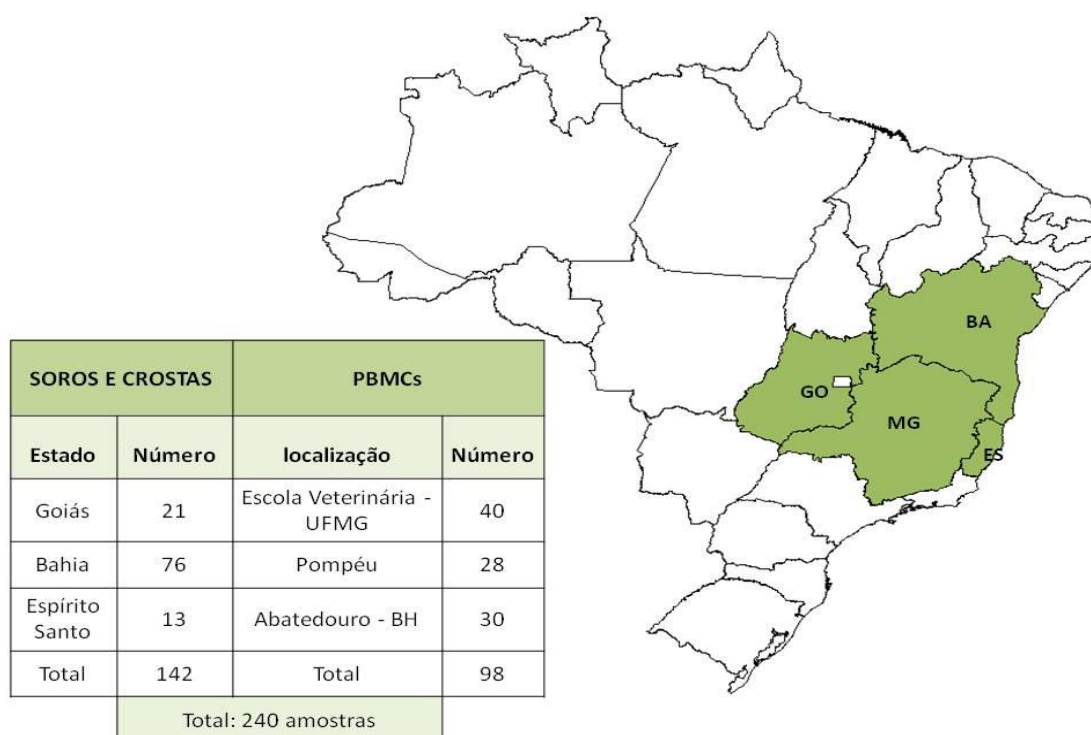


Figura 6 - Distribuição geográfica das amostras analisadas.

## **7.2. Diluição das amostras**

Somente para detecção de BoHV não foi feita a extração de DNA. As amostras de soro foram diluídas 1:100 em tampão salina fosfato (PBS) pH7.4. As crostas foram maceradas manualmente com um pistilo e posteriormente diluídas 1:100 em PBS 2X , pH 7.4

## **7.3. Fracionamento das células sanguíneas para obtenção dos PBMCs**

Foram coletados cerca de 4 mL de sangue total de cada animal, em tubos com anticoagulante EDTA e as células foram fracionadas por densidade através da centrifugação com Ficoll Paque (Life science). Inicialmente o sangue foi diluído na proporção 1:1 em PBS 1x. Em seguida 8 mL de Ficoll foram adicionados a amostra e centrifugados por 30 minutos a 400 x g. As células de interesse foram coletadas. Posteriormente foram adicionados 10 mL de PBS 1x e centrifugados a 300 x g por 10 minutos, o sedimento foi coletado e suspenso em 1 mL de PBS 1x.

## **7.4. Extração de DNA**

A extração de DNA foi feita pelo método de extração com fenol, clorofórmio e álcool isoamílico (Sambrook, 1989), com modificações. Foram acrescentados 100 µL de material a igual quantidade da preparação fenol, clorofórmio e álcool isoamílico (25:24:1). Após agitação por 10 segundos, a mistura foi então centrifugada a 16.000 x g por 1 minuto em microcentrífuga à temperatura ambiente. A fase aquosa foi transferida para microtubos novos, onde foram adicionados 10% do volume coletado na fase anterior de acetato de sódio 3M pH 5,2 e 2,5 volumes de etanol absoluto gelado. O material foi homogeneizado suavemente e incubado em banho de gelo por 5 minutos. A mistura foi então

centrifugada a 16.000 x g por 5 min em microcentrífuga à 4°C. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado ao todo 1 mL de etanol 70%. Em seguida o material foi centrifugado a 16.000 x g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido e após a evaporação completa do álcool foram adicionados 50µL de água de injeção. O DNA foi armazenado a -20°C.

## **7.5 Extração de RNA total**

A extração de RNA total de soros, crostas e PBMCs foi feita com Trizol® Products LifeTechnologies. Para cada 300 µL de amostra (soro e crosta macerada) ou 10<sup>6</sup> células de PBMCs foram adicionados 700 µL de trizol e incubada à temperatura ambiente por 5 minutos. Para a separação das fases, foram adicionados a mistura 200µL de clorofórmio, com posterior incubação à temperatura ambiente por 10 min. Na seqüência as amostras foram centrifugadas a 12.000g por 15 minutos à 4°C. A fase aquosa, que continha o RNA foi transferida para um novo tubo. Para a precipitação do RNA foram adicionados 500µL de isopropanol e incubados à temperatura ambiente por 10 minutos. Novamente as amostras foram centrifugadas a 12.000g por 15 minutos à 4°C. Na seqüência foi feita a remoção do sobrenadante e lavagem do precipitado com 1 mL de etanol a 75%, seguida de uma centrifugação a 7.500g por 5 minutos à 4°C. O sobrenadante foi removido. Para que o precipitado secasse o tubo permaneceu vertido a temperatura ambiente por 5 a 10 minutos. Para a suspensão do ácido nucléico foram adicionados 50µL de água livre de RNase/DNase (água DEPC) seguida de uma incubação em banho-maria por 10 minutos à 56°C. Esse material extraído foi usado para produção do DNA complementar (cDNA).

## 7.6 Transcrição reversa

O RNA extraído foi usado como molde para a produção de uma cadeia complementar de DNA (cDNA). Para isso, aproximadamente 5 µg do material extraído foi incubado com iniciadores aleatórios (hexâmeros- Promega Corporation-EUA) a 70°C por 5 minutos. Em seguida foram adicionados 4,0µL de tampão de RT-PCR 5X (Tris a 250mM pH 8.9, MgCl<sub>2</sub> a 15mM, KCl a 375mM, DTT a 50mM), 2,0µL de dNTP (10mM) e 1,0µL (200U) de enzima M-MLV RT (200U/µL) (Promega Corporation-EUA). Essa mistura foi incubada por 1 hora a 37°C. O cDNA produzido foi usado para a PCR em tempo real

### 7.6.1 Transcrição reversa com iniciadores específicos

Para aumentar o desempenho das reações de PCR convencional o cDNA para amplificação de BVDV e VSV foram feitos com iniciadores específicos. Foram testadas duas condições:

Condição 1 - 500 ng de primer específico

para BVDV: iniciador antisense descrito por Ridpath *et al.*, 1998

para VSV: iniciador senso descrito Pauszek *et al.*, 2011

Condição 2: 250 ng de iniciador aleatório (hexâmeros) + 250 ng de primer específico

- Temperatura de pareamento dos iniciadores a 42°C por 1 hora

## 7.7 Triagem das amostras de crosta e soro por PCR em tempo real

A plataforma de qPCR foi desenvolvida e padronizada como parte do projeto de doutorado do aluno Pedro Augusto Alves.

Na tabela a seguir são mostrados os dados referentes aos iniciadores utilizados, regiões gênicas, tamanhos dos fragmentos amplificados e sensibilidade de cada reação.

**Tabela 8 - Característica dos iniciadores utilizados na reação de PCR em tempo real**

Vírus	Região alvo	Amplificado (pb)	Referência	Temperatura de dissociação	Sensibilidade da reação
BVDV	5'UTR	160	Barbosa-Stancioli, não publicado	82°C	0,1 fentograma
VSV	Polimerase	76	Alves, P.A, não publicado	79°C	1,0 fentograma
BoHV1/5*	Glicoproteína B	97	Barbosa-Stancioli, não publicado	85°C	1,0 fentograma
BoHV 2	Glicoproteína B	82	Alves, P.A, não publicado	82°C	1,0 fentograma

Região alvo, tamanho do produto amplificado, referência, temperatura de dissociação e sensibilidade de cada reação de PCR em tempo real (qPCR). Pares de base (pb); *Bovine Herpesvirus 1 e 5* (BoHV1/5); *Bovine Herpesvirus 2*; *Vesicular Stomatitis virus* (VSV); Região 5' não traduzida (5'UTR);

\* iniciadores não capazes de diferenciar BoHV-1 e BoHV-5.

A PCR em tempo real foi desenvolvida para cada alvo separadamente. Para as reações de amplificação foi utilizado o Master Mix comercial (SYBR Green® PCR Master Mix, Applied Biosystems) e as seguintes concentrações de reagentes:

### **Concentração dos reagentes**

Master mix	5 $\mu$ L
Primer senso	800 nM
Primer antisenso	800 nM
DNA	2 $\mu$ L
agua q.s.p	10 $\mu$ L

A ciclagem da qPCR tem uma temperatura inicial de 95°C, seguida de 45 ciclos de desnaturação, pareamento e extensão a 95°C por 15"; 60°C por 60" e 60°C por 60", respectivamente.

Todas as reações foram amplificadas no termociclador *StepOne*® da Applied Biosystems e os dados de detecção analisados pelo *software StepOne*® versão 2.1 da Applied Biosystems.

### **7.8 Padronização da qPCR para detecção de BVDV em PBMC**

Para verificar o comportamento da qPCR na matriz de PBMC, foi utilizados PBMCs com adição de contaminação deliberada por BVDV em três diluições virais diferentes e PBMCs sem a contaminação.

Uma quantidade inicial de 10  $\mu$ L de sobrenadante celular infectado com a amostra BVDV1-NADL, sem título definido, foi diluído em PBS 1x de forma seriada na base 10. Em seguida 10  $\mu$ L de cada diluição foram usados pra contaminar deliberadamente 100  $\mu$ L de PBMC ( $10^6$  cel/ mL). Logo após, foram feitas as extrações de RNA, transcrição reversa e qPCR.

## **7.9 Padronização da qPCR para detecção de VSV em PBMC**

Para a análise do comportamento da qPCR usando PBMC, foi feita uma reação com cDNA de PBMCs sem contaminar e com adição de contaminação deliberada com a amostra viral VSV IND-I, ATCC VR-1238 (Indiana Lab V-520-001-522).

Foram testados vírus nos títulos de  $10^4$  a  $10^1$  PFU/  $\mu$ L e também PBMCs contaminados com até  $10^2$  PFU/  $\mu$ L

## **7.10 Padronização da qPCR para detecção de BoHV 1/5 em PBMC**

A análise do comportamento da qPCR para a matriz de PBMC foi iniciada pela verificação da quantidade ideal de DNA a ser utilizada. Para isso, foram testadas 5, 10 e 50ng de DNA de PBMC sem adição de contaminação deliberada por BoHV.

Na próxima etapa foram utilizados PBMCs contaminados deliberadamente com a amostra viral BoHV-1 Colorado, sem título definido. Uma quantidade inicial de 100  $\mu$ L de sobrenadante celular infectado com vírus foi diluído em PBS 1x de forma seriada na base 10. Em seguida 10  $\mu$ L de cada diluição foi usado pra contaminar 100  $\mu$ L de PBMC ( $10^6$  cel/ mL). Para a qPCR foram analisados amostras contaminadas com vírus diluído 10x, 20x, 30x, 40x e 50x

## **7.11 Critério para análise das reações de PCR em tempo real**

Com base em resultados obtidos durante a padronização da plataforma de PCR em tempo real, os seguintes critérios foram usados para a análise dos resultados:

- Foram consideradas somente as reações em que não houve amplificação específica no controle negativo.



- Foram definidas como positivas as amostras que tiveram a temperatura de dissociação igual ou com até 3°C de diferença em relação ao controle positivo.
- Foram consideradas negativas as amostras que não amplificaram ou tiveram um *cycle threshold* (ct) superior ao limite de detecção da sua respectiva reação.
- Foram classificadas como indeterminadas as que a reações tiverem a temperatura de dissociação diferente dos controles positivos.

### **7.12 Controles usados nas reações de PCR em tempo real**

Os controles positivos de todas as reações foram plasmídeos, produzidos durante o desenvolvimento da plataforma de PCR em tempo real pelo Aluno Pedro Augusto Alves.

Para produção dos controles as seguintes amostras virais foram usadas:

- Para BVDV foi usado como referência a amostra BVDV-NADL, cedida pela Profa. Dra. Zélia Inês Portela Lobato da Escola de Veterinária da UFMG. Essa amostra foi obtida na ATCC (ATCC VR-1422) e representa o protótipo da espécie *Bovine viral diarrhoea virus 1*.
- A amostra de VSV IND-1 usada como referência, pertence ao Laboratório de Vírus do Instituto de Ciências Biológicas UFMG e corresponde à amostra ATCC VR-1238 (Indiana Lab V-520-001-522).
- Para BoHV foi utilizada a amostra padrão Colorado (ATCC 864, proveniente do pulmão de um bovino com infecção respiratória) cedida pela Profa. Edel Figueiredo Barbosa Stancioli do Departamento de Microbiologia do ICB-UFMG.

Em todas as reações água de injeção foi utilizada como controle negativo.

### **7.13 PCR convencional**

A PCR convencional foi usada para a caracterização das amostras de soro e crostas positivas na qPCR bem como para a detecção dos vírus em PBMC.

Algumas reações necessitaram ser padronizadas, e isso foi feito através do teste de diferentes concentrações e temperatura de pareamento dos iniciadores (tabela 9).

	BVDV	VSIV	VSIV 2	VSIV 3	BoHV 1/5
Alvo:	5'UTR	fosfoproteína	fosfoproteína	fosfoproteína	glicoproteína C
Referência:	Ridpath et al., 1998	Pauszek et al., 2011	Pauszek et al., 2011	Pauszek et al., 2011	Silva et al., 2007
produto	282 pb	658 pb	544 pb	565 pb	BoHV1- 653 pb / BoHV5 - 589 pb

#### Reagentes

Tampão 10x	2,0 µL	2,0 µL	2,0 µL	2,0 µL	2,0 µL
MgCl <sub>2</sub>	1,5mM	1,5mM	1 mM	1 mM	1 mM
dNTP	20mM	20mM	2,5 mM	2,5 mM	2,5 mM
Taq polimerase	2,5 U	2 U	0,75 U	0,75 U	0,75 U
Primer senso	4 pMol	6 e 10 pMol	5 pMol	5 pMol	5 pMol
Primer antisenso	4 pMol	6 e 10 pMol	5 pMol	5 pMol	5 pMol
Água	q.s.p 25 µL	q.s.p 20 µL	q.s.p 20 µL	q.s.p 20 µL	q.s.p 20 µL
DNA/cDNA	2 µL	2 µL	2 µL	2 µL	2 µL
Volume final	25 µL	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL

#### Ciclagem da reação

Temperatura (°C)	e Tempo (min)		Ciclagem da reação					
Aquecimento inicial	95°C	10 min	95°C	95°C	95°C	95°C	95°C	5 min
Desnaturação	95°C	1 min	95°C	95°C	95°C	95°C	95°C	1 min
Pareamento	42°C, 45°C, 48°C e 52°C	1 min	45°C, 48°C, 50°C, 55°C e 60°C	48°C	44°C	44°C	55, 60, 65, 70°C	1 min 30 X
Extensão	72°C	1min	72°C	72°C	72°C	72°C	72°C	1min
Extensão final	72°C	10 min	72°C	72°C	72°C	72°C	72°C	7 min

Região alvo, tamanho do produto amplificado, referência, tamanho do produto amplificado, reagentes e ciclagem usadas em cada reação de PCR convencional. Pares de base (pb); *Bovine Herpesvirus 1 e 5* (BoHV1/5); *Bovine Herpesvirus 2*; *Vesicular Stomatitis virus* (VSV); *Vesicular Stomatitis virus sorotipo 2* (VSV 2); *Vesicular Stomatitis virus sorotipo 3* (VSV 3); Região 5' não traduzida (5'UTR);

## 7.14 PCR convencional com a enzima Taq Hot Start

A PCR com a enzima Go taq Hot start Colorless Master Mix (Promega, Madison, WF, EUA) foi utilizada como estratégia para melhor amplificação de reações que não apresentaram bom desempenho na PCR com reagentes caseiros (tópico 7.13).

As reações foram executadas conforme as condições preconizadas pelo fabricante (tabela 10). Os iniciadores utilizados foram os mesmos descritos na tabela 9.

Reagentes	Quantidade	Ciclagem da reação		
		Etapa	Temperatura	Tempo
Master Mix	10 µL	Aquecimento inicial	95°C	10 min
Primer senso	10 pM	Desnaturação	95°C	1 min
Primer antisenso	10 pM	Pareamento	48°C	1 min
Água	6 µL	Extensão	72°C	1min
cDNA	2 µL	Extensão final	72°C	10 min
Volume final: 20 L				

30 vezes

## 7.15 Padronização da PCR convencional para detecção de BVDV em PBMC

Para a padronização da PCR convencional foi utilizado como controle positivo o sobrenadante de células infectadas com diferentes amostras de BVDV. Essas amostras são vírus isolados de surtos de BVDV e cedidas pelo professor Eduardo Furtado Flores da Universidade Federal de Santa Maria, RS. A temperatura de pareamento dos iniciadores foi analisada através de um gradiente que variou de 42°C a 52°C.

### **7.16 Controles usados nas reações de PCR convencional**

Os controles positivos de todas as reações foram utilizados vírus (partículas viral total) multiplicados em células de linhagem contínua.

- Para BVDV foi usado como referência a amostra BVDV-NADL, cedida pela Profa. Dra. Zélia Inês Portela Lobato da Escola de Veterinária da UFMG. Essa amostra foi obtida na ATCC (ATCC VR-1422) e representa o protótipo da espécie *Bovine viral diarrhea virus 1*.

- Para BoHV foi utilizada a amostra padrão Colorado (ATCC 864, proveniente do pulmão de um bovino com infecção respiratória) e para BoHV 5 foi usada a amostra SV507/99, ambas cedidas pela Profa. Edel Figueiredo Barbosa Stancioli do Departamento de Microbiologia do ICB-UFMG.

- Para VSV sorotipo 1 foi usada a amostra VSV Indiana (ATCC VR-1238), pertencente a coleção do Laboratório de Vírus do ICB/ UFMG. Não há controles para VSIV-2 nem para VSIV-3.

Em todas as reações água de injeção foi utilizada como controle negativo.

### **7.17 Fracionamento dos produtos de PCR por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)**

Os produtos de PCR foram fracionados em gel de poliacrilamida 8% (1,86 mL de acrilamida/ bisacrilamida, na proporção de 29:1, 1,40 mL de Tris Borato Ácido etilenodiaminotetracético (TBE), 10% de persulfato de amônio, 7 µL de tetrametiletilenodiamina (TEMED) e 3,74 mL de H<sub>2</sub>O). O fracionamento foi feito a 100 V, em tampão de corrida TBE 1X (0,089M tris-acetato, 0,089M ácido bórico, 0,002M ácido etilenodiaminotetracético). Para a coloração, foi empregado o método com o nitrato de prata conforme protocolo descrito pelo fabricante (BIORAD): os géis foram fixados em solução fixadora A (40% metanol, 10% ácido acético, v/v) e solução fixadora B (10% etanol, 5% ácido acético v/v) seguida de incubação com solução oxidante (bicromato de potássio 0,034 M, ácido nítrico 0,032 M) por 5 minutos. Os géis foram corados com

nitrito de prata (0,6 g/300 ml de água) por 20 minutos e lavados com água deionizada por 1 minuto, acrescentando-se posteriormente a solução reveladora (5,9 gramas de carbonato de sódio, 0,1 gramas de paraformaldeído em 200mL de água) por 5 minutos. A reação foi interrompida pela adição de solução de ácido acético 5% e os fragmentos visualizados e fotografados.

### **7.18 Extração de produto de PCR a partir de gel de poliacrilamida**

Os produtos da PCR foram extraídos a partir de gel de poliacrilamida já secos. As bandas de interesse foram cortadas e picotadas em uma placa de petri e os fragmentos transferidos para microtubos no qual foram ressuspensos em 30  $\mu$ L de água livre de RNase e DNase (DEPEC). Em seguida as amostras foram mantidas a 56°C por 15 minutos e incubadas a 4°C *over night* a. As amostras foram centrifugadas a 16.000 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi usado para uma nova PCR.

### **7.19 Purificação dos produtos de PCR**

Para cada 45 $\mu$ L de produto de PCR foram adicionados 11,25  $\mu$ L de EDTA (125mM, pH 8.0) e 135  $\mu$ L de etanol absoluto. Essa mistura foi centrifugada a 16.000 x g, por 25 minutos a temperatura ambiente. Em seguida o sobrenadante foi descartado, 120  $\mu$ L de etanol 70% foi adicionado ao tubo e novamente centrifugado a 16.000 x g por 10 minutos. Após o sobrenadante ser completamente descartado e evaporado, 10  $\mu$ L de água foram usados para eluir o material purificado. Para otimizar essa etapa o material foi deixado em banho maria por 15 minutos a 37°C.

