

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

**PREVALÊNCIA E FATORES DE RISCO ASSOCIADOS ÀS INFECÇÕES
PELOS HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 1 E 5 (BHV-1 e 5) E PELO VÍRUS DA
DIARRÉIA VIRAL BOVINA (BVDV) NOS REBANHOS DOS MUNICÍPIOS
DE SANTA VITÓRIA DO PALMAR E CHUÍ.**

CAREN GULARTE QUINCOZES

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pelotas, sob a orientação do Prof. Dr. Telmo Vidor, como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Veterinária, Área de Concentração: Virologia, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

PELOTAS
Rio Grande do Sul - Brasil
Agosto de 2005

CAREN GULARTE QUINCOZES

**PREVALÊNCIA E FATORES DE RISCO ASSOCIADOS ÀS INFECÇÕES
PELOS HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 1 E 5 (BHV-1 e 5) E PELO VÍRUS DA
DIARRÉIA VIRAL BOVINA (BVDV) NOS REBANHOS DOS MUNICÍPIOS
DE SANTA VITÓRIA DO PALMAR E CHUÍ.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pelotas, sob a orientação do Prof. Dr. Telmo Vidor, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Área de Concentração: Virologia, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

APROVADA: 16 de Agosto de 2005

Prof^o Dr. Claudiomar Soares Brod
(Co – Orientador)

Prof^a Dr^a. Ana Cláudia Franco

Prof^a Dr^a. Sílvia de Oliveira Hübner

Prof. Dr. Telmo Vidor
(Orientador)

Dedico aos meus pais, Luiz Carlos e Vera Lúcia, a quem agradeço de todo coração, pois sempre incentivaram meus estudos e minha carreira profissional; a minha irmã Carla pela grande amizade e carinho; a minha sobrinha Júlia pela fonte de alegria e pelas brincadeiras; ao meu noivo João pelo amor, companheirismo, confiança e compreensão.

Minha eterna gratidão

AGRADECIMENTOS

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

À Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) pela oportunidade de realização desta pós-graduação.

A todos os professores e funcionários da Faculdade de Veterinária, por tornarem possível a minha estada neste pós-graduação.

Ao professor orientador Dr. Telmo Vidor um sincero e especial agradecimento pela sua dedicação em me orientar e por ter depositado em mim total confiança na execução deste trabalho na área de Virologia Animal.

Ao colega do curso de pós-graduação Geferson Fischer pela amizade e colaboração na execução do meu projeto de pesquisa.

Aos amigos e colegas de trabalho, Marlete Cleff, Fabiane Gentilini, Sílvia de Oliveira Hübner, Ana Cláudia Franco, Luana Dummer, Camila Vilela, Tiago Storch, Fabrício Campos com os quais tive o privilégio de poder compartilhar da amizade e de ter um convívio alegre.

Aos funcionários do Laboratório de Virologia, José Carlos R. Sandrini e Enilda Souza de Oliveira pela amizade e por tornarem possível e agradável a minha presença neste laboratório.

À equipe do Centro de Controle de Zoonoses da UFPel, em especial ao professor Dr. Claudiomar Brod, que permitiu e viabilizou a execução deste trabalho nas propriedades de Santa Vitória do Palmar e Chuí e pelo auxílio na análise estatística deste trabalho.

Ao professor Schuch pela colaboração com materiais para a Dissertação.

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

Muito Obrigado!!!

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
SUMÁRIO.....	xi
SUMMARY.....	xiii
1.INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	4
2.1. HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 1 (BHV-1) E TIPO 5 (BHV-5).....	4
2.2. PROPRIEDADES.....	4
2.2.1 MORFOLOGIA E ESTRUTURA.....	4
2.2.2. COMPOSIÇÃO QUÍMICA.....	5
2.2.3. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS.....	6
2.2.4. PROTEÍNAS.....	6
2.3. MULTIPLICAÇÃO VIRAL.....	6
2.4. PATOGENIA.....	8
2.5. LATÊNCIA.....	9
2.6. SINAIS CLÍNICOS E LESÕES.....	10
2.6.1. INFECÇÃO PELO BHV-1.....	10
2.6.1.1. FORMA RESPIRATÓRIA E CONJUNTIVITE.....	10