## 7.20 Seqüenciamento e inferências filogenéticas

Os fragmentos obtidos foram seqüenciados pelo método de didesoxirribonucleotideo (Sanger, 1977) em seqüenciador automático capilar ABI 3500 utilizando o Kit Big Dye terminator, no Núcleo de Análise de Genoma e Expressão Gênica (NAGE) do ICB/UFMG, obedecendo as condições de reação e leitura indicadas pelo fabricante. Cada fragmento foi seqüenciado seis vezes, sendo três vezes em cada orientação. As seqüências obtidas do mesmo fragmento foram sobrepostas para gerar uma única seqüência consenso utilizando a plataforma Asparagin-Cenargen - EMBRAPA, 2010. Cada sequencia consenso foi comparada à seqüências depositadas no banco de dados do "GenBank" (National Center for Biotechnology Information - NCBI) utilizando a plataforma Blast 2.0 (<http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST>) (Altsuchl *et al.*, 1990). Para busca de sequencias similares foi utilizado o algoritmo BlastN.

Para realização das análises filogenéticas, cada uma das seqüências consenso foi alinhadas com sequencias do Genbank que atenderam a valores satisfatórios de cobertura, e-value e score. Por fim, a árvore filogenética foi construída utilizando o programa MEGA 6.0.

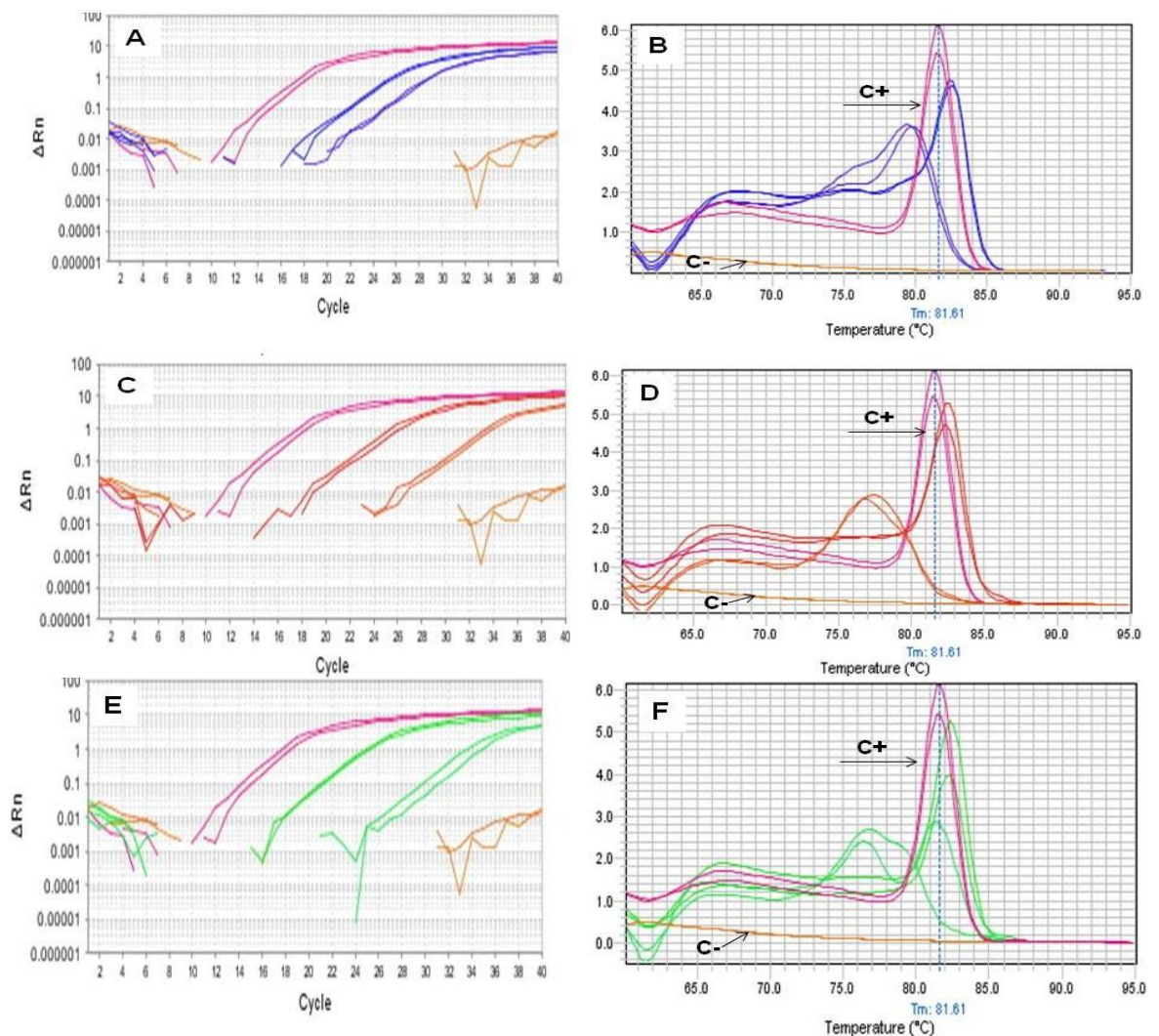
Para a análise filogenética dos BVDVs detectados foi utilizado um fragmento de 282 pb (Ridpath *et al.*, 2011) da região 5'UTR pelo algoritmo Neighbor-joining , modelo kimura 2 parâmetrose e 1000 réplicas de bootstrap . A inferência foi feita de modo a incluir seqüências nucleotídicas dos genótipos e subgenotipo de BVDV-1, BVDV-2, BVDV-3 depositadas no GenBank.

## 8.0 RESULTADOS para BVDV

### 8.1.0 Padronização da transcrição reversa

Para verificar se os iniciadores usados na transcrição reversa poderiam influenciar na sensibilidade e rendimento da reação, os PBMCs foram contaminados deliberadamente com duas amostras virais, designadas A e B. Após a contaminação e a extração o cDNA foi produzido com iniciadores randômicos e/ou específicos e em seguida, usados na PCR convencional e qPCR.

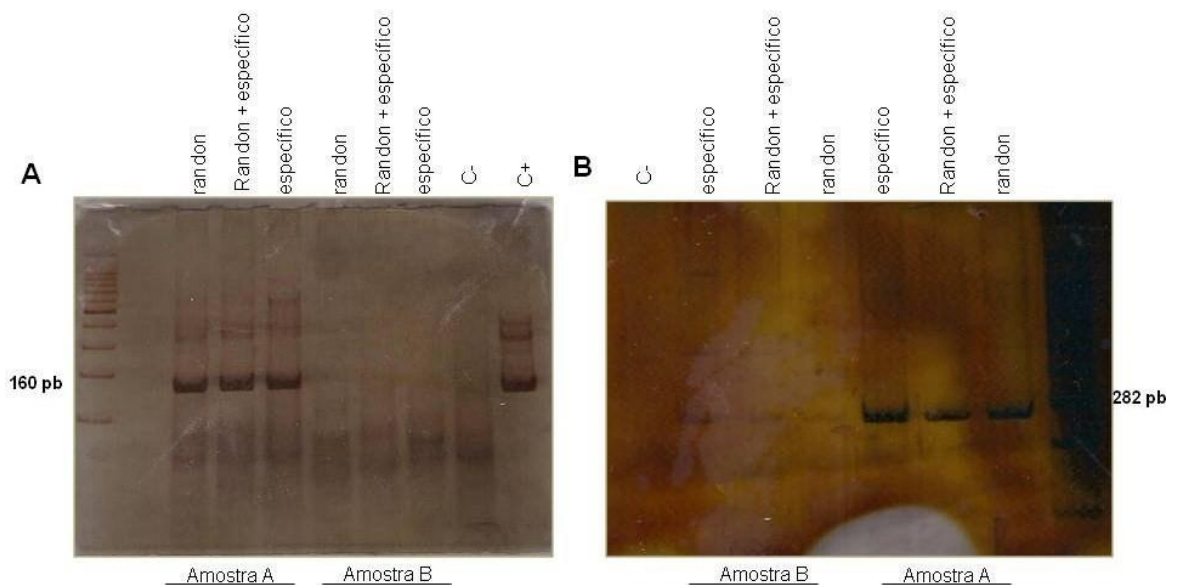
Na qPCR os PBMCs contaminados com a amostra A tiveram uma temperatura de dissociação similar ao controle positivo em todas as condições analisadas. Já a amostra B apresentou uma curva de dissociação com temperatura e perfil diferente do controle positivo. Esses dados são ilustrados na figura a seguir.





**Figura 7 - Padronização da transcrição reversa para detecção de BVDV a partir de PBMC.** Ciclo de amplificação e curva de dissociação do cDNA produzido com iniciadores específicos (A, B), randômicos (C,D) e uma associação de iniciadores específicos e randômicos (E,F). A amostra A apresentou uma curva de dissociação mais a direita e a B mais a esquerda em todas as condições. Os controles positivos e negativos foram plasmídeo contendo a sequencia alvo da reação e água de injeção, respectivamente.

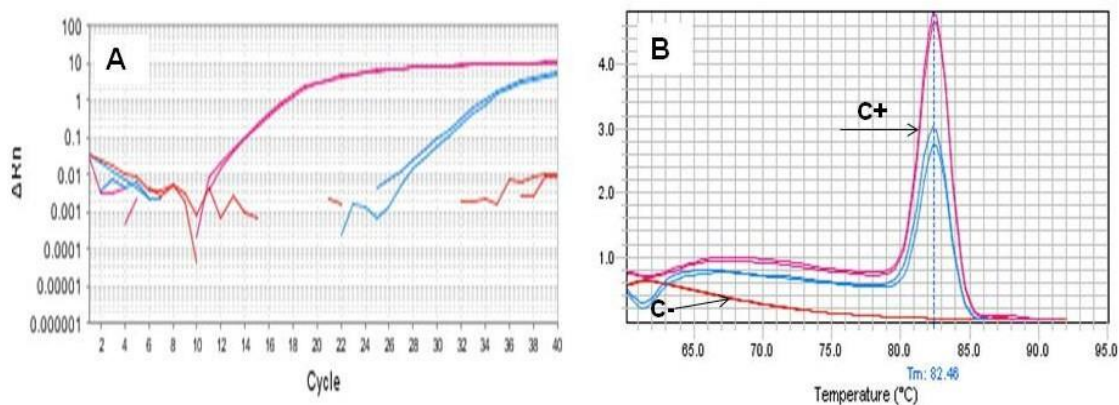
Na comparação dos resultados obtidos pelas duas técnicas, no qual são esperados amplificações de 160 pb para qPCR e 282 pb para PCR convencional, os PBMCs que receberam a contaminação pela amostra A tiveram amplificações de forte intensidade condizente com o fragmento esperado nas duas reações e em todas as variáveis analisadas. Já a amostra B não apresentou produtos visíveis na qPCR, mas obteve amplificações de fraca intensidade na PCR convencional.



**Figura 8 –Comparação da eficiência da transcrição reversa na qPCR e PCR convencional.** Eletroforese em gel de poliacrilamida 8%. Figura A produtos da PCR convencional e na figura B os da qPCR, que geram produto de 282pb e 160 pb, respectivamente. Acima das canaletas estão indicados os iniciadores usados na transcrição reversa iniciadores: randômicos (randon), randômicos e específicos (randon+ especifico) e específicos (especifico). Na parte inferior das figuras estão indicadas as amostras correspondentes. Foram utilizados como controle positivo (C+) e negativo(C-) amostra viral NADL e água de injeção, respectivamente. Marcador de tamanho molecular 100pb.

### 8.1.2 qPCR em amostras de soro e crosta

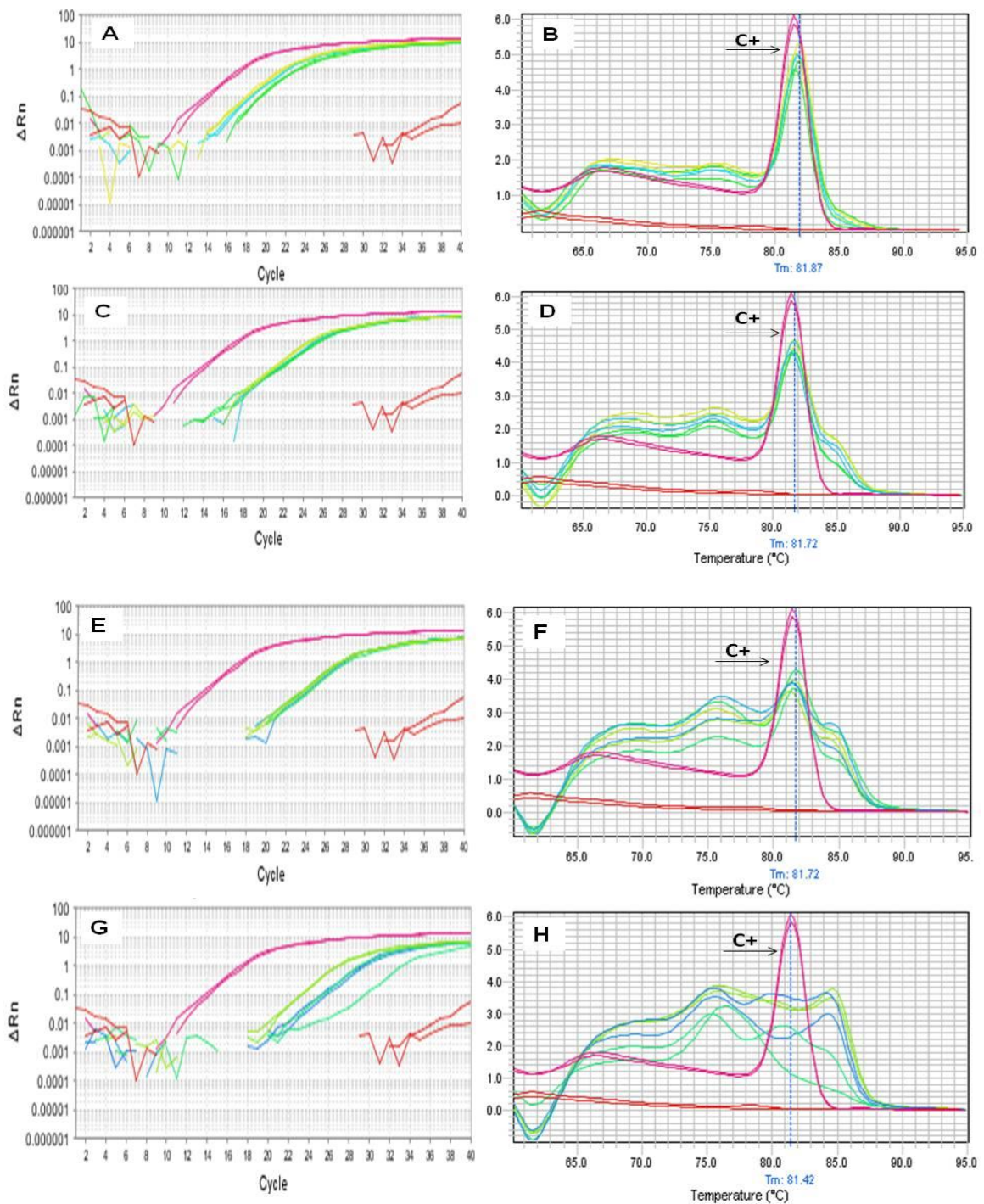
A plataforma de qPCR foi padronizada para triar amostras de soro e crosta. Para demonstrar a eficiência dessa ferramenta para essas matrizes, é mostrado a seguir o perfil de uma amostra positiva, na qual foi detectada a amplificação no ciclo 22 da reação e que apresentou uma temperatura de dissociação de 82°C, semelhante ao controle positivo que corresponde a 0,1ng de plasmídeo com a sequência alvo para BVDV. Além disso, a amostra gerou uma curva de dissociação com formato bem definido, similar ao controle positivo (figura 9).



**Figura 9 - Perfil de amostra de soro positiva para BVDV na qPCR.** Ciclo de amplificação (A) e curva de dissociação(B) de uma amostra de soro positiva para BVDV

### 8.1.3 Padronização da qPCR para a matriz de PBMC

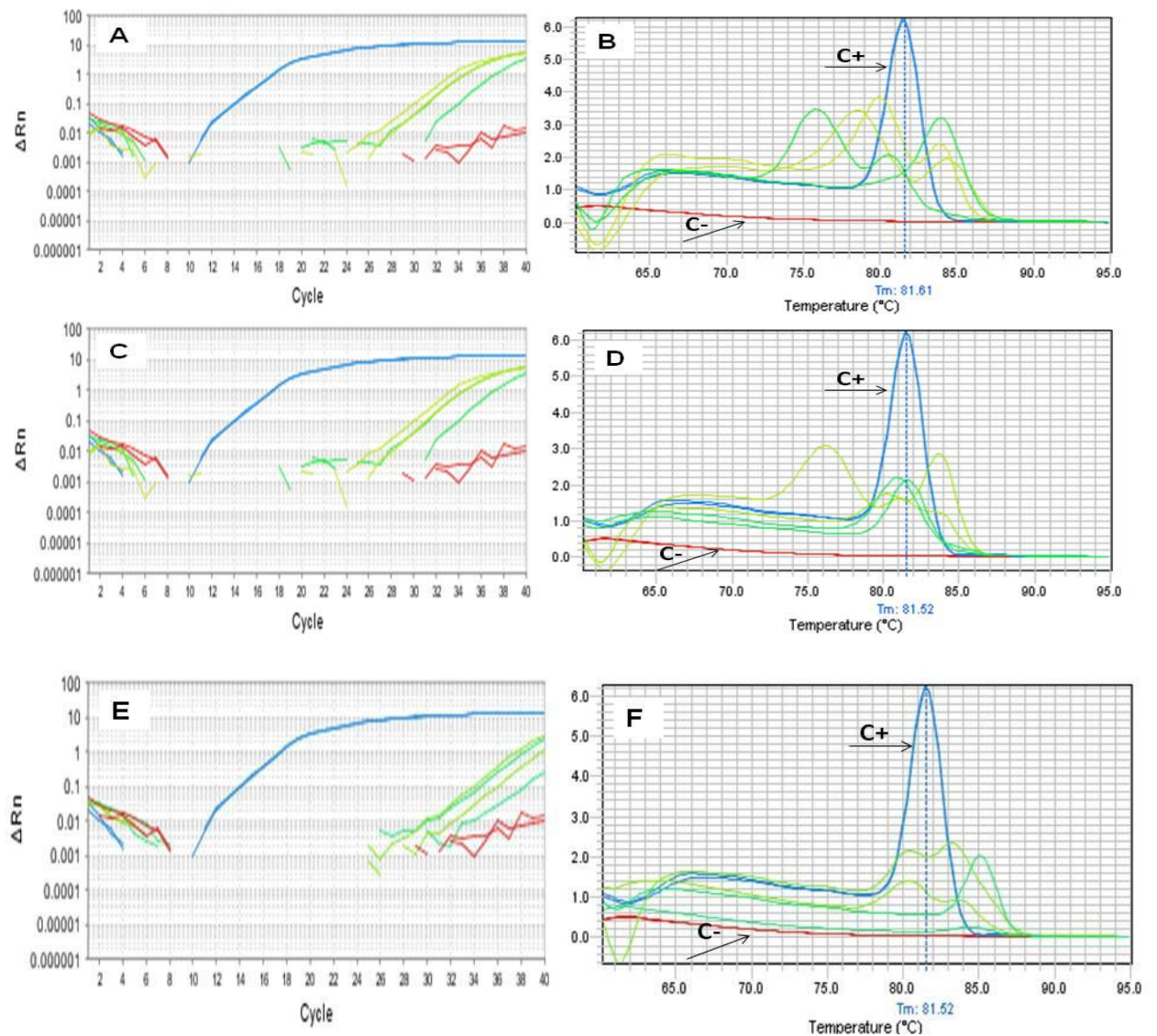
As amostras contaminadas com vírus diluído 10x e 100x apresentaram uma temperatura de dissociação de 81°C e curva de dissociação igual ao controle positivo (figura 10 B e 10 D). Entretanto, as que não receberam a contaminação apresentaram comportamento diferente do esperado, ou seja, diferente do controle negativo, apresentando um platô de dissociação em um intervalo de 60°C a 85°C (figura 10 H).



**Figura 10 - Perfil da qPCR na matriz de PBMC com contaminação deliberada por BVDV e sem contaminação.** Ciclos de amplificação (A, C, E, G) e respectivas curvas de dissociação (B,D,F,H). Os PBMCs foram contaminados com vírus diluído 10x (A, B), 100X(C,D) e 1000x (E,F). Os PBMCs sem contaminar são mostrados na figura G e H. Os controles positivo e negativo foram 0,1 ng de plasmídeo e água, respectivamente.

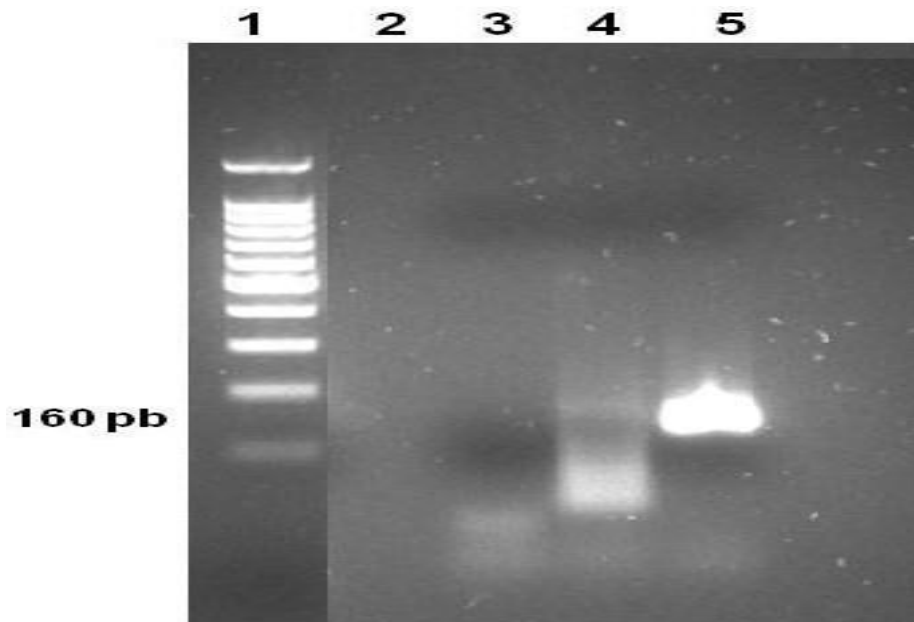


Como forma de avaliar se as ampliações inespecíficas poderiam ser decorrentes do excesso de material genético o cDNA de amostras que não receberam contaminação viral foram diluídos 2x, 4x e 10x. Em todas as diluições analisadas as amostras continuaram a apresentar um comportamento diferente do controle negativo, tendo platô de dissociação, inclusive alguns com temperatura de dissociação próximos ao controle positivo (figuras 11B, 11D e 11F).



**Figura 11- Avaliação da quantidade inicial de cDNA de PBMC na qPCR.** Ciclos de amplificação (A,C,E) e respectivas curvas de dissociação (B,D,F). O cDNA de duas amostras sem contaminar, foram diluídas 2x(A,B), 4x (C,D) e 10x (E,F). Água de injeção e plasmídeo foram usados como controles positivos e negativos.

Para uma melhor visualização dos resultados obtidos, o produto de uma amostra de PBMC sem adição de contaminação por BVDV, amplificada na reação anterior, foi separado por eletroforese em gel de agarose 2%. O produto gerou um fragmento menor que 100 pb, diferente do controle positivo, 160pb ( figura 12).



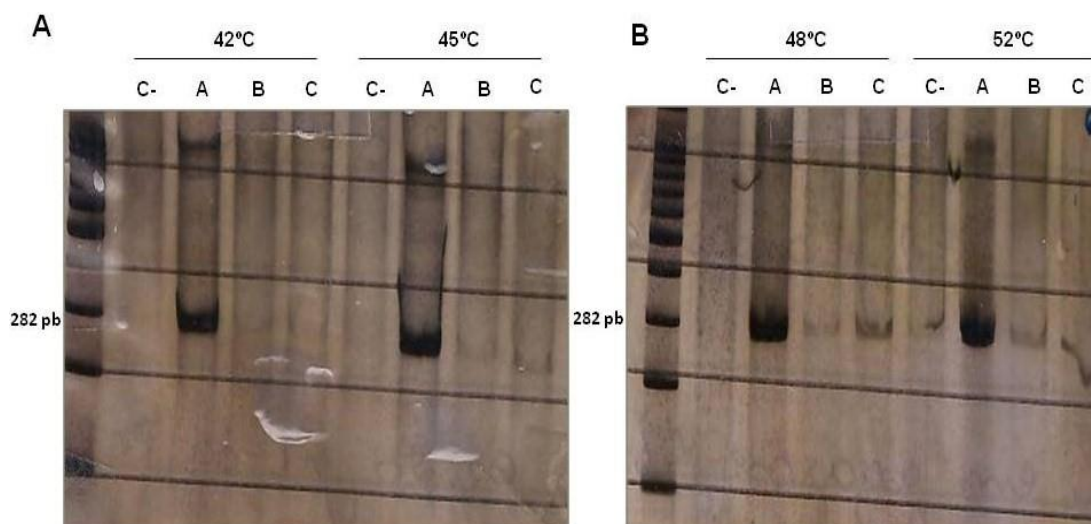
**Figura 12 - Produto da reação de qPCR, separado por eletroforese em gel de agarose 2%. O produto da reação da amostras sem contaminar (4). Controle positivo 160 pb (5) e negativo(3). Marcador de tamanho molecular de 100pb( 1)**

Baseado nos resultados acima explicitados, a PCR convencional foi testada como alternativa para triagem dos PBMC para detecção de BVDV.

#### **8.1.4 Padronizações da PCR convencional para triagem dos PBMCs**

Foram testadas 3 amostras virais designadas A, B e C e o produto da reação foi separado por eletroforese em gel de poliacrilamida 8%. A amostra A obteve produtos de forte intensidade em todas as temperaturas. As amostras B e C não amplificaram ou tiveram baixo rendimento a 42°C e 45°C, mas a 48°C e

52°C são visualizadas amplificações, indicando um melhor rendimento. Como amostras de campo, geralmente são mais impuras e apresentam baixa carga viral, optou-se por utilizar o pareamento dos iniciadores à 48°C, por ser menos estridente que a de 52°C.

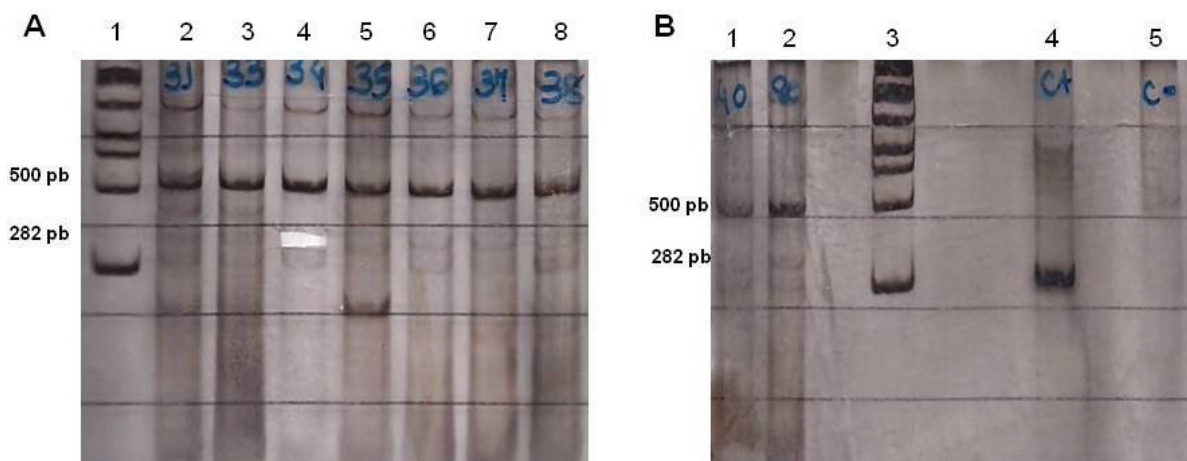


**Figura 13 –Gradiente de temperatura de pareamento dos iniciadores usados na PCR convencional.** Eletroforese em gel de poliacrilamida 8%. Foi testado um gradiente que variou de 42°C a 52° C. Figura A : controle negativo(C-) e amostras A, B e C 42°C e 45°C. Figura B- Controle negativo(C-) e amostras A, B e C a 48°C e 52°C. Em ambas as figuras foi utilizado marcador de tamanho molecular 100pb.

### 8.1.5 Triagem das amostras de PBMCS

Em síntese, baseado em todos os resultados de padronizações descritas anteriormente, para a triagem dos PBMCs foram utilizadas transcrição reversa com iniciadores específicos associados a randômicos e PCR convencional com temperatura de pareamento dos iniciadores à 48°C.

Foram visualizadas bandas diferentes do esperado, com destaque para produtos de forte intensidade no tamanho de 500 pb. Para o fragmento alvo, correspondente a 282 pb, foram observadas amplificações de fraca intensidade (figura 14).



**Figura 14 –Perfil geral das ampliações dos PBMCs na PCR convencional para detecção de BVDV.** Géis de poliacrilamida 8% demonstrando na Figura A: amostras positivas (5-7) amplificam um produto de 282pb. Em todas as amostras (2-8) são visualizadas várias ampliações não características, principalmente no tamanho de 500pb. Extração do fragmento de tamanho esperado (4) que foi utilizado para uma nova PCR. Figura B: controle positivo (4) e negativos(5).

Visto que as ampliações de tamanho esperado foram de baixa intensidade e que produtos inespecíficos podem influenciar na etapa de seqüenciamento, a estratégia utilizada para seqüenciamento foi a extração do fragmento alvo do gel de poliacrilamida, seguida de uma nova amplificação. Na figura 14A canaleta 4 é demonstrada a extração do gel de um fragmento com tamanho condizente ao esperado.

### 8.1.6 PCR convencional para seqüenciamento

Da mesma forma que para os PBMCs, nas reações de PCR convencional das amostras de soro e crosta positivas na qPCR foram observados produtos de tamanho diferentes do esperado. Assim, os fragmentos característicos de ampliações específicas foram extraídos do gel de poliacrilamida e usados como produto para uma nova PCR com a enzima Go Taq Hot Start . Após a separação por eletroforese, foi visualizado somente um fragmento correspondente ao tamanho esperado, 282pb, que foi purificado e seqüenciado (figura 15).

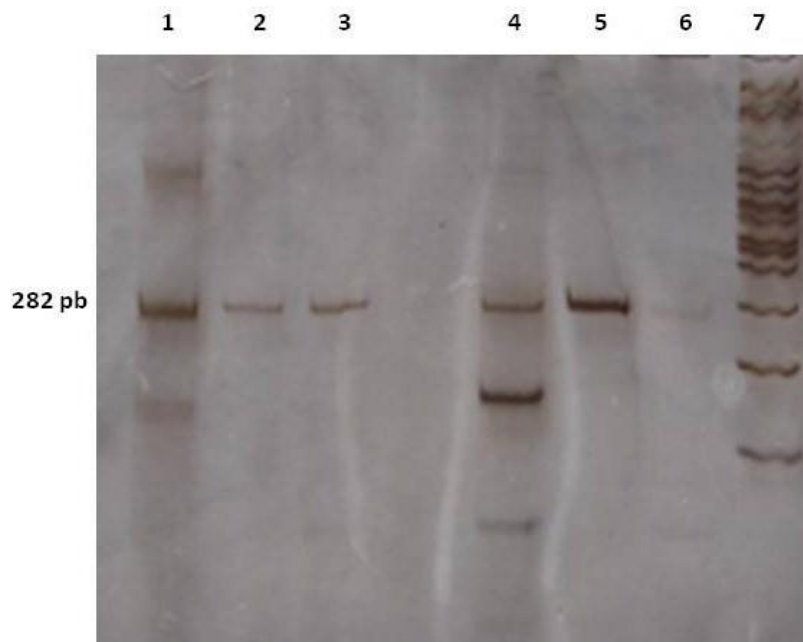
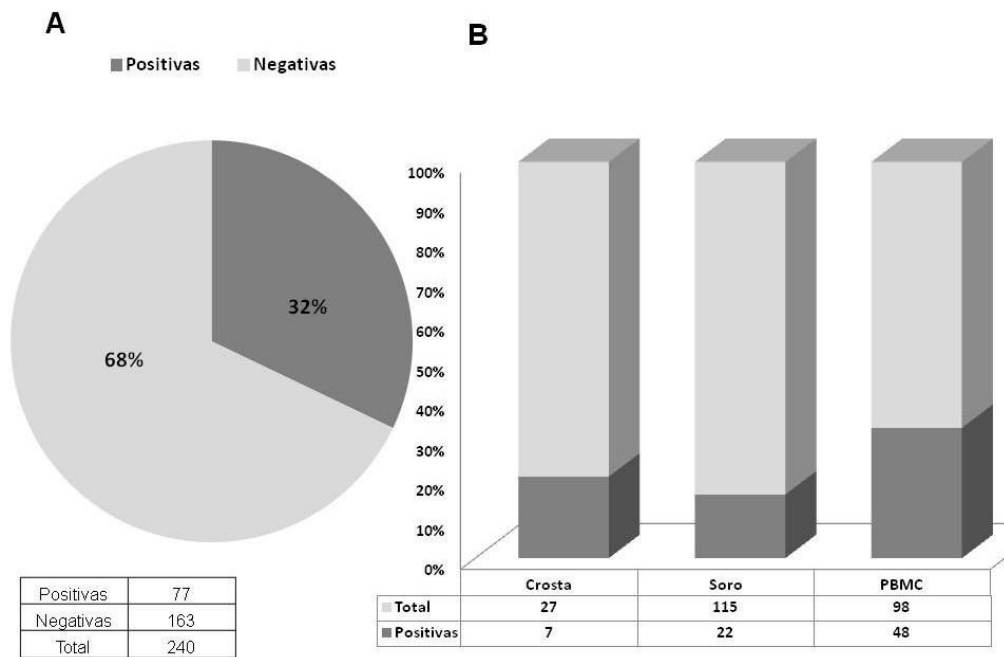


Figura 10 - Produtos reamplificados por PCR convencional a partir de fragmento extraídos de gel de poliacrilamida 8%. Amplificações correspondentes a 282pb (1-3; 4-6). Marcador de tamanho molecular de 100pb(7).

### 8.1.7 Resultados Epidemiológicos

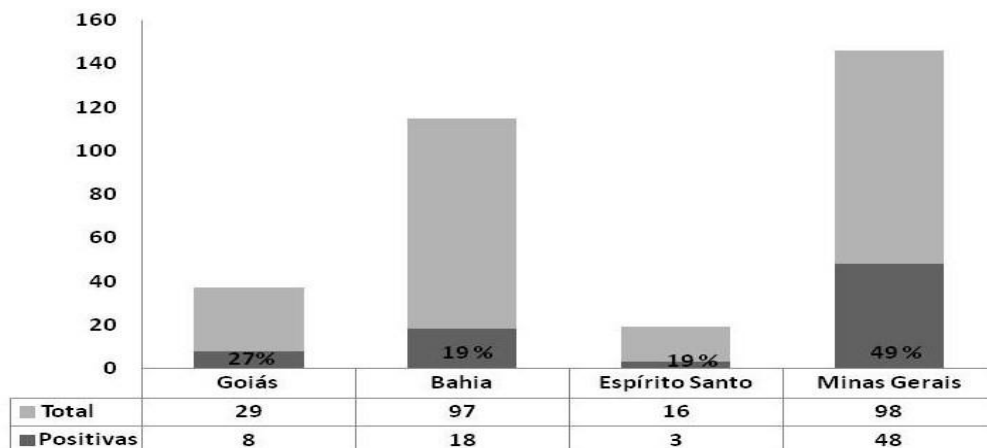
Foi analisadas 240 amostras entre crostas, soros e PBMCs pertencentes a Minas Gerais, Bahia, Espírito Santo e Goiás sendo detectada uma positividade de 32% (77/240). Em relação à matriz testada, a maior positividade foi encontrada nos PBMCs.





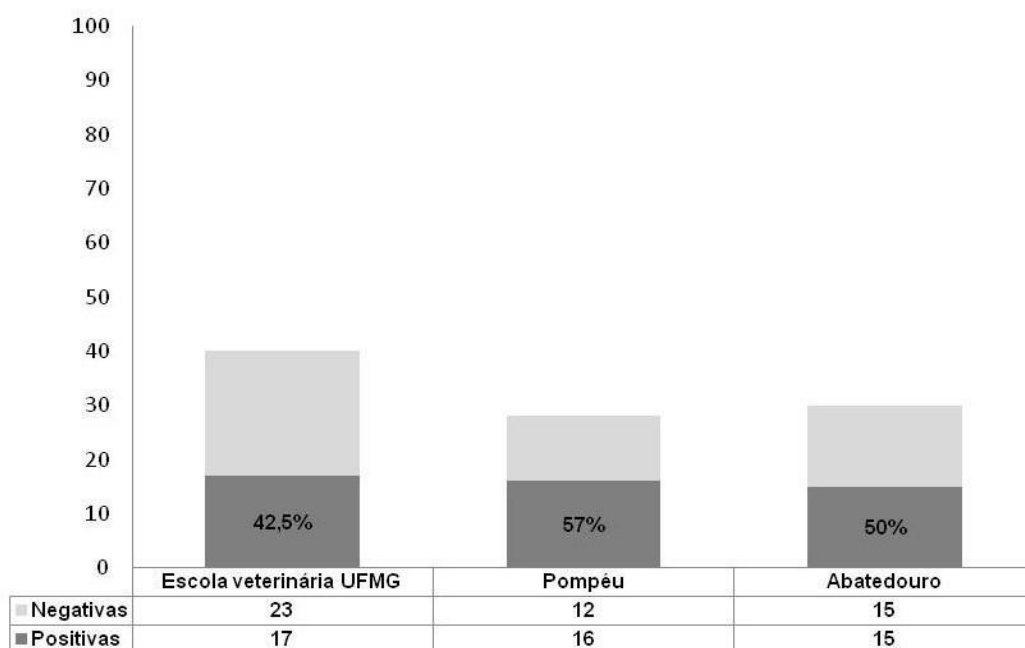
**Figura 16 - Positividade total e por matriz de detecção para BVDV.** Figura A: Porcentagem de amostras positivas e negativas em relação ao total analisado. Figura B: número de amostras positivas por matriz de análise.

Foram triadas por qPCR 142 amostras de crostas e soros coletadas nos estados de Goiás, Bahia e Espírito Santo. Foram detectadas 20% (29/142) de amostras positivas, sendo a maior detecção em Goiás com 27% seguida da Bahia e Espírito Santo, ambas com 19% das amostras positivas. No estado de Minas Gerais foram analisadas 98 amostras de PBMCs dentre as quais 49% foram positivas.



**Figura 17 - Positividade de BVDV por Estado.**

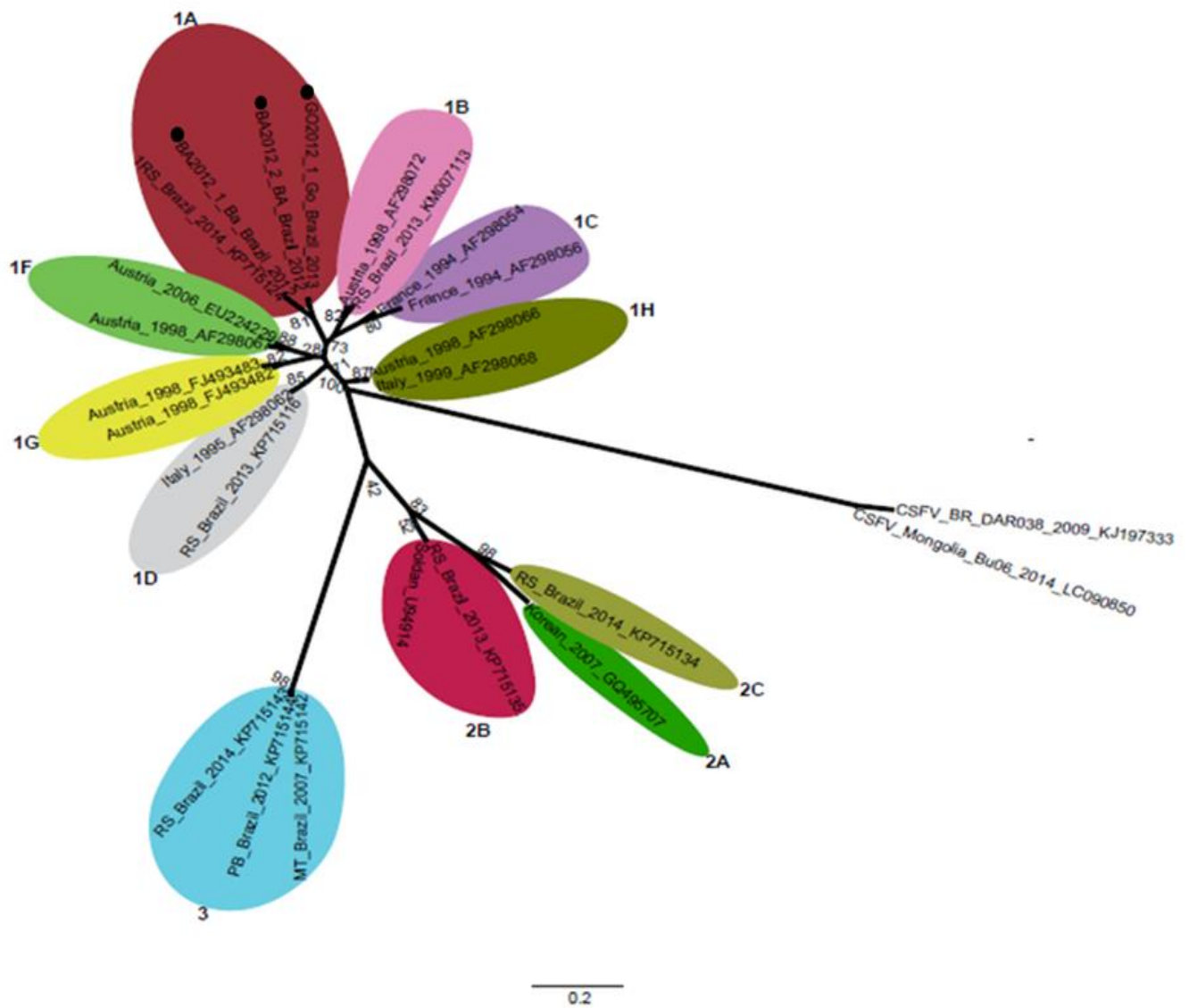
Em Minas Gerais a maior porcentagem de animais virêmicos pertence à Pompéu com 57% das amostras positivas, seguida do abatedouro e da Escola de Veterinária da UFMG, com 50% e 42,5%, respectivamente.