2.6.1.2. FORMA REPRODUTIVA	11
2.6.1.3. FORMA SISTÊMICA NEONATAL	13
2.6.2. INFECÇÃO PELO BHV-5.....	13
2.7. IMUNOLOGIA	14
2.8. EPIDEMIOLOGIA DO BHV-1	16
2.9. EPIDEMIOLOGIA DO BHV-5	17
2.10. SITUAÇÃO NO MUNDO	18
2.10.1. BHV-1.....	18
2.10.2. BHV-5.....	20
2.11. SITUAÇÃO NO BRASIL	20
2.11.1. BHV-1.....	20
2.11.2. BHV-5.....	24
2.12. DIAGNÓSTICO	25
2.12.1. DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO.....	26
2.12.2. DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO	27
2.13. CONTROLE E PREVENÇÃO.....	28
2.14. DIARRÉIA VIRAL BOVINA.....	29
2.15. PROPRIEDADES	30
2.15.1. MORFOLOGIA E ESTRUTURA	30
2.15.2. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS	31
2.15.3. PROTEÍNAS	31
2.16. MULTIPLICAÇÃO VIRAL.....	32
2.17. PATOGENIA E SINAIS CLÍNICOS.....	33
2.17.1. INFECÇÕES PRÉ-NATAIS	33
2.17.2. INFECÇÕES PÓS-NATAIS	35
2.17.3. DOENÇA DAS MUCOSAS	35
2.18. IMUNOLOGIA	36
2.18.1. IMUNOSUPRESSÃO	36
2.18.2. EFEITOS DO BVDV NA PRODUÇÃO DE INTERFERON E RESPOSTA IMUNE ADAPTATIVA	37
2.19. EPIDEMIOLOGIA	40

2.19.1. TRANSMISSÃO	40
2.20. SITUAÇÃO NO MUNDO	42
2.21. SITUAÇÃO NO BRASIL	45
2.22. DIAGNÓSTICO	49
2.23. CONTROLE E PREVENÇÃO	50
3. MATERIAL E MÉTODOS	53
3.1. AMOSTRAS DE SORO	53
3.2. CÉLULAS	54
3.3. VÍRUS	54
3.4. PREPARAÇÃO DOS VÍRUS	55
3.5. TITULAÇÃO DOS VÍRUS	55
3.6. SORONEUTRALIZAÇÃO	55
3.7. ISOLAMENTO VIRAL	56
3.8. FATORES DE RISCO	58
3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA	58
4. RESULTADOS	59
4.1. RESULTADOS SOROLÓGICOS	59
4.2. RESULTADOS DOS ISOLAMENTOS	65
5. DISCUSSÃO	66
6. CONCLUSÕES	72
7. ANEXOS	73
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Prevalência de herpesvírus bovino (BHV) e vírus da diarreia viral bovina (BVDV) no rebanho bovino de Santa Vitória do Palmar e Chuí.....	60
TABELA 2	Prevalência das infecções de BHV e BVDV nas propriedades.....	61
TABELA 3	Distribuição das amostras positivas para o BHV em relação à faixa etária e sexo.....	61
TABELA 4	Distribuição das amostras positivas para o BVDV em relação a faixa etária e sexo.....	62
TABELA 5	Fator de risco para a infecção pelo BHV nas propriedades dos municípios de Santa Vitória do Palmar e Chuí.....	63
TABELA 6	Fatores de risco para a infecção pelo BVDV nas propriedades dos municípios de Santa Vitória do Palmar e Chuí.....	64

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Secreção nasal em um bovino infectado pelo BHV.....	56
FIGURA 2	Secreção ocular em um bovino infectado pelo BHV.....	56
FIGURA 3	Distribuição dos títulos dos anticorpos nos rebanhos infectados com herpesvírus bovino (BHV) e vírus da diarreia viral bovina (BVDV).....	60
FIGURA 4	Cultivo celular com efeito citopático em células MDBK.....	65
FIGURA 5	Inclusões nucleares causadas pelo BHV em células MDBK.....	65

SUMÁRIO

QUINCOZES, CAREN. G., Universidade Federal de Pelotas, Agosto de 2005.
Prevalência e fatores de risco associados as infecções pelos Herpesvírus Bovino (BHV-1 e 5) e Diarréia Viral Bovina (BVD) nos rebanhos dos municípios de Santa Vitória do Palmar e Chuí. Professor Orientador: Dr. Telmo Vidor.

O presente estudo teve como objetivo estimar a prevalência das infecções pelo herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1), herpesvírus bovino tipo 5 (BHV-5) e o vírus da diarréia viral bovina (BVDV) e determinar os principais fatores de risco para essas infecções no rebanho bovino dos municípios de Santa Vitória do Palmar e Chuí. Além disso, é descrito o isolamento de BHV-1 e BHV-5 a partir de um surto de rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) e vulvovaginite pustular infecciosa (IPV) em Rio Grande, e de um surto de encefalite em Santa Vitória do Palmar. Amostras de soro foram submetidas à prova de soroneutralização, e, para cada propriedade foi aplicado um questionário epidemiológico, para investigar fatores de risco que poderiam estar associadas a estas infecções. As amostras de soro foram coletadas nos meses de janeiro e fevereiro de 2003, em 85 propriedades de Santa Vitória do Palmar e Chuí. A maioria das amostras eram de bovinos de corte, apresentando ou não sinais clínicos de infecção por BHV ou BVDV. De 1.734 amostras de soro analisadas, 540 (31,14%) foram positivas para BHV e 1.150 (66,32%) foram positivas para BVDV. Foram detectados bovinos sorologicamente positivos para o BHV em 72 propriedades,

representando 84,70% e, para o BVDV, em 70 propriedades, representando 82,35% do total de propriedades. As altas percentagens de positividade demonstram a expressiva disseminação desses vírus no rebanho bovino destes municípios.