**Figura 18- Positividade de BVDV na matriz PBMC por local de coleta em Minas Gerais**

### 8.1.8 Inferências filogenéticas

Para a análise filogenética dos BVDVs detectados foi utilizado um fragmento de 282 pb (Ridpath *et al.*, 2011) da região 5'UTR. Todas as amostras caracterizadas nesse estudo, sendo elas 1 amostra de Goiás e 2 da Bahia, destacadas em vermelho na figura 19, foram agrupadas no subgenótipo BVDV-1A (figura 19).

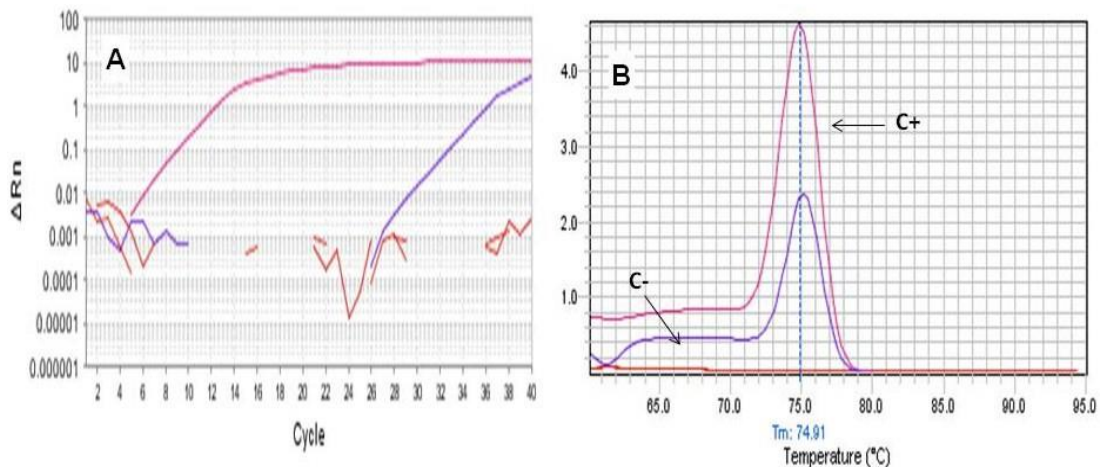


**Figura 19. Inferência filogenética para BVDV.** Árvore filogenética mostrando os genótipos e subgenótipos de BVDV. As três amostras caracterizadas nessa dissertação estão destacadas por pontos pretos. A filogenia foi construída pelo método de máxima verossimilhança, usando o programa PhyML v.3.1, com 100 bootstraps e Akaike Information Criterion (AIC).

## 8.2.0 RESULTADOS PARA VSV

### 8.2.1 qPCR para triagem de soros e crostas

A plataforma de qPCR foi padronizada para triar amostras de soro e crosta. Para demonstrar a eficiência dessa ferramenta para essas matrizes, é mostrado a seguir o perfil de uma amostra positiva, na qual foi detectada a amplificação no ciclo 25 da reação e que apresentou uma temperatura de dissociação de 74.9°C, igual ao controle positivo que corresponde a 0,1ng de plasmídeo contendo a sequência alvo para VSV. Além disso, a amostra gerou uma curva de dissociação com formato bem definido, similar ao controle positivo.



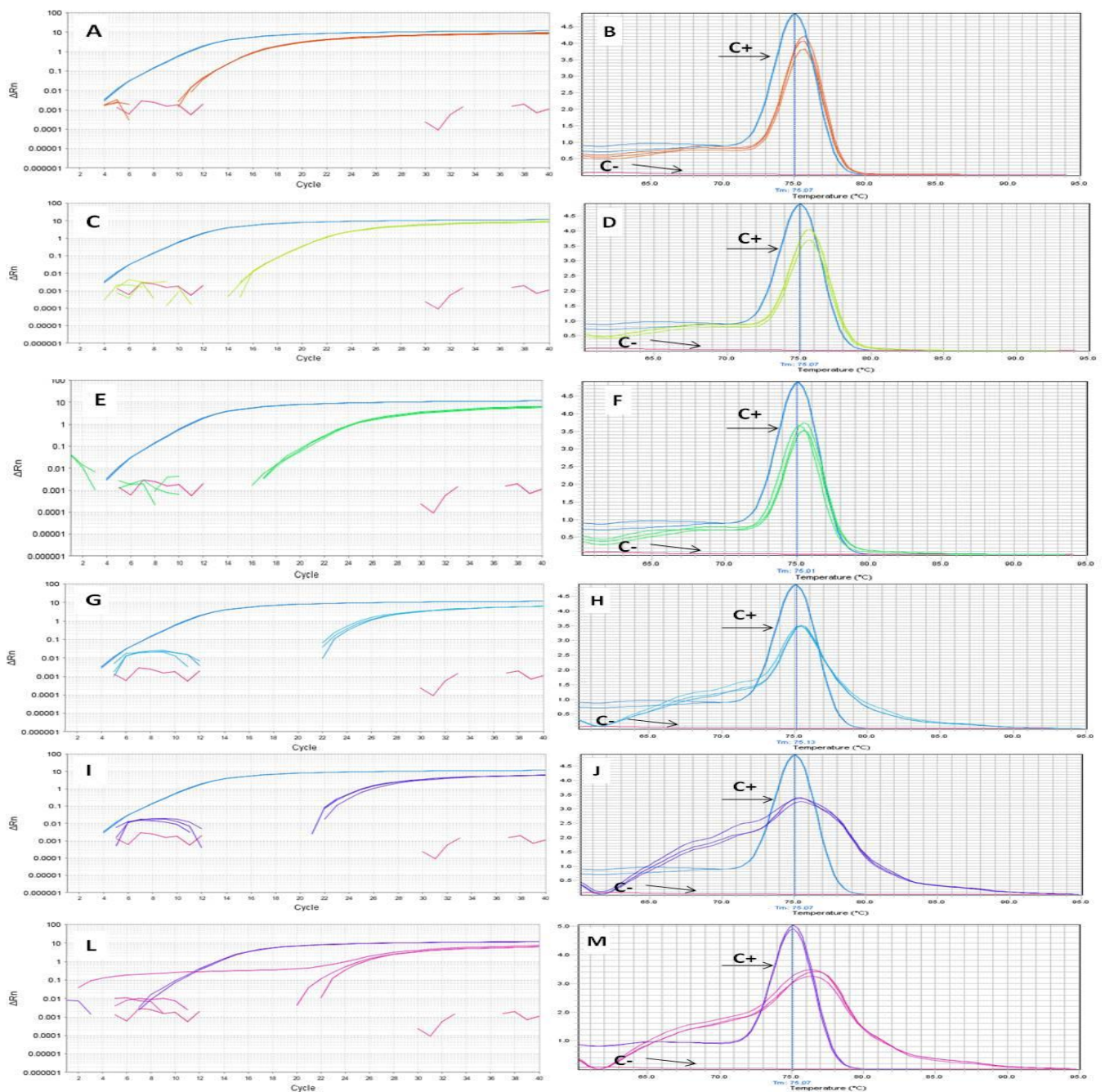
**Figura 20- Perfil de amostra de soro positiva para VSV.** Ciclo de amplificação (A) e curva de dissociação(B). Como controles positivo e negativo foram usados plasmídeo e água de injeção, respectivamente.

### 8.2.2 Padronização da qPCR para detecção de VSV em PBMC

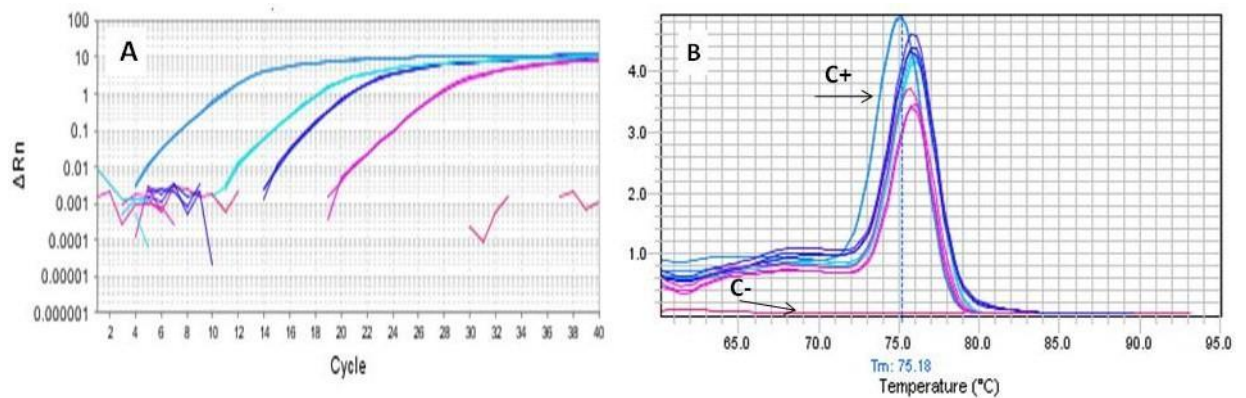
As curvas de dissociação dos vírus nos títulos de  $10^4$  a  $10^1$  PFU/  $\mu$ L e dos PBMCs contaminados com até  $10^2$  PFU/  $\mu$ L foram similares aos do plasmídeo controle, como ilustrado na figura 21B, 201, 21F e 22. Já as reações das amostras contaminados com  $10^1$  e  $10^0$  PFU/  $\mu$ L, apresentaram curva de dissociação com aspecto diferente do controle positivo, além de uma

temperatura de dissociação com 3 a 5°C de diferença em relação ao controle positivo (figuras 21H,21J, 21M).

As amostras que não receberam a contaminação viral apresentaram comportamento diferente do esperado, ou seja, diferente do controle negativo, pois produziram amplificações com um platô de dissociação em um intervalo de 70°C a 80°C (figura 21M).



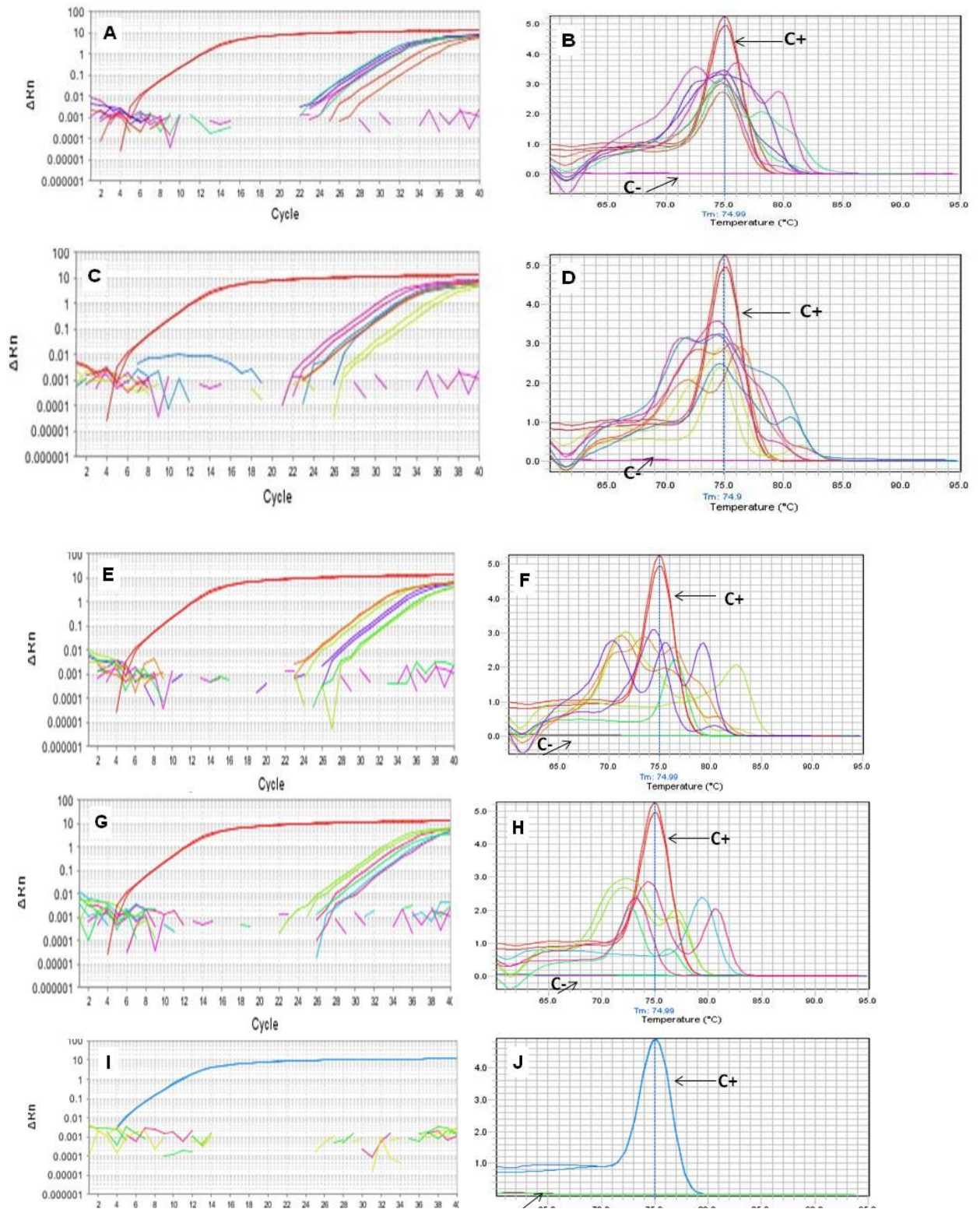
**Figura 21 - Perfil da qPCR na matriz de PBMC com contaminação deliberada por VSV e sem contaminar.** Ciclo de amplificação (A,C,E,G,I,L); Curva de dissociação(B,D,F,H,J,M).PBMC contaminados com  $10^4$ PFU(A,B),  $10^3$  PFU(C,D),  $10^2$  PFU(E,F),  $10^1$  PFU(G,H),  $10^0$  PFU (I,J); PBMC sem contaminar(L,M). Água e 0,1ng de plasmídeo foram usados como controle negativo e positivo, respectivamente.



**Figura 22 - Perfil de diferentes diluições do VSV na qPCR.** O VSV foi testado na concentração de  $10^4$ ,  $10^3$  e  $10^2$  PFU. Figura A ciclos de amplificação ; Figura B curva de dissociação.

Para verificar se as amplificações inespecíficas eram decorrentes do excesso de material genético, cDNA dos PBMCs sem a contaminação deliberada foram diluídas 2x, 4x, 10x, 20x. As amostras novamente apresentaram amplificações com curvas de dissociação de formato não característico e com temperatura de dissociação similar ao controle positivo em todas as diluições analisadas, como ilustrado na figura 23.



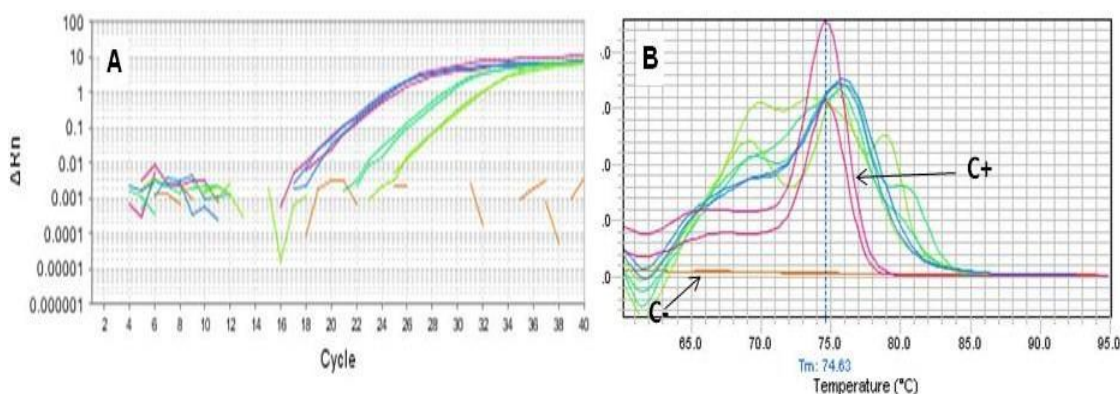


**Figura 23. Influência da quantidade de cDNA de PBMC na qPCR para detecção de VSV.** Ciclo de amplificação (A,C,E,G,I) e curva de dissociação (B,D,F,H,J). cDNA de PBMCs diluídos 1:2(A,B) ; 1:4 (C,D); 1:10 (E,F) ; 1:20(G,H); Controle da transcrição reversa (I,J), na qual a reação foi feita sem a transcriptase reversa. Todas as reações foram feitas em duplicata. Os controles positivos e negativos foram 0,1ng de plasmídeo contendo a sequência alvo e água de injeção, respectivamente.

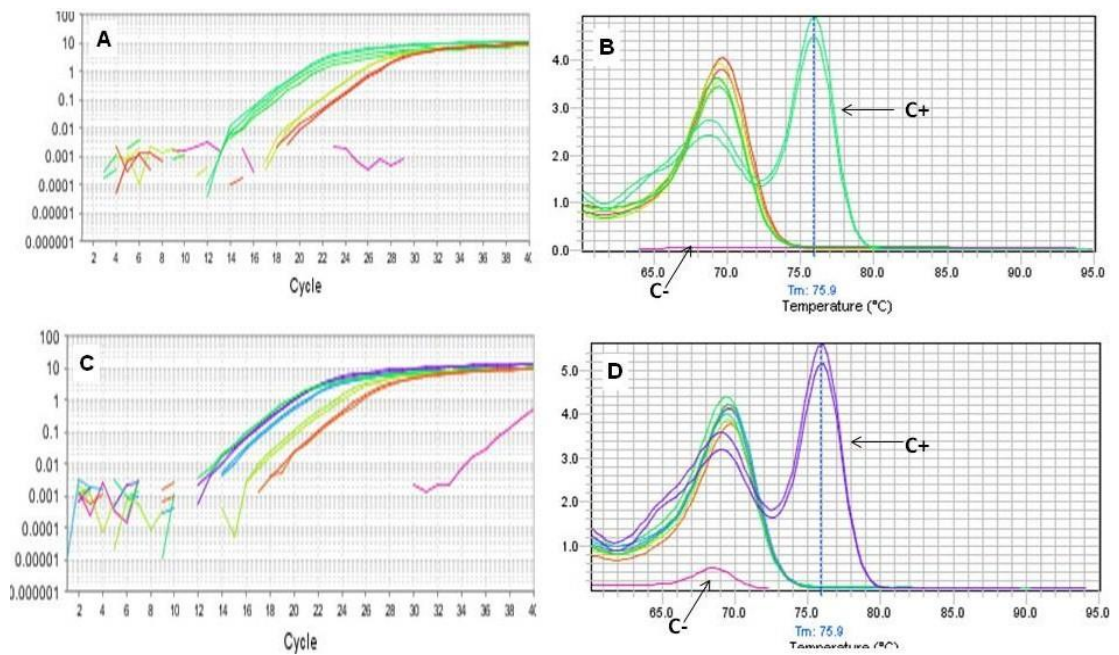


Dois iniciadores desenhados e padronizados durante o doutorado do aluno Pedro Augusto Alves (P.A Alves., não publicado), que tem como alvo a região da nucleoproteína e polimerase foram testados. Além desses, um iniciador publicado por Hole *et al.*, 2006 também foi analisado. Em todas as reações foram utilizados amostras de PBMCs sem a contaminação deliberada, por isso, é esperado que as amostras apresentem um perfil semelhante ao controle negativo.

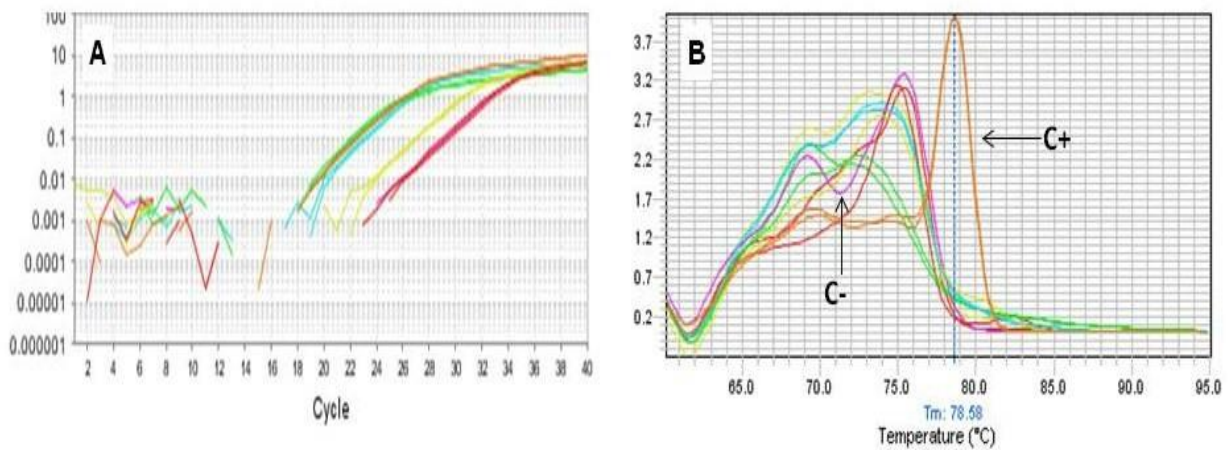
Iniciadores para a nucleoproteína resultaram em amplificações com alto nível de fluorescência, com temperatura de dissociação similar ao controle positivo, mas com curva de dissociação com aspecto não definido, característico de reação inespecífica (figura 24). Os outros dois iniciadores testados, ambos para a região da polimerase, produziram amplificações com temperatura de dissociação distinta do controle positivo, mas com mais de uma curva de dissociação e alto nível de fluorescência (figura 25 e 26), o que inviabiliza ou dificulta a análise dos dados.



**Figura 24- Resultado de qPCR para detecção de VSV a partir de cDNA de PBMC com iniciadores para a nucleoproteína.** Ciclo de amplificação (A) e curva de dissociação(B) dos cDNA de PBMCs testado com iniciadores para a região da nucleoproteína.

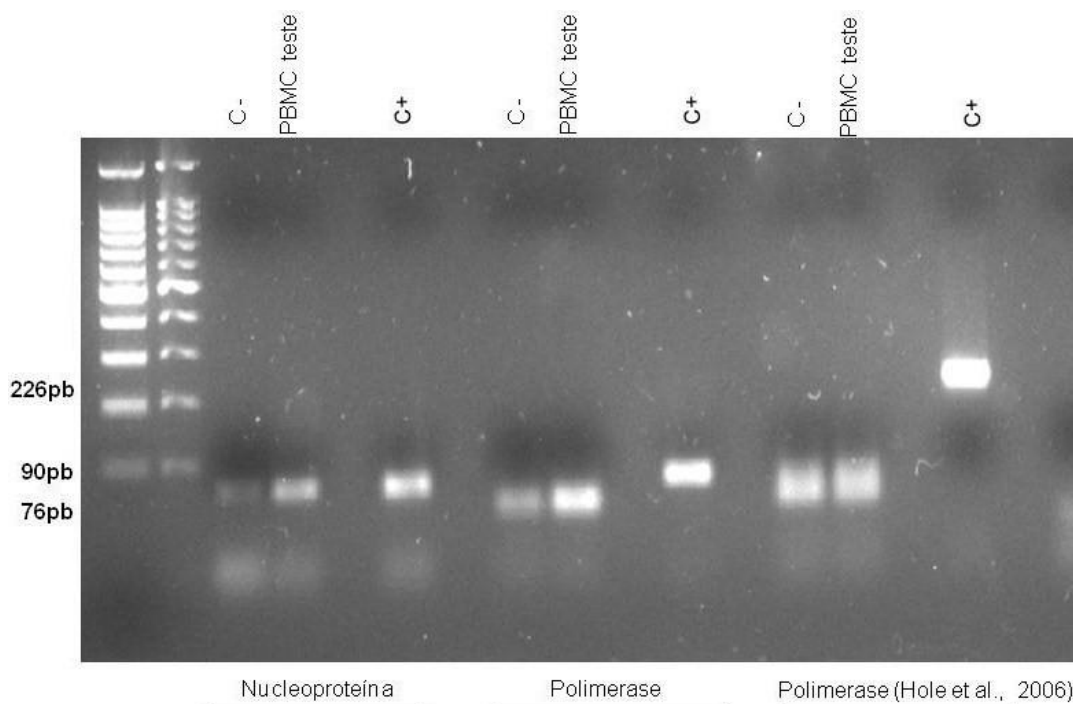


**Figura 25 - Resultado de qPCR para detecção de VSV a partir de cDNA de PBMC com iniciadores para a polimerase.** Ciclo de amplificação (A,C) e curva de dissociação (B,D). Reação com 4 pMol (A,B) e 8pMol (C,D) de iniciadores. Todas as reações foram testadas em duplicatas. Água de injeção e cDNA viral foram usados como controles negativos e positivos, respectivamente.



**Figura 26 – Resultado de qPCR para detecção de VSV a partir de cDNA de PBMC com iniciadores para a nucleoproteína (descritos por Hole *et al.*, 2006).** Ciclo de amplificação (A) e curva de dissociação (B). Todas as reações foram testadas em duplicatas. Água de injeção e cDNA viral foram usados como controles negativos e positivos, respectivamente.

Para um melhor entendimento e visualização dos resultados obtidos nas reações de qPCR com os vários iniciadores testados, o produto de uma amostra de cada reação acima foi fracionado por eletroforese (figura 27). Esta abordagem permitiu constatar que as amplificações eram diferentes do fragmento amplificado no controle positivo das respectivas reações.



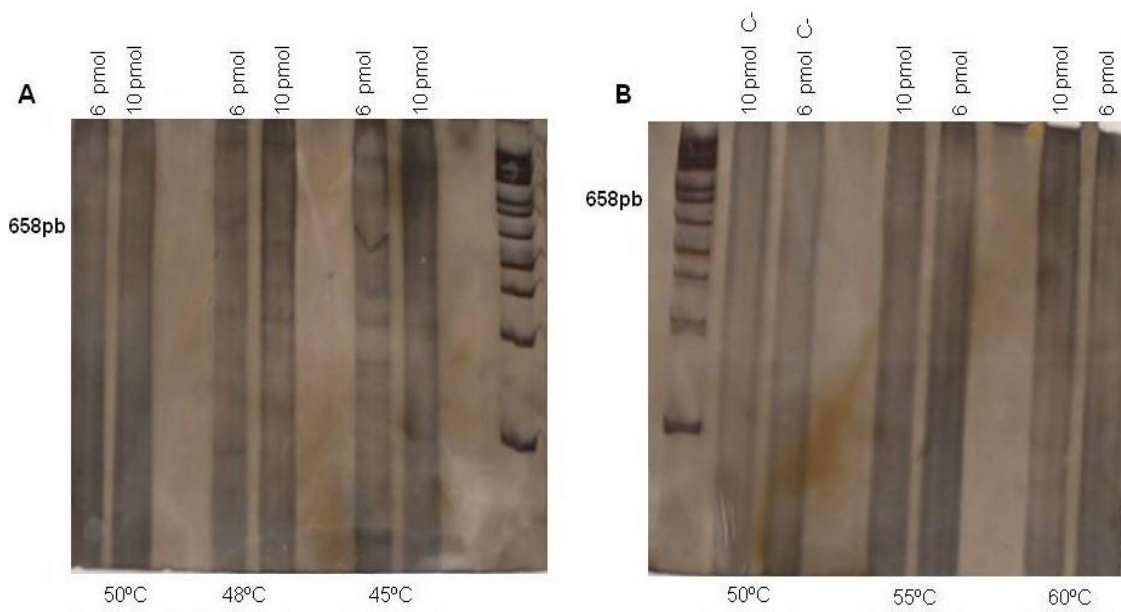
**Figura 27- Produtos da qPCR com diferentes iniciadores para detecção de VSV a partir de PBMC.** Eletroforese em gel de agarose 2% . Acima das canaletas estão identificas a amostra teste utilizada (PBMC teste), controle negativo (C-) e controle positivo (C+). Na parte de baixo da ilustração são identificados os iniciadores correspondentes. Marcador de peso molecular de 100pb.

### 8.2.1 Padronização da PCR convencional para caracterização de VSV

Para a caracterização das amostras positivas na PCR em tempo real foram utilizados oligonucleotídeos que tem como alvo a região hipervariável da fosfoproteína.

Para a padronização da reação foi utilizado o sobrenadante de células Vero infectadas com a amostra *Vesicular Stomatitis Indiana virus* (ATCC VR-1238) com o título de  $2 \times 10^8$  PFU/ $\mu$ L. A quantidade de 100  $\mu$ L desse sobrenadante foi submetido à extração de RNA seguida de transcrição reversa.

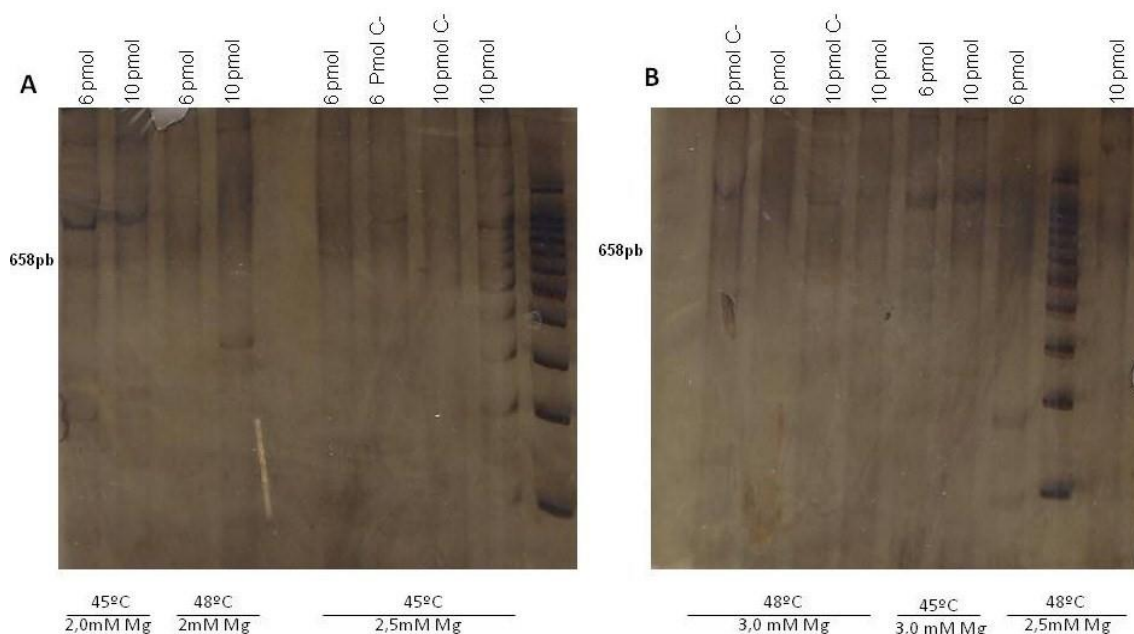
Inicialmente foram analisadas as concentrações de 6 e 10 pmol de iniciadores em um gradiente de temperatura que variou de 45°C a 60°C. Amplificações, com tamanho correspondente ao esperado, 658pb, mas de fraca intensidade foram visualizadas com a utilização de 6 e 10 pmol de iniciadores a 45°C e 48°C. Nas demais condições, amplificações não foram detectadas (figura 28).



**Figura 28 – Produto do gradiente de temperatura e variação da concentração de iniciadores para detecção de VSV por PCR convencional.** Eletroforese em gel de poliacrilamida 8%. Em ambas as figuras na parte superior e inferior são identificadas a quantidade e temperatura de pareamento dos iniciadores, respectivamente. Amplificações de baixa intensidade correspondente ao produto desejado, 658pb, são visualizados nas condições de 10pmol a 48°C e a 6 pmol a 45°C. Em ambas os géis foram usados marcadores de tamanho molecular 100pb

Em seguida, na tentativa de aumentar a sensibilidade da reação, foram testadas as concentrações de 2mM, 2,5 mM e 3mM de magnésio com 6 e 10 pmol de iniciadores a 45° e 48°C.

Não foi observado um maior rendimento da reação em nenhuma das condições. Amplificados do tamanho desejado, correspondente a 658pb, de fraca intensidade, foram visualizados nas condições de 2,0mM e 2,5mM de magnésio com 6 pmol de iniciadores a 45°C (figura 29).



**Figura 29 –Produto da PCR resultante de variações na concentração de magnésio, de iniciadores e temperatura de pareamento para detecção de VSV.** Eletroforese em gel de poliacrilamida 8%. Nas canaletas estão identificadas as quantidade de iniciador e na parte inferior das figuras são indicadas a temperatura de pareamento dos iniciadores e concentração de magnésio utilizados. Amplificações de tamanho esperado, 658pb, foram visualizados nas condições 6pmol de iniciadores a 45°C com 2,0mM e 2,5mM de magnésio. Em ambas as figuras foi usado o marcador de tamanho molecular 100pb.

Na tentativa de aumentar a especificidade e rendimento da reação, foram utilizados iniciadores específicos e randômicos na transcrição reversa, seguido da PCR com a enzima taq Hot start. O produto da reação foi separado por eletroforese, mas, não foram visualizadas amplificações em nenhuma das condições.

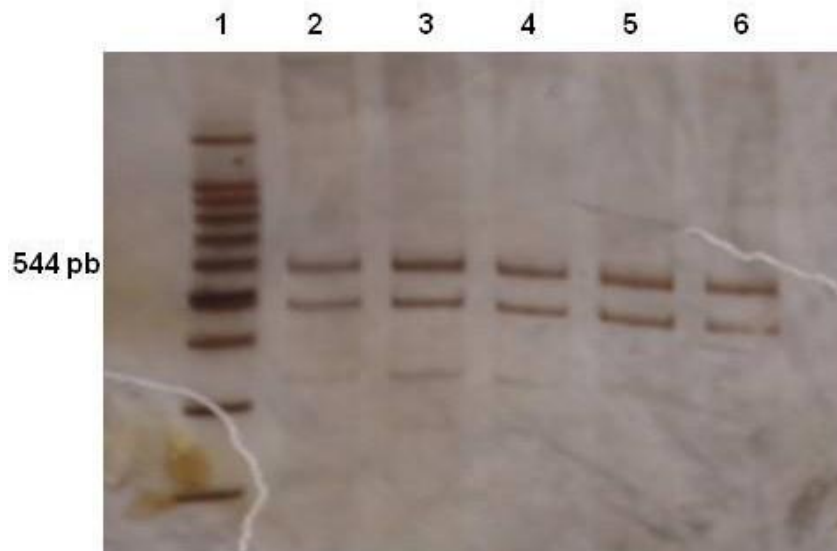
#### **8.2.4 PCR , sem controles, para detecção de VSIV2 e VSIV3**

Amostras de soro e crostas positivas na qPCR foram caracterizados pela reação descrita por Pausek *et al.*, 2011 que tem como alvo a região da fosfoproteína e amplifica para o sorotipo 2, que tem como protótipo o *cocal virus*, um fragmento de 544pb. Para o sorotipo 3, cujo protótipo é o *Alagoas virus*, é amplificado um produto de 565pb.

Para comparação da eficiência dos iniciadores utilizados na transcrição reversa, o cDNA de algumas amostras positivas na qPCR foram feitos com iniciadores randômicos e específicos, seguidos por uma PCR caseira e também com a enzima taq Hot start. O produto da reação utilizando a transcrição reversa com iniciadores específicos e a PCR com a enzima Go taq Hot start apresentou menor quantidade de amplificações inespecíficas que a PCR caseira, sendo portanto, a condição de escolha para a caracterização das amostras (dado não mostrado).

Não foram detectadas amplificações para o sorotipo 3. Para o sorotipo 2 todas as reações apresentaram dois fragmentos sendo eles de 400pb e 600pb aproximadamente, valores que são um pouco diferente do tamanho esperado, 544pb, como ilustrado pela figura 30. Pelo fato da região alvo utilizada nessa reação ser hipervariável foram feitas tentativas de seqüenciamento desses produtos, mas, sem êxito

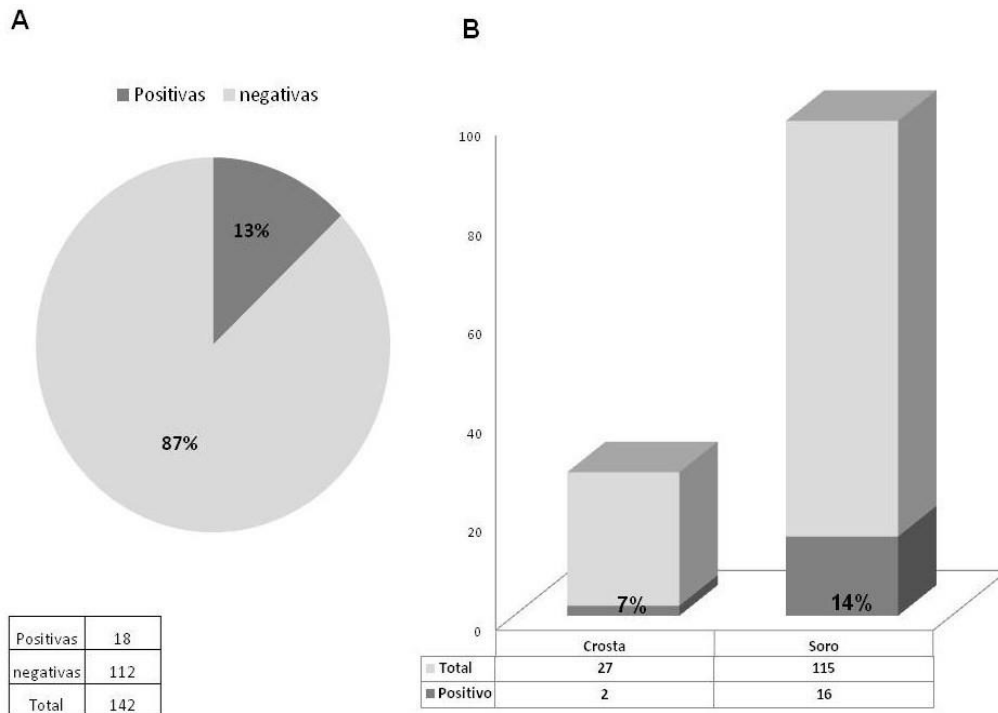




**Figura 30- Produto da PCR para detecção de VSIV2.** Eletroforese em gel de poliacrilamida 8%. Produto das amostras de soro e crostas (2-6); Marcador de tamanho molecular 100pb(1).

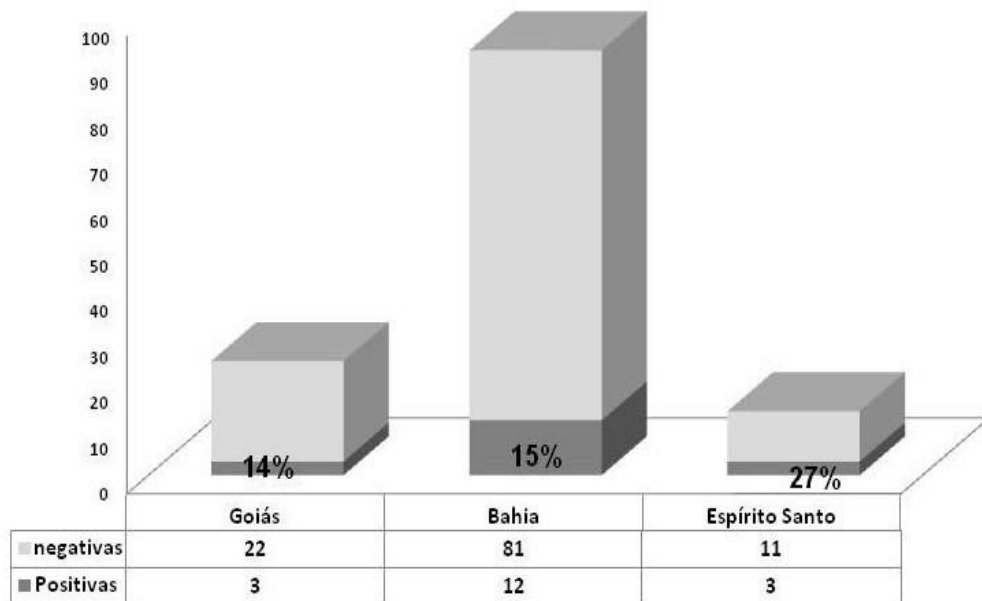
### 8.2.5 Resultados Epidemiológicos

Utilizando a matriz de crosta e soro foram triadas por qPCR 142 amostras coletadas nos estados de Goiás, Bahia e Espírito Santo. Um total de 13% (18/142) das amostras foram positivas, sendo a maior parte da detecção feita na matriz de soro.



**Figura 31 - Positividade total e por matriz de detecção para VSV.** Figura A- Porcentagem de amostras positivas e negativas em relação ao total analisado. Figura B- número de amostras positivas em relação à matriz analisada.

No Espírito Santo houve a maior detecção de VSV com 27% das amostras positivas, seguido de Bahia e Goiás com 15% e 14% respectivamente.



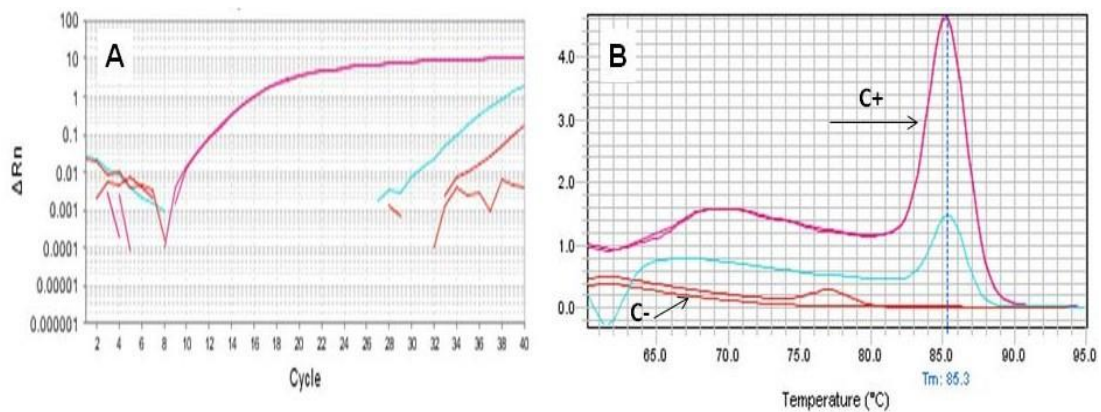
**Figura 32 – Positividade de VSV por Estado**



### 8.3.0 Resultados para BoHV

#### 8.3.1 qPCR das amostras de soro e crosta para detecção de BoHV-1/5

A plataforma de qPCR foi padronizada para triar amostras de soro e crosta. Para demonstrar a eficiência dessa ferramenta para essas matrizes, é mostrado a seguir o perfil de uma amostra positiva, no qual foi detectada a amplificação no ciclo 26 da reação e que apresentou uma temperatura de dissociação de 85.3°C, igual ao controle positivo que corresponde a 0,1ng de plasmídeo contendo a sequência alvo para BoHV1/5. Além disso, a amostra produziu uma curva de dissociação com formato bem definido, similar ao visualizado no controle positivo.