SUMMARY

QUINCOZES, CAREN. G., Universidade Federal de Pelotas, August, 2005.
Prevalence and risk factors to the infectious by Bovine Herpesvirus Type 1 (BHV-1 e 5) and Bovine Viral Diarrhea in the herds of Santa Vitória do Palmar and Chuí counties. Adviser: Dr. Telmo Vidor.

This study was performed in order to estimate the prevalence of bovine herpesvirus type 1 (BHV-1), bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) and bovine viral diarrhea (BVDV) infections and to determine the main risk factors related to the prevalence of these infections in cattle of Santa Vitória do Palmar and Chuí counties. In addition, we describe BHV-1 and BHV-5 isolation from infectious bovine rhinotracheitis (IBR) and pustular vulvovaginitis (IPV) outbreaks in Rio Grande, and encephalitis outbreaks in Santa Vitória do Palmar. Sera from all the animals were submitted to the serum neutralization test (SN) and an epidemiological questionnaire was filled out in each property to investigate variables that could be associated with these infections. The sera samples were collected in January and February of 2003, in 85 farms of Santa Vitória do Palmar and Chuí. The highest number of samples were from beef cattle, with or without clinical signs of BHV or BVDV infection. Of 1.734 serum samples examined, 540 (31,14%) were positive to BHV and 1.150 (66,32%) were positive to BVDV. Cattle seropositive to BHV were detected in 72 farms, representing 84,70% and, to BVDV, 70 farms, representing a percentage of 82,35%. The high percentages

of positives demonstrate the expressive dissemination of this viruses in cattle of these counties.

1. INTRODUÇÃO

O herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1) é um importante patógeno de bovinos, podendo causar doença respiratória, conhecida como rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), além de conjuntivite, vulvovaginite pustular infecciosa (IPV), balanopostite pustular infecciosa (IPB), reabsorção embrionária, aborto, infertilidade temporária, nascimento de animais fracos e infecções sistêmicas resultando em meningoencefalite (Cerqueira *et al.*, 2000; Vieira *et al.*, 2003). O herpesvírus bovino tipo 5 (BHV-5) é o agente etiológico de meningoencefalite, enfermidade de curso geralmente fatal, que atinge principalmente animais jovens (Gomes *et al.*, 2002). Ocasionalmente o BHV-5 pode estar relacionado também com doença respiratória. (Salvador *et al.*, 1998).

Uma característica importante dos BHV é a capacidade de estabelecerem latência em gânglios de nervos sensoriais, principalmente os gânglios trigêmeos. Os herpesvírus podem ser reativados quando os animais são submetidos a fatores estressantes (Rock, 1994; Colodel *et al.*, 2002). A reativação leva à reexcreção de partículas infecciosas, sendo responsável pela perpetuação do vírus na população bovina (Cerqueira *et al.*, 2000; Vieira *et al.*, 2003).

Os BHV são transmitidos pelas secreções respiratórias, oculares e genitais, a partir de animais infectados (Calderon *et al.*, 2003). Pode também ser transmitido pelo sêmen (Wentink *et al.*, 1993; Calderon *et al.*, 2003). Esta enfermidade tem acarretado grandes prejuízos econômicos nos rebanhos bovinos, principalmente em decorrência de infecções respiratórias e de alterações reprodutivas (Miller, 1991; Cortez *et al.*, 2001; Petzhold *et al.*, 2001).

O BHV-1 e o BHV-5 são semelhantes entre si nos aspectos morfológicos, biológicos e moleculares e são antigenicamente relacionados, o que pode ser demonstrado por testes de neutralização cruzada e por reatividade com uma variedade de anticorpos monoclonais (Vogel et al., 2002; Kunrath et al., 2004). Desta forma, técnicas sorológicas ou imunológicas de rotina são incapazes de distinguir entre o BHV-1 e BHV-5. Essa relação sorológica entre os dois herpesvírus bovino reflete-se também em proteção cruzada *in vivo* e tem sido responsabilizada, em parte, pela baixa ocorrência da enfermidade neurológica pelo BHV-5 em regiões onde a infecção pelo BHV-1 é endêmica e/ou utiliza-se vacinação (Cascio et al., 1999; Kunrath et al., 2004).

O vírus da diarreia viral bovina (BVDV) é uma das doenças virais mais importantes dos bovinos (Vogel et al., 2001; Dias & Samara, 2003; Noronha et al., 2003). A infecção pelo BVDV pode resultar em uma grande variabilidade de sinais clínicos que incluem doença reprodutiva, respiratória ou digestiva (diarreia viral bovina, BVD), doença das mucosas (DM) e BVD aguda/hemorrágica (Vogel et al., 2001; Dias & Samara, 2003).