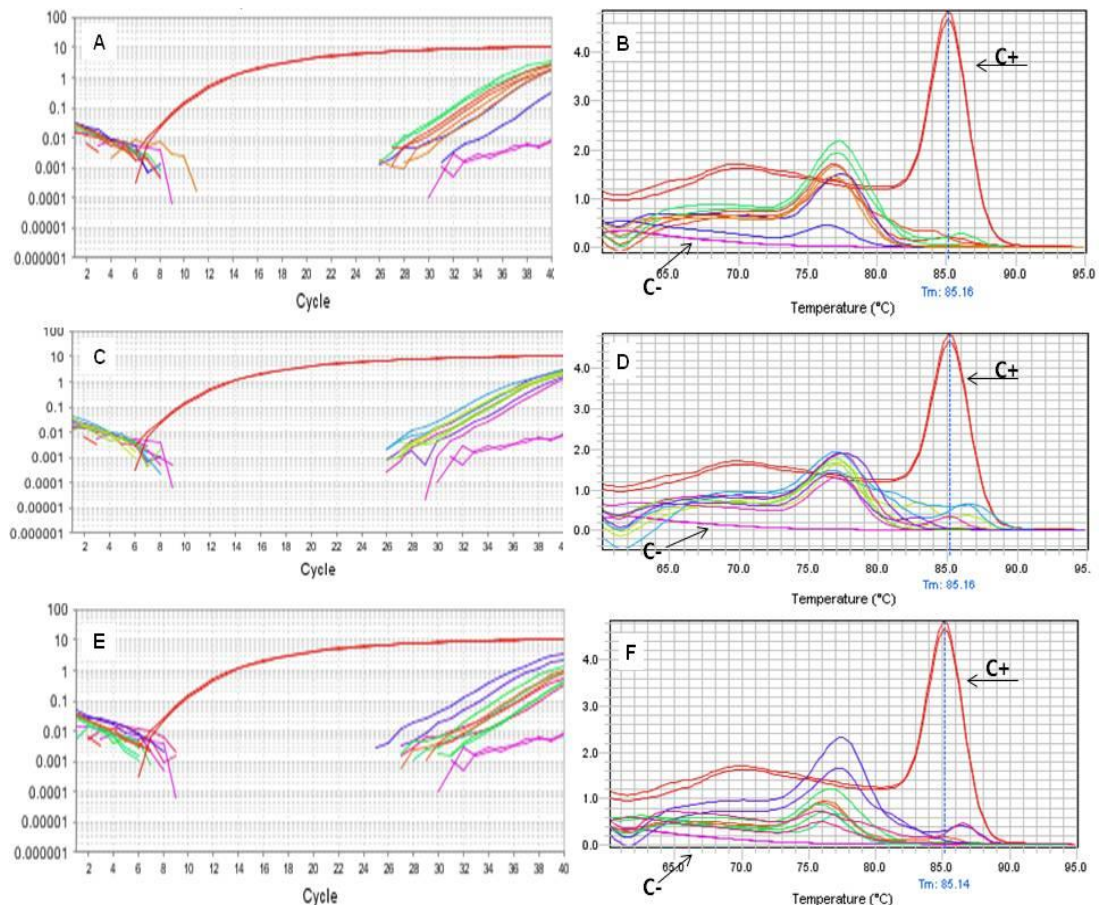


**Figura 33 - Perfil de amostra de soro positiva para BoHV 1/5 na qPCR.** Ciclo de amplificação (A) e curva de dissociação(B) de uma amostra de soro positiva para BoHV-1/5.

#### 8.3.2 Padronização da qPCR para detecção de BoHV 1/5 em PBMCs

A análise do comportamento da qPCR para a matriz de PBMC foi iniciada pela verificação da quantidade ideal de DNA a ser utilizada. Para isso, foram testadas 5,10 e 50ng de DNA de PBMC sem adição de contaminação deliberada por BoHV. É esperado que todas as amostras obtenham resultado semelhante ao controle negativo, sem amplificações, mas caso haja é necessário que tenham características distintas do controle positivo.

Todas as quantidades de DNA testadas apresentaram resultados similares, com temperatura de dissociação de aproximadamente 75°C, distinto do controle positivo, 85°C. Além disso, em todas as reações as amplificações foram detectadas no ciclo 26-28, como mostrado na figura 34. Como esse trabalho visa à manipulação de amostras de campo, a quantidade de escolha foi a de 50ng.



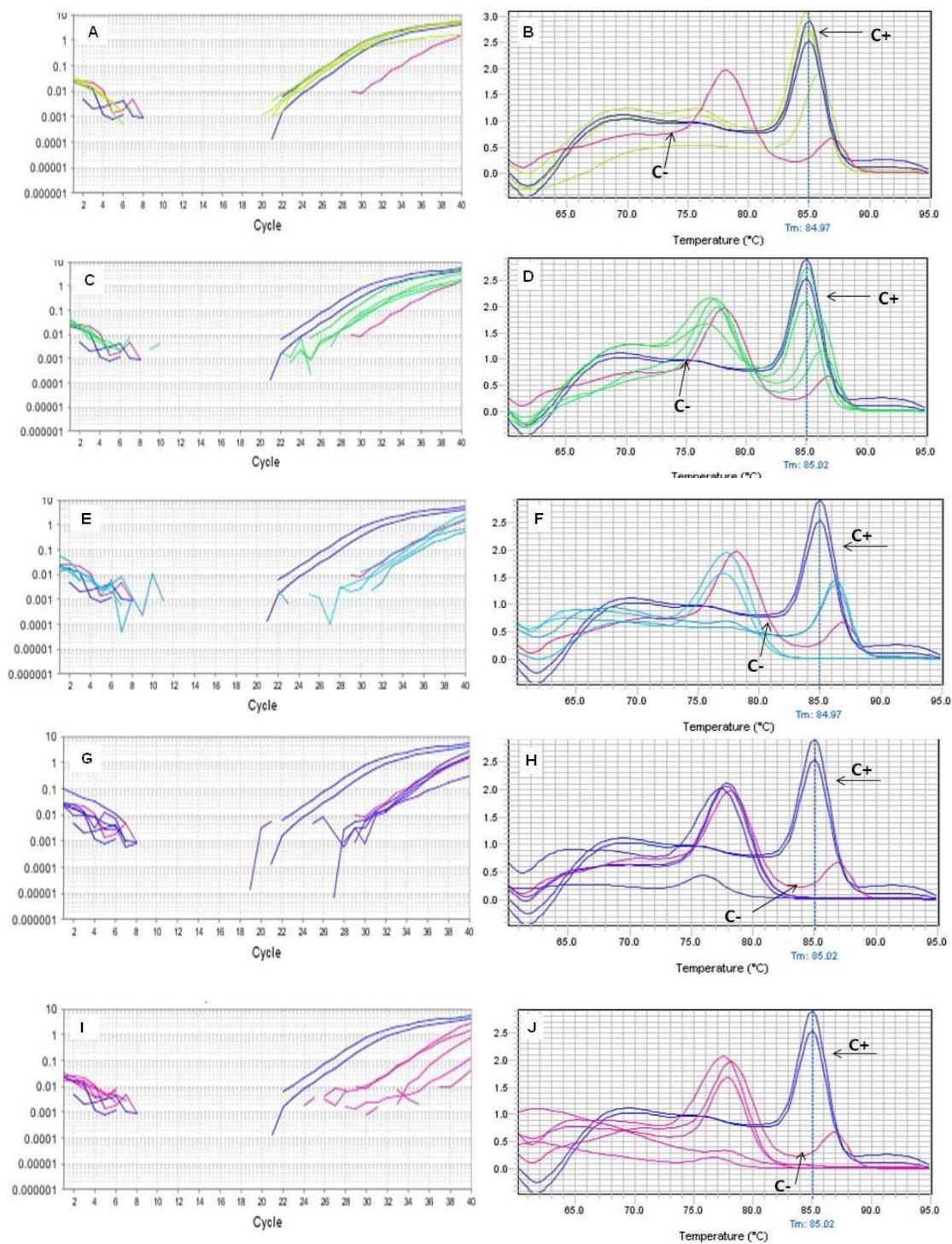
**Figura 34 - Avaliação da quantidade de DNA de PBMC na qPCR para detecção de BoHV1/5.** Ciclo de amplificação (A,C,E) e respectivas curvas de dissociação (B,D,F). qPCR com 5ng (A,B) 10ng (C,D) e 50ng (E,F) de DNA inicial.

Na próxima etapa foram utilizados PBMCs contaminados deliberadamente com a amostra viral BoHV-1 Colorado, sem título definido. Uma quantidade inicial de 100 µL de sobrenadante celular infectado com vírus foi diluído em PBS 1x de forma seriada na base 10. Em seguida 10 µL de cada diluição foi usado pra

contaminar 100  $\mu\text{L}$  de PBMC ( $10^6$  cel/ mL). Para a qPCR foram analisados amostras contaminadas com vírus diluído 10x, 20x, 30x ,40x e 50x.

Era esperado que todas as amostras apresentassem curva e temperatura de dissociação similar ao observado para o controle positivo. Além disso, esperava se que quanto menor a carga viral, mais tardio seria o ciclo de amplificação e com menor o nível de fluorescência.

Em todas as diluições analisadas foram visualizadas curva de dissociação com temperatura e perfil diferente do controle positivo. Além disso, quanto menor a carga viral, mais inespecífica foi a reação (figura 35).



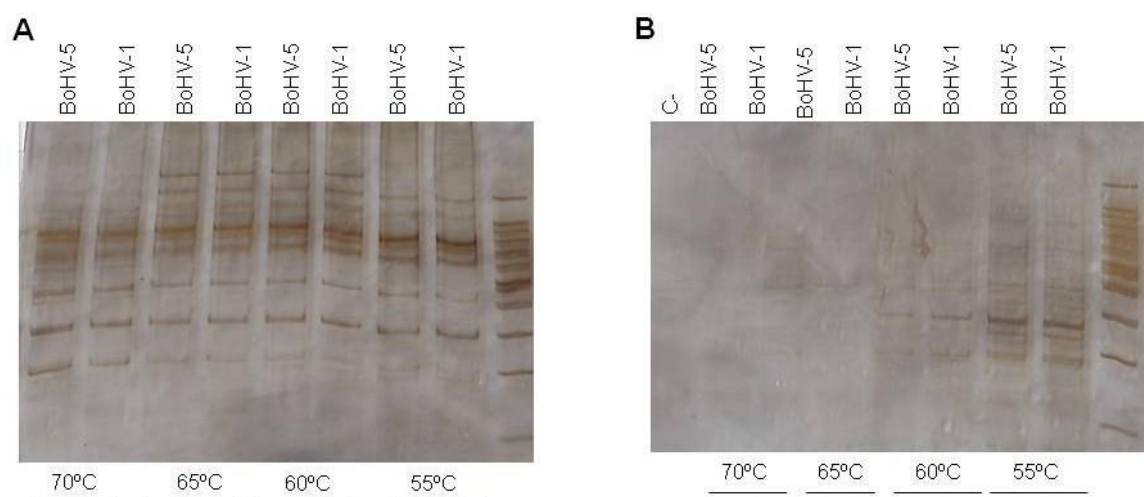
**Figura 35 - Perfil de amplificação da qPCR na matriz de PBMC contaminado deliberadamente por diferentes quantidades de BoHV. Ciclo de amplificação (A,C,E,G,I) e respectivas curvas de dissociação(B,D,F,H,J). Amostras de PBMCs contaminadas com vírus diluído 10x(A,B), 20x(C,D), 30x(E,F), 40x (G,H) e 50x(I,J). Água e 0,1ng de plasmídeo foram usados como controles negativo e positivo, respectivamente.**



Para a caracterização das amostras de soro e crostas positivas na triagem por qPCR foi utilizada a região 5' da glicoproteína C que amplifica para BoHV-1 um produto de 653 pb e 589 para BoHV-5 (Silva *et al.*, 2007).

Na padronização dos iniciadores foi utilizada a PCR caseira e a PCR com a enzima Go taq Hot Star através de um gradiente de temperatura que variou de 55°C a 70°C. Como controle foram utilizados DNA extraído dos vírus BoHV-1 amostra Colorado (Cooper ATCC VR 864) e BoHV-5 amostra SV 507/99 multiplicados em células MDBK.

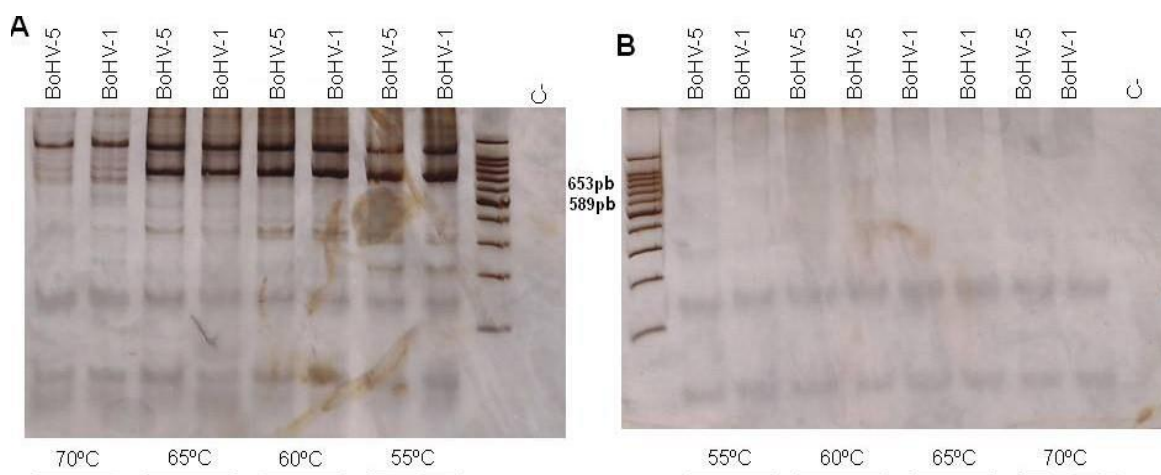
Fragmentos de tamanhos não esperados foram visualizados em todas as temperaturas e as amostras de BoHV-1 e BoHV-5 tiveram o mesmo perfil de amplificação, não sendo possível pelo gel de poliacrilamida, a distinção entre eles (figura 36).



**Figura 36 - Produto da PCR resultante do gradiente de temperatura dos iniciadores para caracterização de BoHV1/5.** Eletroforese em gel de poliacrilamida 8%. Os iniciadores amplificam para BoHV-1 653pb e 589pb para BoHV-5. Figura A- PCR caseira, Figura B- PCR com enzima Go Taq Hot Start. Em ambas as figuras foram identificadas acima de cada canaleta a amostra viral testada e abaixo a temperatura de pareamento dos iniciadores. Marcador de tamanho molecular 100pb.

Em seguida, através de um gradiente de temperatura, analisados na PCR caseira e com a enzima Go Taq Hot Start, foram testados soros de referencia (amostra de BoHV-1Cooper e BoHV-5 SV507/99 diluídos 1:100 em PBS1x). O produto da reação foi separado por eletroforese em gel de poliacrilamida.

Na figura 37 é ilustrada os resultados dos produtos amplificados, nos quais foram detectados muitas ampliações diferentes do tamanho esperado, sendo eles de 653 para BoHV-1 e 589 para BoHV-5. Não foi detectada amplificação visível na PCR com a enzima Go Taq Hot start.



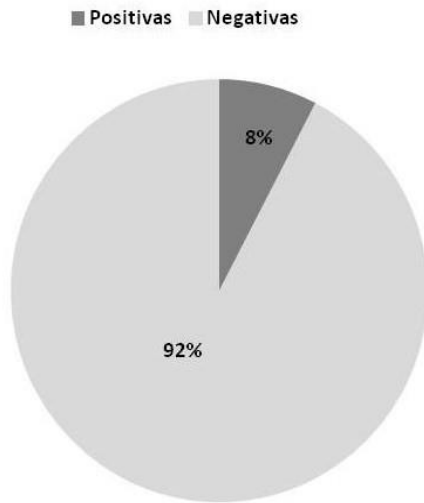
**Figura 37 – Gradiente de temperatura dos iniciadores na matriz soro para caracterização de BoHV1/5.** Eletroforese em gel de poliacrilamida 8%. Iniciadores amplificam para BoHV-1 653pb e 589pb para BoHV-5. Figura A- PCR caseira, Figura B- PCR com enzima Go Taq Hot Start. Em ambas as figuras são identificadas na parte superior e inferior de cada canaleta a amostra viral e temperatura de dissociação dos iniciadores, respectivamente. Marcador de tamanho molecular 100pb. Água de injeção foi usado como controle negativo(C-).

### 8.3.4 Resultados Epidemiológicos

Foram analisadas por qPCR 142 amostras entre crostas e soros pertencentes a Bahia, Espírito Santo e Goiás sendo detectada uma positividade de 8% (10/142). Essas amostras positivas podem ser de BoHV-1 ou BoHV-5 já que a reação não discrimina o tipo.

Em relação à matriz de análise, foram detectadas amostras positivas em 7% dos soros e 4% das crostas analisadas.

**A**



Positivas	10
Negativas	132
Total	142

**B**

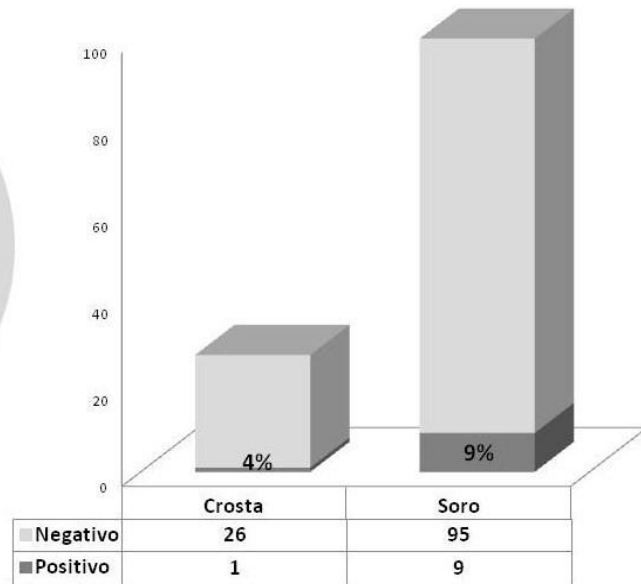
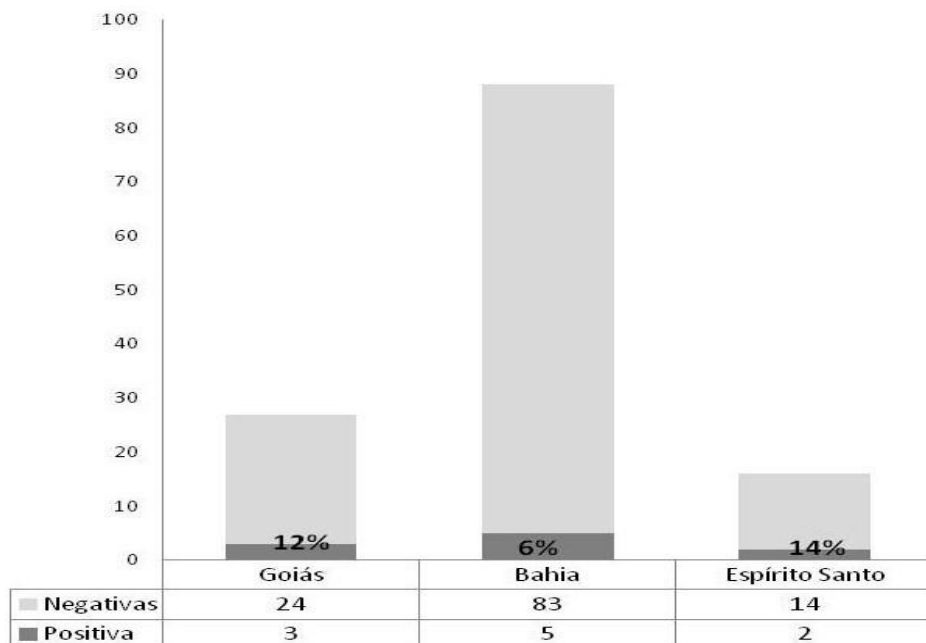


Figura A - distribuição de amostras positivas e negativas em relação ao total analisado. Figura B - número de amostras positivas em relação à matriz analisada.

O maior número de animais infectados com BoHV-1/5 pertence ao estado do Espírito Santo com 14% de positividade, seguido de Goiás e Bahia com 12% e 6%, respectivamente.



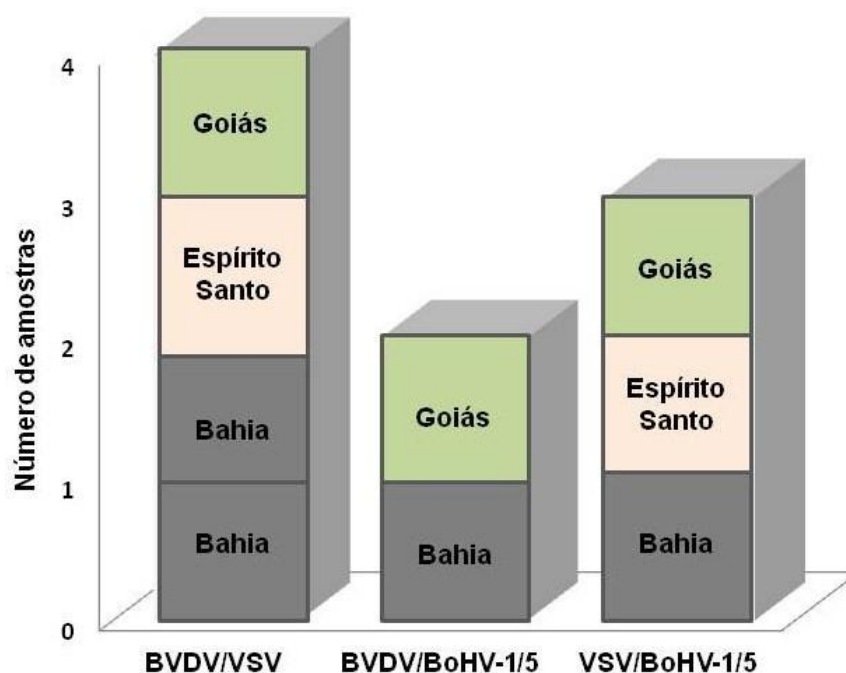
**Figura 39- Positividade de BoHV 1/5 por Estado**

#### 8.4.0 Detecção de BoHV-2

Foram analisadas por qPCR 142 amostras entre crostas e soros pertencentes a Bahia, Espírito Santo e Goiás. Não foram detectadas amostras positivas

#### 8.5.0 Co-infecções

Algumas amostras das 142 analisadas por qPCR foram positivas para mais de um vírus (figura 41). Em 4 amostras houve a detecção de BVDV e VSV, sendo dois soros da Bahia, um do Espírito Santo e um de Goiás. Duas amostras foram positivas simultaneamente para BVDV e BoHV-1/5, sendo um soro da Bahia e outro de Goiás. Em três amostras foram detectados VSV e BoHV1/5, sendo dois soro da Bahia e um do Espírito Santo (figura 40).



**Figura 40 - Detecção de co-infecções.** Quatro amostras foram positivas para BVDV e VSV, 2 amostras para BVDV e BoHV1/5 e 3 amostras para VSV e BoHV1/5 . Todas as co-infecções foram detectadas na matriz de soro.



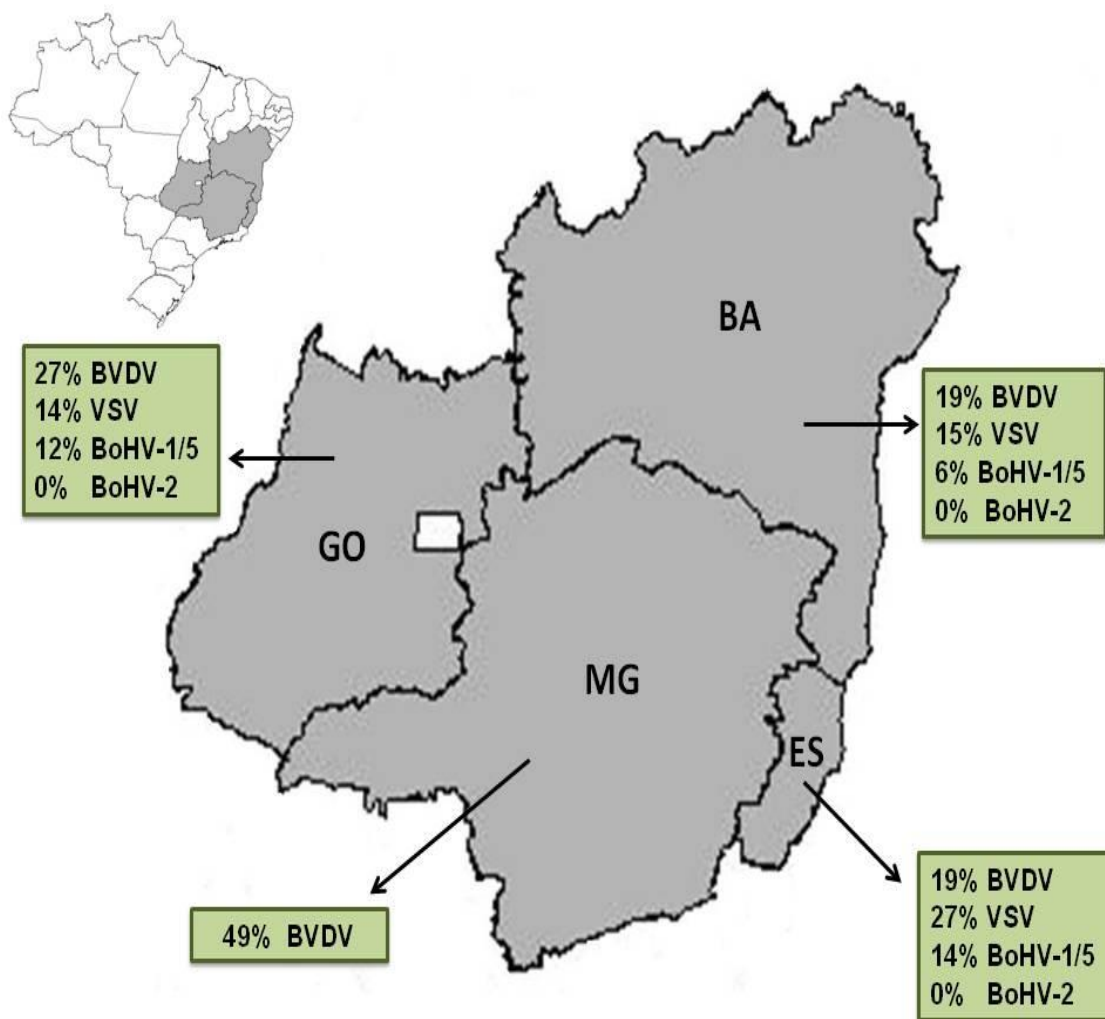


Figura 41- Positividade e distribuição geográfica de BVDV, VSV, BoHV-1, BoHV-2 e BoHV-5 no Brasil nos anos de 2012 a 2014.

## 9.0 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Estudos sobre a circulação de agentes virais associados à doenças vesiculares como *Bovine viral diarrhea virus*, *Vesicular stomatitis virus*, *Bovine herpesvirus 1*, *Bovine herpesvirus 2* e *Bovine herpesvirus 5* ainda são escassos no Brasil. Os poucos estudos disponíveis são na grande maioria soropidemiológicos retrospectivos, o que torna o conhecimento acerca da caracterização molecular e respectiva distribuição espacial e temporal desses vírus bastante negligenciada no país.

Para um estudo mais abrangente da epidemiologia desses vírus no Brasil, foi utilizada uma plataforma de diagnóstico pela PCR em tempo real desenvolvida no Laboratório de Vírus ICB/UFMG e usada para a triagem de matrizes de crosta e soros. Em seguida, a PCR convencional e seqüenciamento foram utilizados para a caracterização molecular.

Como o BVDV apresenta tropismo por linfócitos (Bolin *et al.*, 1985), houve a necessidade de padronização da qPCR para a detecção na matriz de PBMC. Pela falta de uma amostra sabidamente positiva, para ser usada como controle, amostras de PBMCs foram contaminados deliberadamente com o vírus BVDV-NADL. Foi observado na qPCR que quanto menor a carga viral maior a detecção de produtos não específicos. Nas amostras de PBMCs sem contaminação, ao contrário do esperado, foram visualizadas amplificações inespecíficas com temperatura de dissociação similar ao controle positivo, o que dificulta a análise dos dados. Para verificar se isso poderiam ser decorrentes do excesso de material genético, a concentração inicial de cDNA foi diluída de 2 a 10 vezes, mas não houve redução das amplificações inespecíficas. O produto da reação, fracionado por eletroforese, gerou um fragmento diferente do controle positivo, confirmando assim, que as fluorescências visualizadas eram decorrentes de amplificações inespecíficas. Isso pode ser devido à matriz de PBMC que contem maior quantidade de material genético e outros componentes celulares, quando comparado a soros e crostas, que possivelmente interferiram na dinâmica da reação.

Como alternativa para a triagem dos PBMC optou se por utilizar PCR convencional, através de iniciadores que amplificam a região 5'UTR (Ridpath *et al.*,1998). No artigo que descreve os iniciadores a transcrição reversa e PCR foram feitas em etapa única, trabalhou se com amostras isoladas em cultivo celular e com temperatura de pareamento a 50°C graus. Como no laboratório de Vírus as reações de transcrição reversa e PCR são feitas em etapas separadas e o foco desse trabalho são amostras de campo, foi necessária a adaptação da reação, iniciada pelo gradiente de temperatura, no qual os melhores resultados foram obtidos a 48°C e 52°C. Optou se por utilizar o pareamento dos iniciadores à 48°C, por ser menos estrigente que a 52°C.

Na seqüência, para verificar se os iniciadores usados na transcrição reversa poderiam influenciar na sensibilidade e rendimento da PCR convencional o cDNA foi produzido com iniciadores aleatórios e/ou específicos. Para a comparação das técnicas, as mesmas variáveis foram também testados na qPCR. Os resultados mais satisfatórios foram obtidos na PCR convencional com cDNA produzido por uma associação de iniciadores específicos e aleatórios (hexameros), sendo essa a condição utilizada para a triagem de BVDV em PBMC.

As reações produziram vários produtos de tamanhos diferente do esperado e o fragmento alvo apresentou amplificação de fraca intensidade, o que é crítico para a etapa de seqüenciamento. Por isso, a estratégia usada foi a extração do fragmento alvo do gel de poliacrilamida, seguida de uma nova amplificação, como os mesmos iniciadores. Na caracterização das amostras de soro e crosta que foram positivos na qPCR foi seguido o mesmo procedimento.

Para *Bovine viral diarrhoea virus* (BVDV) 32% das amostras foram positivas, o que evidencia a grande quantidade de animais infectados e a ativa circulação desse vírus no rebanho brasileiro. Em relação à matriz analisada a maior parte das partículas virais foram detectadas nos PBMCs.

Minas Gerais foi o estado com maior positividade, 48%, seguido de Goiás com 27% e por fim, Bahia e Espírito Santo ambos com 19%. A maior detecção viral

em Minas Gerais pode ser justificada pelo maior número de amostras originadas dessa região, pela circulação naturalmente maior do vírus no rebanho mineiro ou pelo fato de todas as amostras dessa localidade serem de PBMCs, que são mais favoráveis a detecção viral que soro e crosta, visto que BVDV tem tropismo por linfócito (Bolin, 1995). Além disso, essas amostras foram processadas imediatamente após a coleta, garantindo a integridade do RNA viral, o que aumenta a chance de detecção. Situação muito diferente das amostras de soro e crosta que normalmente, são enviadas via correio e após chegarem ao Laboratório de Vírus são congeladas antes de serem processadas para o diagnóstico.

Pelo fato dos estudos epidemiológicos com abordagens moleculares serem escassos na literatura, não é possível a comparação dos resultados aqui apresentados. Vários estudos sorológicos demonstram que mais de 50% do rebanho nacional apresenta anticorpos contra BVDV (tabela 3). Apesar desses estudos fornecerem informações diferente dos moleculares, eles os corroboram por reforçarem a ativa circulação e continua exposição dos bovinos brasileiros a esse vírus.

No Brasil os subgenótipos BVDV1 a, BVDV1b, BVDV1d, BVDV2a e BVDV2b já foram descritos (Flores *et al.*, 2002; Vilcek *et al.*, 2004; Cortez *et al.*, 2006). As três amostras caracterizada nesse estudo, uma de Goiás e três da Bahia, foram classificadas como BVDV-1 a, subgenotipo também recentemente detectado por Otonel *et al.*, 2014 em bovinos do Paraná. As classificações em subgenótipos ainda não possuem um significado clínico conhecido (Flores *et al.*, 2002), entretanto, estudos têm mostrado diferenças antigênicas entre subgenótipos como, por exemplo, na neutralização cruzada, ligação do anticorpo monoclonal e resposta de animais com infecção persistente a vacinação (Fulton *et al.*, 2003). Dessa forma, a diversidade genética dos isolados de BVDV não tem somente interesse acadêmico, mas também tem implicações práticas para a epidemiologia viral e na produção de vacinas (Stahl *et al.*, 2009). Nesse estudo não foi possível saber o estado vacinal das

amostras analisadas, não permitindo assim, inferir sobre a eficácia da vacinação.

Os dados também não permitem distinguir se os animais positivos para BVDV apresentavam infecção aguda no momento da coleta ou eram animais com infecção persistente, já que para essa diferenciação seriam necessárias técnicas sorológicas, uma vez que os animais PI têm como característica principal a sorologia negativa apesar de serem a grande fonte de dispersão do vírus no rebanho. Entretanto, esses resultados evidenciam o estado epidemiológico, a distribuição geográfica e os genótipos circulantes nas regiões de estudo, respondendo assim, ao objetivo proposto para esse trabalho.

Para VSV 13% das amostras analisadas foram positivas, sendo a maior parte da detecção feita na matriz de soro. O Espírito Santo foi o estado com maior positividade, 27%, seguido de Bahia e Goiás com 15% e 14% respectivamente. Devido à escassez de estudos epidemiológicos para esse vírus no Brasil, não há como comparar os dados obtidos nesse trabalho. Entretanto, de acordo com o ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento nos anos de 2012 e 2013, período de coleta das amostras, foram notificados um total de 56 casos de estomatite vesicular em várias regiões do país ([www.agricultura.gov.br](http://www.agricultura.gov.br)) mas, não foram divulgados o número de animais, nem quantas propriedades afetadas.

No Brasil, até o momento, sabe-se que os surtos de estomatite vesicular são causados por distintos subtipos virais sorologicamente relacionados ao *Vesicular Stomatitis Indiana virus*, nomeados VSIV2 e VSIV3, cujos protótipos são o *Vesicular Stomatitis Cocal virus* e *Vesicular Stomatitis Alagoas virus*, respectivamente. Historicamente, VSIV2 é associado com surtos em várias regiões brasileiras, já VSIV3 a casos no nordeste do país (Fernandez et al., 1985; Pauszek et al., 2011; Cargnelutti et al., 2014). Dessa forma, para a caracterização das amostras foram utilizados na PCR convencional os iniciadores descritos por Pauszek et al., 2011, que tem como alvo a região hipervariável da fosfoproteína e foram desenhados como base nas amostras

que circulam na América do sul, sendo elas Indiana Clássico (VSIV), *Cocal virus* e *Alagoas virus*. Além disso, esses oligonucleotídeos foram utilizados por Cargnelutti *et al.*, (2014) para a caracterização de amostras em um surto ocorrido no nordeste do Brasil no ano de 2013. Em conjunto esses fatores são relevantes e justificam a escolha desses iniciadores, já que a elevada variabilidade genética do VSV tem implicações diretas nas técnicas moleculares sendo, portanto, primordial o uso de oligonucleotídeos que sejam capazes de amplificar as amostras que circulam atualmente no território nacional.

Para a adaptação da reação foram testados as concentração, temperatura de pareamento dos iniciadores e concentrações de magnésio. Por fim, com o objetivo de otimizar o rendimento da PCR, foram utilizados iniciadores específicos e randômicos na transcrição reversa. Amplificações de tamanho esperado, mas de fraca intensidade, foram visualizadas nas condições de 6pmol de iniciadores a 45°C com 2,0mM e 2,5mM de magnésio. Pelo fato do vírus utilizado para essas análises estar em alto título, era esperado um maior rendimento da reação, com amplificações mais intensas. Esse resultado insatisfatório pode ser decorrente de mau pareamento na região 3' do iniciador em relação a amostra padrão utilizada(anexo1).

Em virtude desses resultados, foi feito o em contato com um grupo de pesquisadores da Universidade Federal de Santa Maria, que recentemente utilizou esses iniciadores para o estudo de surtos de VSAV no nordeste do Brasil em 2013. O grupo informou que também não obteve sucesso na amplificação da amostra VSIV utilizando esses oligonucleotídeos. Pelo fato de, assim como nós, não terem as amostras *Cocal virus* e *Alagoas virus* para utilizar como controles, fizeram testes sem controle positivo e nos forneceram as condições da PCR padronizadas por eles. Foram então utilizadas essas condições e, em paralelo, a PCR com a enzima Go Taq Hot Start com cDNA produzidos com iniciadores específicos e aleatórios também foi testada. Para isso foram usadas amostras possivelmente positivas pertencentes a coleção do

laboratório de vírus. A PCR caseira apresentou mais amplificações inespecíficas, quando comparada a enzima taq hot start. Dessa forma, de acordo com os resultados observados a melhor condição a ser utilizada foi a transcrição reversa com iniciadores específico e PCR com a enzima taq Hot start.

Não foram detectadas amplificações para o sorotipo 3. Para o sorotipo 2 todas as reações apresentaram bandas de tamanho um pouco diferente do tamanho esperado .Pelo fato da região da fosfoproteína utilizada nessa reação ser hipervariável foram feitas tentativas de seqüenciamento desses produtos, mas, sem sucesso, ficando essa etapa como perspectivas para trabalhos futuros.

Para a análise do comportamento da qPCR usando PBMC, foi feita uma reação com cDNA de PBMCs sem contaminar e com adição de contaminação deliberada por VSV IND-I. As amostras contaminadas tiveram resultados similares ao controle positivo, já as que não receberam a contaminação, apresentaram comportamento diferente do controle negativo, produzindo um platô de temperatura de dissociação, fato que inviabiliza ou dificulta a análise dos resultados. Na tentativa de diminuir ou eliminar essas amplificações foram feitas diluições no cDNA e testes com iniciadores para a região da polimerase e nucleoproteína, entretanto sem êxito, pois em todas as condições foram visualizadas amplificações com temperatura de dissociação similar ao controle positivo. O produto de cada uma dessas reações foi fracionado por eletroforese, abordagem que permitiu constatar que as amplificações eram diferentes do fragmento amplificado no controle positivo.

Pela dificuldade no desenho de iniciadores, na padronização de uma qPCR para a triagem dos PBMCs e por serem escassos ou ausentes relatos de detecção de VSV em PBMC descrito na literatura essa matriz não foi usada para detecção desse vírus.

Para BoHV-1 e BoHV-5 foi detectada uma positividade de 8%. Essas amostras podem ser positivas para BoHV-1 ou BoHV-5, pois a detecção foi baseada em uma região conservada da glicoproteína B que não permite a distinção entre esses vírus.

Em relação à matriz de análise, foram detectadas amostras positivas em soros e crostas. O maior número de animais infectados com BoHV-1/5 pertence ao estado do Espírito Santo com 14% de positividade, seguido de Goiás e Bahia com 12% e 6%, respectivamente.

A positividade de 8% para BoHV1/5 nesse trabalho é discrepante em relação a vários estudos soropidemiológicos conduzidos nos últimos anos, na qual são encontrados 40 a 60% de bovinos positivos (tabela 7). Isso pode ser justificado pelo fato dos trabalhos sorológicos demonstrarem um prévio contato do animal com o vírus, não permitindo saber quando nem se o contato foi de forma natural ou por vacinação. Em contrapartida os dados moleculares evidenciam a presença viral no momento da coleta.

Pelo fato dos herpesvirus terem mecanismo de latência, que permitem a permanência indefinida do vírus nos hospedeiros, acompanhada de episódios esporádicos de reativação e disseminação viral (Franco & Roehle, 2007), esses dados de positividade não permitem a distinção de uma infecção primária de uma reativação da latência, mas evidenciam a ativa circulação desses vírus no rebanho brasileiro.

Para a caracterização das amostras de soro e crostas positivas na triagem por qPCR foi utilizada a região 5' da glicoproteína C. Na padronização dos iniciadores foi utilizada a PCR caseira e a PCR com a enzima taq hot star através de um gradiente de temperatura. Amplificações inespecíficas foram visualizadas em todas as condições testadas e as amostras BoHV-1 e BoHV-5 tiveram o mesmo perfil de amplificação, não sendo possível por eletroforese, a distinção desses vírus. Em virtude do tempo, não foi possível o uso ou desenho de novos iniciadores, ficando isso como perspectivas para trabalhos futuros.



Pelo fato dos herpesvirus poderem ser detectados em PBMCs, a análise do comportamento da qPCR para a matriz foi iniciada pela verificação da quantidade ideal de DNA a ser utilizada. Todas as quantidades testadas apresentaram resultados similares, com temperatura de dissociação diferente do controle positivo. Como esse trabalho visa à manipulação de amostras de campo, a quantidade de escolha foi a maior possível, pois quanto maior a quantidade de PBMC utilizado maior as chances de detecção viral.

Na próxima etapa foram utilizados PBMCs contaminados deliberadamente com a amostra viral BoHV-1 em várias diluições. Era esperado que todas as amostras apresentassem curva e temperatura de dissociação similar ao observado para o controle positivo, mas todas as diluições apresentaram resultados diferentes do esperado, o que inviabilizou o uso dessa reação. Esses resultados podem ser devido à matriz de PBMC que contem maior quantidade de material genético e outros componentes celulares, quando comparado a soros e crostas, que possivelmente interferiram na dinâmica da reação.