O vírus pode ser transmitido através da saliva, secreções nasais, oculares, urina, fezes, sêmen, embrião, placenta, fômites contaminados e sangue (Revell et al., 1988; Kirkland et al., 1991; Moennig & Plagemann, 1992; Houe et al., 1993; Vogel et al., 2001).

Animais podem ser infectados com o BVDV transitoriamente ou nascerem persistentemente infectados (PI). Estes animais PI são os que possuem maior importância na epidemiologia da enfermidade, devido a eliminação de grande quantidade de vírus, servindo como constante fonte de infecção para animais não imunes (Peters et al., 1987; Houe, 1995; Van Oirschot, 1998; Cerqueira et al., 2000; Del Fava et al., 2003).

O BVDV se caracteriza por apresentar uma alta taxa de animais soropositivos geralmente animais com idade acima de 3 anos. A prevalência média de animais portadores de anticorpos situa-se entre 60% e 90% em diferentes países (Brownlie, 1990).

O BVDV é classificado em biotipos citopatogênico, ou seja, vírus capazes de se replicar em células causando efeito citopático e não citopatogênico, que também replicam-se em células mas são incapazes de causar efeito citopático (Meyers e Thiel, 1996, Fray et al., 2000; Vogel et al., 2001). É importante ressaltar que somente o

biotipo não citopatogênico estabelece infecção persistente e é responsável pela circulação permanente do BVDV na população bovina (Brownlie, 1990; Booth *et al.*, 1995; Fray *et al.*, 2000).

Tanto o BHV como o BVDV têm distribuição mundial e são descritos como um problema sanitário que causa perdas produtivas (Gustafson, 1981; Canal *et al.*, 1998; Reinhardt *et al.*, 2001; Colodel *et al.*, 2002; Brackenbury *et al.*, 2003; Dias & Samara, 2003; Kunrath *et al.*, 2004). No Brasil, já foram realizados isolamentos do BHV e BVDV em diversas regiões (Vidor, 1974; Muller *et al.*, 1979; Galvão, 1985; Nogueira *et al.*, 1986; Lovato, 1998; Weiblen *et al.*, 1991; Hübner *et al.*, 1994; Weiblen *et al.*, 1996b; Flores *et al.*, 2000 a; Pinto *et al.*, 2001). Foram realizados também, em alguns estados brasileiros, inquéritos sorológicos que comprovam que o BHV e o BVDV estão bastante disseminados na população bovina do País (Rocha *et al.*, 1994; Lovato *et al.*, 1995 a; Vidor *et al.*, 1995; Barros Filho *et al.*, 1997; Pituco *et al.*, 1997; Roehle *et al.*, 1998; Rocha *et al.*, 2001; Dias & Samara, 2003).

O diagnóstico definitivo de BHV ou BVDV é realizado através da detecção do vírus (ou componentes virais) e da demonstração de anticorpos específicos. O isolamento destes vírus em cultivo celular, confirma a presença desses agentes nos animais afetados (Riet-Correa *et al.*, 1996; Roehle *et al.*, 1997b; Reinhardt *et al.*, 2001; Dias & Samara, 2003; Vieira *et al.*, 2003; Kunrath *et al.*, 2004). Nenhuma outra técnica laboratorial é tão recomendada ou sensível. A identificação final dos vírus pode ser feita por diferentes métodos, como as técnicas de soroneutralização, imunofluorescência, imunoperoxidase, ensaio imunoenzimático (ELISA) e reação de polimerase em cadeia (PCR) (Roehle, 1996; Sandvik, 1999; Guimarães *et al.*, 2000; Dias & Samara, 2003; Vieira *et al.*, 2003).

O presente trabalho foi realizado visando estabelecer a situação epidemiológica da infecção por herpesvírus bovino tipo-1, herpesvírus bovino tipo-5 e diarreia viral bovina por meio da prevalência dessas viroses e determinação dos possíveis fatores de risco para essas infecções nos rebanhos bovinos dos municípios de Santa Vitória do Palmar e Chuí, do estado do Rio Grande do Sul.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 1 (BHV-1) E TIPO 5 (BHV-5)

Os herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1) e tipo 5 (BHV-5) pertencem à família *Herpesviridae*, subfamília *Alfaherpesvirinae*. Estão também classificados nesta subfamília o vírus herpes simples humano, o vírus da doença de Aujeszky, da rinopneumonite eqüina e da laringotraqueíte aviária. Estes vírus são de crescimento rápido *in vitro* e causam lise das células infectadas. (Fenner *et al.*, 1993a). Uma outra característica importante desta subfamília é a capacidade de estabelecer infecções latentes, que podem ser reativadas periodicamente com liberação de partículas virais. O sítio principal de latência é o núcleo dos neurônios dos gânglios sensoriais (Ackermann *et al.*, 1982; Fenner *et al.*, 1993a).

2.2. PROPRIEDADES

2.2.1. MORFOLOGIA E ESTRUTURA

A estrutura e organização genômica, expressão gênica, replicação do genoma e função dos genes do BHV-1 e BHV-5 são virtualmente idênticas. Os dois vírus apresentam uma homologia superior a 85% em seus nucleotídeos e aminoácidos.

Com base nessas observações, utiliza-se a morfologia e estrutura do BHV-1 para descrever as propriedades do BHV-5 (Flores *et al.*, 1998).

O vírion do BHV-1 e BHV-5 contém uma molécula de fita dupla de DNA (dsDNA) com aproximadamente 135.000 a 140.000 pares de bases, com um peso molecular (PM) de 95-150 X 10⁶ Daltons (Da), a qual é infecciosa sob condições experimentais apropriadas (Butel, 1992; Fenner *et al.*, 1993a). Os vírions apresentam simetria cúbica (Andrewes *et al.*, 1978; Dulbecco e Ginsberg, 1980; Gustafson, 1981), e seu capsídeo é constituído por 160 capsômeros côncavos, com diâmetro em torno de 10 nm cada um (Gustafson, 1981; Fenner *et al.*, 1993 a). Entre o envelope e o capsídeo encontra-se uma camada denominada tegumento, a qual envolve um capsídeo icosaédrico característico, composto por 160 capsômeros ordenados e côncavos com 100 nm de diâmetro. Em secções, o capsídeo usualmente aparece como um anel denso dentro do envelope. No seu interior encontra-se o DNA, em formato de barra ou círculo (Fenner *et al.*, 1993a).

2.2.2. COMPOSIÇÃO QUÍMICA

Segundo Gustafson (1981), a análise química da composição dos herpesvírus requer um exame crítico do procedimento de preparação das amostras e da origem destas amostras.

O genoma do vírion dos herpesvírus é constituído de 70% de ácido nucléico (Dulbecco e Ginsberg, 1980) do tipo DNA de dupla cadeia (Andrewes *et al.*, 1978; Dulbecco e Ginsberg, 1980), sendo o conteúdo de guanina e citosina, variável entre os herpesvírus (Gustafson, 1981). Os vírions dos herpesvírus são compostos, ainda, de 22% de lipídeos, principalmente de fosfolipídios, 2% de carboidratos e pequenas quantidades de poliaminas (Dulbecco e Ginsberg, 1980). O restante do vírion (capsídeo e envelope) é composto de glicoproteínas e lipoproteínas (Dulbecco e Ginsberg, 1980; Gustafson, 1981).

2.2.3. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS

Os herpesvírus são sensíveis aos solventes lipídicos (Andrewes *et al.*, 1978; Dulbecco e Ginsberg, 1980, Porterfield, 1989) como éter, acetona, deoxicolato de sódio e clorofórmio, que os tornam não infecciosos. São também sensíveis ao álcool etílico, éter etílico e algumas enzimas proteolíticas (Gustafson, 1981).

Andrewes *et al.* (1978) relataram que os herpesvírus são relativamente termolábeis e sensíveis a extremos de pH. O BHV-1 é estável a uma faixa de pH entre 6.0-9.0, mas lábil a pH 4.5-5.0, são inativados por raios gama ou radiações ultravioletas (UV) (Gustafson, 1981). Além disso, os vírions são sensíveis a choques osmóticos devido a aquecimento ou congelamento (Porterfield, 1989).

2.2.4. PROTEÍNAS

Vários autores têm analisado as proteínas do BHV-1. O número de proteínas encontradas variou de 21 a 38 (Misra *et al.*, 1981; Metzler *et al.*, 1985; Metzler, Schudel e Engels, 1986; Wyler *et al.*, 1989), sendo 6 delas presentes no nucleocapsídeo e duas associadas ao DNA (Fenner *et al.*, 1993a). Atualmente, acredita-se que o número de proteínas, entre estruturais e não estruturais, fique ao redor de 70 (Fenner *et al.*, 1993a). Destas, 12 são glicoproteínas e estão localizadas no envelope (Misra *et al.*, 1981; Wyler *et al.*, 1989). Um destes peplômeros glicoprotéicos possui atividade de receptor para Fc e se liga a IgGs normais (Fenner *et al.*, 1993a).

As glicoproteínas desempenham funções vitais no processo de infecção viral, mediando os processos de reconhecimento e adsorção às células alvo, penetração do vírion, fusão e disseminação do vírus célula a célula em cultivos celulares (Roizman, 1996).

2.3. MULTIPLICAÇÃO VIRAL

O processo de infecção viral inicia quando glicoproteínas do envelope viral, as principais são a gC e a gB, reconhecem e ligam-se a receptores celulares específicos

de sulfato de heparina da membrana celular (Roizman, 1996; Babiuk *et al.*, 1996; Meyer *et al.*, 1998). A adsorção do vírus à superfície celular ativa um processo mediado por glicoproteínas virais, onde pelo menos 5 glicoproteínas (gB, gD, gH, gL e gK) estão envolvidas no processo de fusão e penetração viral, que culmina com a penetração do vírus na célula. A fusão resulta numa inserção parcial do envelope viral à membrana plasmática com formação de “dobras” na membrana (Wild *et al.*, 1998). Acredita-se que o transporte do nucleocapsídeo seja feito através da glicoproteína VP22, responsável pela reorganização do sistema de microtúbulos celulares até o centrômero, perto do núcleo (Wild *et al.*, 1998).