Para BoHV-2 foram analisadas amostras de crostas e soros mas não foi detectada nenhuma amostra positiva, o que sugere uma baixa circulação do vírus nas regiões de estudo.

Mecanismos biológicos utilizados pelos vírus analisados nesse trabalho contribuem para a debilidade do sistema imunológico dos bovinos. O tropismo do BVDV por linfócitos T e B (Bolin, *et al.*, 1985), associado a latência dos herpesvirus, que permite a manutenção indefinida do vírus no hospedeiro e episódios esporádicos de reativação e disseminação viral (Franco & Roehe, 2007) além do tropismo do VSV por vários tipos celulares (Hastie *et al.*, 2013) propiciam a ocorrência de co-infecções. Dentre as amostras analisadas, em quatro houve a detecção de BVDV e VSV, duas apresentaram co-infecção com BVDV e BoHV-1/5, e 3 amostras foram detectados VSV e BoHV1/5.

Em síntese, nesse estudo não houve detecção de BoHV-2 nas amostras analisadas, mas foi constatada a circulação do BVDV, VSV e BoHV-1/5 em

bovinos provenientes de diferentes estados brasileiros e também a existência de co-infecções virais.

## 10.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELMAGID, O. Y. et al. Evaluation of baculovirus-expressed bovine herpesvirus-1 (BHV-1) glycoproteins for detection and analysis of BHV-1-specific antibody responses. **Vet Microbiol**, v. 61, n. 4, p. 249-59, Apr 1998. ISSN 0378-1135. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9646475> >.

ACKERMANN, M. Pathogenesis of gammaherpesvirus infections. **Vet Microbiol**, v. 113, n. 3-4, p. 211-22, Mar 2006. ISSN 0378-1135. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16332416> >.

AFONSO, D. A. et al. Characterization of field bovine herpesvirus samples using random amplified polymorphic DNA (RAPD). **J Virol Methods**, v. 140, n. 1-2, p. 200-5, Mar 2007. ISSN 0166-0934. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17126417> >.

ARIAS, P. et al. Genetic heterogeneity of bovine viral diarrhoea viruses from Spain. **Vet Microbiol**, v. 96, n. 4, p. 327-36, Nov 2003. ISSN 0378-1135. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14599780> >.

BABIUK, L. A.; VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S.; TIKOO, S. K. Immunology of bovine herpesvirus 1 infection. **Vet Microbiol**, v. 53, n. 1-2, p. 31-42, Nov 1996. ISSN 0378-1135. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9010996> >.

BAKER, J. C. The clinical manifestations of bovine viral diarrhea infection. **Vet Clin North Am Food Anim Pract**, v. 11, n. 3, p. 425-45, Nov 1995. ISSN 0749-0720. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8581856> >.

BAUERMANN, F. V.; FLORES, E. F.; RIDPATH, J. F. Antigenic relationships between Bovine viral diarrhea virus 1 and 2 and HoBi virus: possible impacts on diagnosis and control. **J Vet Diagn Invest**, v. 24, n. 2, p. 253-61, Mar 2012. ISSN 1943-4936. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22379042> >.

BOLIN, S. R. The pathogenesis of mucosal disease. **Vet Clin North Am Food Anim Pract**, v. 11, n. 3, p. 489-500, Nov 1995. ISSN 0749-0720. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8581859> >.

BRODERSEN, B. W. Bovine viral diarrhoea virus infections: manifestations of infection and recent advances in understanding pathogenesis and control. **Vet Pathol**, v. 51, n. 2, p. 453-64, Mar 2014. ISSN 1544-2217. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24476940> >.

BROWNLIE, J. Pathogenesis of mucosal disease and molecular aspects of bovine virus diarrhoea virus. **Vet Microbiol**, v. 23, n. 1-4, p. 371-82, Jun 1990. ISSN 0378-1135. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2169681> >.

CARGNELUTTI, J. F. et al. Outbreaks of Vesicular stomatitis Alagoas virus in horses and cattle in northeastern Brazil. **J Vet Diagn Invest**, v. 26, n. 6, p. 788-94, Nov 2014. ISSN 1943-4936. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25274744> >.

CHOWDHURY, S. I. Molecular basis of antigenic variation between the glycoproteins C of respiratory bovine herpesvirus 1 (BHV-1) and neurovirulent BHV-5. **Virology**, v. 213, n. 2, p. 558-68, Nov 1995. ISSN 0042-6822. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7491780> >.

COLLETT, M. S. et al. Proteins encoded by bovine viral diarrhoea virus: the genomic organization of a pestivirus. **Virology**, v. 165, n. 1, p. 200-8, Jul 1988. ISSN 0042-6822. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2838958> >.

CORAPI, W. V.; DONIS, R. O.; DUBOVI, E. J. Characterization of a panel of monoclonal antibodies and their use in the study of the antigenic diversity of bovine viral diarrhoea virus. **Am J Vet Res**, v. 51, n. 9, p. 1388-94, Sep 1990. ISSN 0002-9645. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2168687> >.

D'OFFAY, J. M. et al. Diagnosis of encephalitic bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) infection in cattle: virus isolation and immunohistochemical detection of antigen in formalin-fixed bovine brain tissues. **J Vet Diagn Invest**, v. 7, n. 2, p. 247-51, Apr 1995. ISSN 1040-6387. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7619909> >.

DONIS, R. O. Molecular biology of bovine viral diarrhoea virus and its interactions with the host. **Vet Clin North Am Food Anim Pract**, v. 11, n. 3, p. 393-423, Nov 1995. ISSN 0749-0720. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8581855> >.

EDWARDS, S.; WHITE, H.; NIXON, P. A study of the predominant genotypes of bovid herpesvirus 1 found in the U.K. **Vet Microbiol**, v. 22, n. 2-3, p. 213-23, Apr 1990. ISSN 0378-1135. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2162101> >.

ENGELS, M.; ACKERMANN, M. Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. **Vet Microbiol**, v. 53, n. 1-2, p. 3-15, Nov 1996. ISSN 0378-1135. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9010994> >.

ESTEVEZ, P. A. et al. Phylogenetic comparison of the carboxy-terminal region of glycoprotein C (gC) of bovine herpesviruses (BoHV) 1.1, 1.2 and 5 from South America (SA). **Virus Res**, v. 131, n. 1, p. 16-22, Jan 2008. ISSN 0168-1702. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17889957> >.

FALCONE, E. et al. Genetic heterogeneity of bovine viral diarrhoea virus in Italy. **Vet Res Commun**, v. 27, n. 6, p. 485-94, Sep 2003. ISSN 0165-7380. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14582747> >.

FEDERER, K. E.; BURROWS, R.; BROOKSBY, J. B. Vesicular stomatitis virus-the relationship between some strains of the Indiana serotype. **Res Vet Sci**, v. 8, n. 1, p. 103-17, Jan 1967. ISSN 0034-5288. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4291620> >.

FLORES, E. F. et al. Phylogenetic analysis of Brazilian bovine viral diarrhoea virus type 2 (BVDV-2) isolates: evidence for a subgenotype within BVDV-2. **Virus Res**, v. 87, n. 1, p. 51-60, Jul 2002. ISSN 0168-1702. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12135789> >.

FULTON, R. W. et al. Challenge with Bovine viral diarrhoea virus by exposure to persistently infected calves: protection by vaccination and negative results of antigen testing in nonvaccinated acutely infected calves. **Can J Vet Res**, v. 70, n. 2, p. 121-7, Apr 2006. ISSN 0830-9000. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16639944> >.

\_\_\_\_\_. Response of calves persistently infected with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus (BVDV) subtype 1b after vaccination with heterologous BVDV strains in modified live virus vaccines and Mannheimia haemolytica bacterin-toxoid. **Vaccine**, v. 21, n. 21-22, p. 2980-5, Jun 2003. ISSN 0264-410X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12798641> >.

GROOMS, D. L. Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhoea virus. **Vet Clin North Am Food Anim Pract**, v. 20, n. 1, p. 5-19, Mar

2004. ISSN 0749-0720. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15062471>>.

GUARINO, H. et al. Prevalence of serum antibodies to bovine herpesvirus-1 and bovine viral diarrhoea virus in beef cattle in Uruguay. **Prev Vet Med**, v. 85, n. 1-2, p. 34-40, Jun 2008. ISSN 0167-5877. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18280598>>.

HOUE, H. Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections. **Vet Microbiol**, v. 64, n. 2-3, p. 89-107, Jan 1999. ISSN 0378-1135. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10028165>>.

JIMÉNEZ, A. E. et al. Serological survey of small mammals in a vesicular stomatitis virus enzootic area. **J Wildl Dis**, v. 32, n. 2, p. 274-9, Apr 1996. ISSN 0090-3558. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8722265>>.

KAASHOEK, M. J.; VAN OIRSCHOT, J. T. Early immunity induced by a live gE-negative bovine herpesvirus 1 marker vaccine. **Vet Microbiol**, v. 53, n. 1-2, p. 191-7, Nov 1996. ISSN 0378-1135. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9011011>>.

LANYON, S. R. et al. Bovine viral diarrhoea: pathogenesis and diagnosis. **Vet J**, v. 199, n. 2, p. 201-9, Feb 2014. ISSN 1532-2971. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24053990>>.

LEE, D. H. et al. Investigation of the prevalence of bovine viral diarrhoea virus in dairy cows in South Korea. **Vet Rec**, v. 162, n. 7, p. 211-3, Feb 2008. ISSN 0042-4900. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18281628>>.

LETCHWORTH, G. J.; LADUE, R. Bovine herpes mammillitis in two New York dairy herds. **J Am Vet Med Assoc**, v. 180, n. 8, p. 902-7, Apr 1982. ISSN 0003-1488. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6282794>>.

LIANG, X.; BABIUK, L. A.; ZAMB, T. J. An in vivo study of a glycoprotein gIII-negative bovine herpesvirus 1 (BHV-1) mutant expressing beta-galactosidase: evaluation of the role of gIII in virus infectivity and its use as a vector for mucosal immunization. **Virology**, v. 189, n. 2, p. 629-39, Aug 1992. ISSN 0042-6822. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1322592>>.

LIU, L. et al. Phylogeny, classification and evolutionary insights into pestiviruses. **Virology**, v. 385, n. 2, p. 351-7, Mar 2009. ISSN 1096-0341. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19167739> >.

MCCLUSKEY, B. J.; BEATY, B. J.; SALMAN, M. D. Climatic factors and the occurrence of vesicular stomatitis in New Mexico, United States of America. **Rev Sci Tech**, v. 22, n. 3, p. 849-56, Dec 2003. ISSN 0253-1933. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15005542> >.

METZLER, A. E.; SCHUDEL, A. A.; ENGELS, M. Bovine herpesvirus 1: molecular and antigenic characteristics of variant viruses isolated from calves with neurological disease. **Arch Virol**, v. 87, n. 3-4, p. 205-17, 1986. ISSN 0304-8608. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3004386> >.

MUYLKENS, B. et al. Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. **Vet Res**, v. 38, n. 2, p. 181-209, 2007 Mar-Apr 2007. ISSN 0928-4249. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17257569> >.

NICHOL, S. T.; ROWE, J. E.; FITCH, W. M. Punctuated equilibrium and positive Darwinian evolution in vesicular stomatitis virus. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 90, n. 22, p. 10424-8, Nov 1993. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8248125> >.

OLDONI, I. et al. Production and characterization of monoclonal antibodies to a Brazilian bovine herpesvirus type 5. **Braz J Med Biol Res**, v. 37, n. 2, p. 213-21, Feb 2004. ISSN 0100-879X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14762576> >.

OTONEL, R. A. et al. The diversity of BVDV subgenotypes in a vaccinated dairy cattle herd in Brazil. **Trop Anim Health Prod**, v. 46, n. 1, p. 87-92, Jan 2014. ISSN 1573-7438. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23877647> >.

PAUSZEK, S. J.; ALLENDE, R.; RODRIGUEZ, L. L. Characterization of the full-length genomic sequences of vesicular stomatitis Cocal and Alagoas viruses. **Arch Virol**, v. 153, n. 7, p. 1353-7, 2008. ISSN 0304-8608. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18512001> >.

PAUSZEK, S. J. et al. Genetic and antigenic relationships of vesicular stomatitis viruses from South America. **Arch Virol**, v. 156, n. 11, p. 1961-8, Nov 2011. ISSN 1432-8798. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21830071> >.

PEDRERA, M. et al. Quantification and determination of spread mechanisms of bovine viral diarrhoea virus in blood and tissues from colostrum-deprived calves during an experimental acute infection induced by a non-cytopathic genotype 1 strain. **Transbound Emerg Dis**, v. 59, n. 5, p. 377-84, Oct 2012. ISSN 1865-1682. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22151958> >.

PHILPOTT, M. The dangers of disease transmission by artificial insemination and embryo transfer. **Br Vet J**, v. 149, n. 4, p. 339-69, 1993 Jul-Aug 1993. ISSN 0007-1935. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8221041> >.

RIDPATH, J. F. Bovine viral diarrhoea virus: global status. **Vet Clin North Am Food Anim Pract**, v. 26, n. 1, p. 105-21, table of contents, Mar 2010. ISSN 1558-4240. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20117546> >.

RIDPATH, J. F.; BOLIN, S. R. The genomic sequence of a virulent bovine viral diarrhoea virus (BVDV) from the type 2 genotype: detection of a large genomic insertion in a noncytopathic BVDV. **Virology**, v. 212, n. 1, p. 39-46, Sep 1995. ISSN 0042-6822. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7676648> >.

RIDPATH, J. F.; BOLIN, S. R.; DUBOVI, E. J. Segregation of bovine viral diarrhoea virus into genotypes. **Virology**, v. 205, n. 1, p. 66-74, Nov 1994. ISSN 0042-6822. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7975238> >.

RIJSEWIJK, F. A. et al. Epitopes on glycoprotein C of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) that allow differentiation between BHV-1.1 and BHV-1.2 strains. **J Gen Virol**, v. 80 ( Pt 6), p. 1477-83, Jun 1999. ISSN 0022-1317. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10374966> >.

RODRIGUEZ, L. L. et al. Re-emergence of vesicular stomatitis in the western United States is associated with distinct viral genetic lineages. **Virology**, v. 271, n. 1, p. 171-81, May 2000. ISSN 0042-6822. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10814582> >.

RODRÍGUEZ, L. L. Emergence and re-emergence of vesicular stomatitis in the United States. **Virus Res**, v. 85, n. 2, p. 211-9, May 2002. ISSN 0168-1702. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12034487> >.

RODRÍGUEZ, L. L.; FITCH, W. M.; NICHOL, S. T. Ecological factors rather than temporal factors dominate the evolution of vesicular stomatitis virus. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 23, p. 13030-5, Nov 1996. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8917539> >.



ROIZMANN, B. et al. The family Herpesviridae: an update. The Herpesvirus Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. **Arch Virol**, v. 123, n. 3-4, p. 425-49, 1992. ISSN 0304-8608. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1562239> >.

SCHMITT, B. Vesicular stomatitis. **Vet Clin North Am Food Anim Pract**, v. 18, n. 3, p. 453-9, vii-viii, Nov 2002. ISSN 0749-0720. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12442577> >.

SCHWYZER, M.; ACKERMANN, M. Molecular virology of ruminant herpesviruses. **Vet Microbiol**, v. 53, n. 1-2, p. 17-29, Nov 1996. ISSN 0378-1135. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9010995> >.

SILVA, M. S. et al. Molecular and antigenic characterization of Brazilian bovine herpesvirus type 1 isolates recovered from the brain of cattle with neurological disease. **Virus Res**, v. 129, n. 2, p. 191-9, Nov 2007. ISSN 0168-1702. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17822796> >.

STÅHL, K.; ALENIUS, S. BVDV control and eradication in Europe--an update. **Jpn J Vet Res**, v. 60 Suppl, p. S31-9, Feb 2012. ISSN 0047-1917. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22458198> >.

TAJIMA, M. et al. Prevalence of genotypes 1 and 2 of bovine viral diarrhoea virus in Lower Saxony, Germany. **Virus Res**, v. 76, n. 1, p. 31-42, Jul 2001. ISSN 0168-1702. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11376844> >.

TALAFHA, A. Q. et al. Prevalence and risk factors associated with bovine viral diarrhoea virus infection in dairy herds in Jordan. **Trop Anim Health Prod**, v. 41, n. 4, p. 499-506, Apr 2009. ISSN 0049-4747. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18654834> >.

TESH, R. B.; PERALTA, P. H.; JOHNSON, K. M. Ecologic studies of vesicular stomatitis virus. I. Prevalence of infection among animals and humans living in an area of endemic VSV activity. **Am J Epidemiol**, v. 90, n. 3, p. 255-61, Sep 1969. ISSN 0002-9262. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4309413> >.

THIRY, J. et al. Ruminant alphaherpesviruses related to bovine herpesvirus 1. **Vet Res**, v. 37, n. 2, p. 169-90, 2006 Mar-Apr 2006. ISSN 0928-4249. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16472518> >.

TRAESEL, C. K. et al. Nucleotide sequencing and phylogenetic analysis of the 3' region of glycoprotein C gene of South American bovine herpesviruses 1 and 5. **Res Vet Sci**, v. 94, n. 1, p. 178-85, Feb 2013. ISSN 1532-2661. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22929314> >.

\_\_\_\_\_. Genetic diversity of 3' region of glycoprotein D gene of bovine herpesvirus 1 and 5. **Virus Genes**, v. 48, n. 3, p. 438-47, Jun 2014. ISSN 1572-994X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24482291> >.

TURNER, A. J.; KOVESDY, L.; MORGAN, I. R. Isolation and characterisation of bovine herpesvirus mammillitis virus and its pathogenicity for cattle. **Aust Vet J**, v. 52, n. 4, p. 166-9, Apr 1976. ISSN 0005-0423. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/180955> >.

VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S. et al. Expression of bovine herpesvirus 1 glycoprotein gIV by recombinant baculovirus and analysis of its immunogenic properties. **J Virol**, v. 65, n. 1, p. 263-71, Jan 1991. ISSN 0022-538X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1845887> >.

VAN OIRSCHOT, J. T. et al. A subclinical infection of bulls with bovine herpesvirus type 1 at an artificial insemination centre. **Vet Rec**, v. 132, n. 2, p. 32-5, Jan 1993. ISSN 0042-4900. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8382889> >.

VILCEK, S. et al. Genetic typing of bovine pestiviruses from England and Wales. **Vet Microbiol**, v. 69, n. 4, p. 227-37, Sep 1999. ISSN 0378-1135. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10535769> >.

\_\_\_\_\_. Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups. **Arch Virol**, v. 146, n. 1, p. 99-115, 2001. ISSN 0304-8608. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11266221> >.

WEBB, P. A. et al. Epizootic vesicular stomatitis in Colorado, 1982: epidemiologic studies along the northern Colorado front range. **Am J Trop Med Hyg**, v. 36, n. 1, p. 183-8, Jan 1987. ISSN 0002-9637. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3028193> >.

WILHELMSSEN, C. L. et al. Experimental primary postnatal bovine viral diarrhoea viral infections in six-month-old calves. **Vet Pathol**, v. 27, n. 4, p. 235-43, Jul 1990. ISSN 0300-9858. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2169664> >.

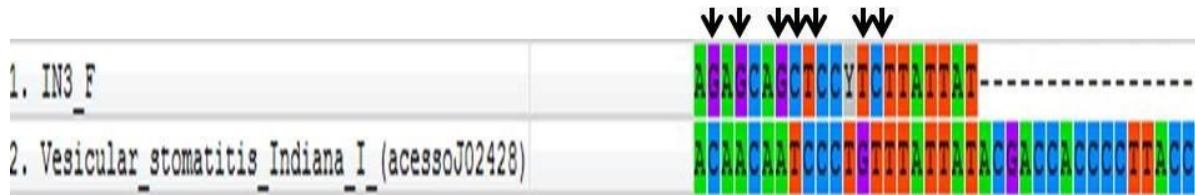
WILSON, W. C. et al. Field evaluation of a multiplex real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay for detection of Vesicular stomatitis virus. **J Vet Diagn Invest**, v. 21, n. 2, p. 179-86, Mar 2009. ISSN 1040-6387. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19286495> >.



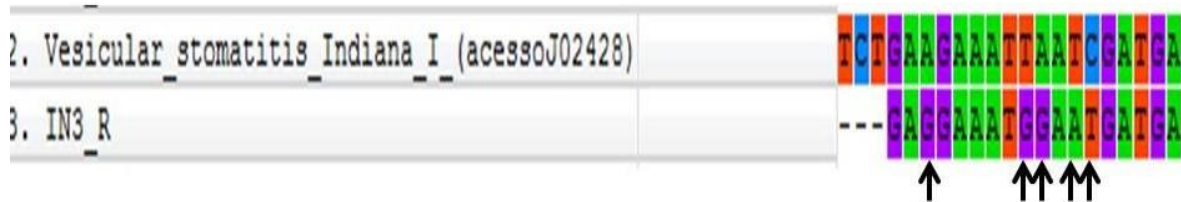
## 11.0 ANEXO

### - Pareamento dos iniciadores descritos por Pauszek *et al*, 2011 com a amostra VSIV

#### Pareamento do iniciador Foward com amostra VSV IND I



#### Pareamento do iniciador Reverse com amostra VSV IND I



**Figura anexo 1.** Pareamento dos iniciadores descritos por Pauszek *et al.*, 2011 que tem como alvo a região da fosfoproteína e amplifica 658 pb. As setas indicam *mismatches*. A análise realizada no programa MEGA 6.0