Os processos de transcrição e replicação do DNA viral ocorrem no núcleo das células infectadas, enquanto que a síntese protéica viral, dá-se no citoplasma (Roizman, 1996). A transcrição dos genes virais é regulada temporalmente, havendo três classes de RNA mensageiro (mRNA) denominadas: genes α ou “imediatamente precoces”, β ou “precoces” e γ ou “tardios”, que são transcritos pela RNA polimerase II celular (Fenner *et al.*, 1993 a; Roizman, 1996). Genes α e β codificam enzimas ou proteínas que complexam-se ao DNA viral, enquanto que a maioria dos genes γ codificam proteínas estruturais (Fenner *et al.*, 1993a).

Os genes α são os primeiros a serem transcritos. Participam deste processo proteínas do tegumento em interação com fatores de transcrição celular. As α -proteínas iniciam o processo de transcrição dos genes β (Roizman, 1996). Funcionalmente, as β -proteínas estão envolvidas na regulação da transcrição das α -proteínas (suprimindo-as) e das γ -proteínas (promovendo-as); estando envolvidas, assim (juntamente com as α -proteínas), no processo de replicação do genoma viral (Fenner *et al.*, 1993a). Nesta fase, o DNA viral pode ser encontrado na forma de círculos ou linear (Roizman, 1996).

O DNA viral sintetizado é processado e “empacotado” em capsídeos imaturos recém-formados (Roizman, 1996).

O processo de maturação do vírion envolve as etapas de formação do nucleocapsídeo e a associação do nucleocapsídeo com áreas da camada interna da membrana nuclear adquirindo assim, o envelope viral (Fenner *et al.*, 1993 a; Roizman, 1996). No citoplasma, vírions maduros acumulam-se dentro de vesículas, utilizando-se do Complexo de Golgi para serem exportados para o meio extracelular, ou ocorre a dispersão das partículas virais célula à célula (Roizman, 1996).

2.4. PATOGENIA

As principais portas de entrada do BHV-1 são as mucosas respiratória ou genital. A replicação primária do vírus ocorre nas células epiteliais, bem como em células da submucosa e tecido conjuntivo (Pastoret *et al.*, 1982), podendo permanecer nas secreções nasais e linfonodos do trato respiratório por mais de 9 dias (McKercher *et al.*, 1963). Após a infecção primária, ocorre uma viremia transitória, raramente detectada (Gibbs e Rweyemamu, 1977), que precede o aparecimento de anticorpos específicos no animal (Pastoret *et al.*, 1982). A partir das mucosas, o vírus é transportado por monócitos por via hematogena, a órgãos alvo incluindo sistema nervoso, trato digestivo ou feto (Wyler *et al.*, 1989). Paralelamente, as células de Langerhans mobilizam os antígenos virais da epiderme para os linfonodos periféricos, dando início à resposta do sistema imune frente à infecção (Sprecher e Becker, 1993).

Os herpesvírus são epiteliotrópicos, multiplicando-se inicialmente nas mucosas da região naso-oro-faríngea. A subsequente disseminação do BHV-5 para as terminações nervosas dos ramos maxilar e mandibular do nervo trigêmeo é a rota mais provável para a infecção do sistema nervoso central (Bagust & Clark, 1972), onde provocam o desenvolvimento de meningoencefalite (Bagust & Clark, 1972; Flores *et al.*, 1998). Wyler *et al.* (1989) descreveram a rota de propagação do BHV-5 por disseminação neural em que, após replicação na mucosa, o vírus penetra nas células nervosas. Os nucleocapsídeos virais são despidos e transportados pelo fluxo retrógrado do axônio para o núcleo do neurônio, estabelecendo-se em forma latente após a infecção aguda.

O crescimento dos herpesvírus causa distúrbios na arquitetura celular, com o aparecimento de inclusões intra-nucleares, marginação da cromatina e destruição dos nucléolos. Uma massa basofílica desenvolve-se centralmente no núcleo, e corresponde ao acúmulo de DNA recentemente sintetizado. Com o movimento das partículas virais do núcleo para o citoplasma, o corpúsculo originalmente basofílico torna-se eosinofílico. Assim, os corpúsculos de inclusão eosinofílicos encontrados em células infectadas, não contém partículas virais específicas mas são, na realidade, o remanescente de um sítio de produção viral extinto. Os vírus adquirem o envelope quando brota através da membrana nuclear, causando a morte celular (Fenner *et al.*, 1993a).

2.5. LATÊNCIA

O herpesvírus é capaz de estabelecer infecções latentes em gânglios nervosos, onde o DNA viral pode persistir na forma epissomal, isto é, não integrada ao genoma celular, nos núcleos das células nervosas. Assim, animais latentemente infectados servem de reservatório natural para o vírus durante toda a vida do animal (Devireddy e Jones, 1998). O DNA epissomal pode ser detectado em aproximadamente 1% dos neurônios ganglionares, com 20 a 100 cópias por célula (Osorio, 1998). Este estado pode durar anos, mantendo-se viável a replicação viral após o processo de reativação do vírus (Salvador, 1997). O vírus pode ser reativado por uma ampla variedade de estímulos imunodepressivos, tais como estresse, parto, variações bruscas de temperatura, transporte, vacinação, ou ainda tratamento sistemático com corticoesteróides, fatores responsáveis pela perpetuação e transmissão do vírus no rebanho (Roizman, 1996).

Os mecanismos de latência e reativação são característicos dos *Alphaherpesvirus* (Fenner et al., 1993a). Após a multiplicação no local da infecção, o vírus penetra pelos neurônios que enervam a região onde ocorreu a infecção primária, sendo provavelmente transportado pelo fluxo retrógrado do axônio, movendo-se ao longo dos nervos sensoriais em direção aos gânglios trigêmeo ou sacral (Narita et al., 1981).

Nos corpos neuronais, o vírus replica-se rapidamente causando a morte celular e em alguns neurônios a expressão dos genes α é suprimida. Posteriormente, a seqüência da expressão gênica é interrompida e o vírus estabelece infecção latente (Flores, 1996). Aproximadamente 50% dos gânglios da região afetada abrigam o DNA viral (Ackermann & Wyler, 1984).

Durante a latência, são produzidos 2 ou 3 transcritos associados à latência (LAT), porém não são produzidos antígenos virais. A produção desses transcritos parece não ser essencial para o estabelecimento ou manutenção da infecção latente (Fenner et al., 1993a). Entretanto, os LATs são importantes para melhorar a eficiência do ciclo latência- reativação (Osorio, 1998).

Todas as amostras de herpesvírus, inclusive amostras vacinais atenuadas, podem induzir latência (Wyler et al., 1989). Nenhuma vacina é capaz de prevenir o estabelecimento de latência após desafio com o vírus infeccioso. No entanto, algumas

vacinas podem auxiliar na redução tanto na incidência como na quantidade de vírus reexcretado na reativação (Rossi *et al.*, 1982).

É possível que uma forma sub-viral, provavelmente somente o DNA viral, seja replicado e passe intimamente do axônio para junções neuro-epidermais, produzindo então vírus infeccioso. Periodicamente, a produção de virions infecciosos seria reativada, sendo que estes se moveriam via nervo sensorial até as membranas da mucosa ou pele, onde ocorreria replicação nas células epiteliais e posterior excreção do vírus. É discutível se a reativação do vírus latente está associada com o desenvolvimento de lesões ou doença clínica, porém a reativação e reexcreção do vírus constitui o mecanismo pelo qual o vírus se mantém na população bovina. Para a manutenção do estado de latência, após a reativação, genomas virais retornam via axônio e se instalam novamente nos neurônios sensoriais (Fenner *et al.*, 1993a).

2.6. SINAIS CLÍNICOS E LESÕES

2.6.1. INFECCÃO PELO BHV-1

2.6.1.1. FORMA RESPIRATÓRIA E CONJUNTIVITE

O herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1) causa uma enfermidade denominada rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR).

A IBR é usualmente restrita ao trato respiratório superior, podendo ocasionalmente se estender aos brônquios e pulmões (Karhs, 1977).

A IBR pode apresentar-se de forma subclínica, leve ou severa, com cerca de 100% de morbidade podendo chegar, embora raramente, a cerca de 10% de mortalidade. Os sinais clínicos iniciais incluem depressão, inapetência, febre, descarga nasal, inicialmente serosa e posteriormente mucopurulenta devido à infecção secundária por bactérias. A mucosa nasal se torna hiperêmica e as lesões podem ser de difícil visualização, progredindo de pústulas locais a grandes áreas superficiais, hemorrágicas, que são cobertas por uma membrana diftérica. Pode haver dispnéia, respiração pela boca, salivação e um profundo ruído brônquico. Casos agudos podem

durar de 5 a 10 dias (Fenner et al., 1993a).

A conjuntivite, causada pelo BHV-1, geralmente acompanhada da forma respiratória, caracteriza-se por secreção ocular profusa, inicialmente serosa e posteriormente mucopurulenta, além de opacidade da córnea na região próxima à conjuntiva. Ocasionalmente observam-se na conjuntiva pústulas e placas de material necrótico. A evolução é de 5 a 10 dias (Riet-Correa et al., 1996).

A conjuntivite por BHV-1 pode ser confundida com queratoconjuntivite de origem bacteriana. No diagnóstico de conjuntivite associada à IBR, as opacidades são pequenas, manifestando-se geralmente na junção corneoescleral, em contraste com o observado na queratoconjuntivite causada por *Moraxella bovis*, onde a opacidade de córnea se origina do centro para a periferia (Kahrs, 1977).

Lesões erosivas do epitélio do trato respiratório superior de animais infectados com o vírus, histologicamente mostram necrose focal do epitélio, intensa infiltração de neutrófilos e ocasionais inclusões intranucleares nas células epiteliais da periferia (Higgins e Edwards, 1986).

2.6.1.2. FORMA REPRODUTIVA

A forma genital da infecção pelo herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1) manifesta-se nas fêmeas por vulvovaginite pustular infecciosa (IPV). A IPV desenvolve-se de 1 a 3 dias após a monta e é dolorida (Gibbs & Rweyemamu, 1977). Os primeiros sinais são micção freqüente, com elevação e movimentação da cauda (Gibbs & Rweyemamu, 1977; Mohanty & Dutta, 1981), para evitar o contato com a vulva edematosa e hiperêmica e com pequenas pústulas distribuídas na superfície da mucosa (Fenner et al., 1993a). As pústulas possuem cerca de 1 a 2 mm de diâmetro, e podem formar placas fibrinosas amareladas, que irão se desprender e formar escaras (Wyler et al., 1989). As lesões cicatrizam-se em torno de 10 a 14 dias (Gibbs & Rweyemamu, 1977).

Segundo Miller (1991) e Lovato et al. (1995b), o sêmen contaminado, quando introduzido no útero, causa endometrite necrosante que pode produzir infertilidade temporária. O vírus também causa severa lesão necrosante nos ovários, principalmente se a infecção ocorre na época da ovulação. O desenvolvimento do corpo lúteo pode ser prejudicado, interrompendo os ciclos estrais subseqüentes, que voltam ao normal

em torno de 2 meses após a infecção. Este processo tem uma evolução de 4 a 7 dias (Riet-Correa *et al.*, 1996).

Nos machos, a balanopostite pustular infecciosa (IPB) ocorre de forma clínica ou subclínica (Fenner *et al.*, 1993a, Van Oirschot, 1995). Após um período de incubação de 1 a 3 dias, a mucosa do pênis e prepúcio tornam-se hiperêmicas. Surgem pontos escuros-avermelhados que tendem a formar nódulos, vesículas e pústulas. Estas lesões podem coalescer formando placas, úlceras e infecções bacterianas secundárias, resultando em uma descarga prepucial purulenta. A IPB pode ser acompanhada por febre, depressão e perda de apetite (Van Oirschot, 1995).

Partículas virais presentes nas lesões da IPB podem passar ao sêmen, o qual se constitui um importante meio de transmissão, liberando grandes quantidades do vírus (Weiblen *et al.*, 1992b). Sêmen de animais com IPB possuem redução da mobilidade e anormalidades morfológicas dos espermatozoides (Van Oirschot, 1995). A infecção do pênis muitas vezes leva à aderência peniana (Weiblen *et al.*, 1991).

O aborto é uma possível seqüela de qualquer uma das formas da enfermidade por BHV-1, inclusive de infecções subclínicas (Weiblen, 1992a). Geralmente, a taxa de aborto não supera 25% (Kahrs, 1977; Weiblen, 1992a). Após a infecção, os abortos podem ocorrer em qualquer período da gestação, variando de 8 dias à meses (Kahrs, 1977), embora sejam mais freqüentes no terço final da gestação (Miller, 1991; Weiblen, 1992a).

Em rebanhos soronegativos, altos índices de abortos são reportados. As vacas prenhes podem apresentar sinais clínicos de conjuntivite, rinotraqueíte ou vulvovaginite, ou não manifestar sinais clínicos. Os fetos podem ser expelidos durante a ocorrência de surtos das outras formas da doença ou até 100 dias depois do surto (Kahrs, 1977). O aborto freqüentemente é seguido por retenção de placenta. Os animais podem nascer mortos ou morrerem poucos dias após o nascimento.

Dependendo do período de gestação, as infecções por BHV-1 podem determinar quadros de endometrite, ooforite, mortalidade embrionária com retorno ao cio, mortalidade fetal com aborto, mumificação (raro), natimorto, nascimento de animais fracos e mortalidade neonatal (Alfieri, 1999).

Microscopicamente, observa-se necrose focal e ocasionalmente corpúsculos de inclusão intranucleares no fígado, rins e glândulas adrenais. O vírus pode ser isolado da placenta, líquidos e órgãos fetais (Riet-Correa *et al.*, 1996).

Endometrite, baixa taxa de concepção e estros curtos podem ocorrer após inseminação artificial com sêmen infectado (Parsonson e Snowdon, 1975).

2.6.1.3. FORMA SISTÊMICA NEONATAL

Esta forma da doença manifesta-se em terneiros recém-nascidos, infectados no útero no final da gestação, durante o parto ou em seguida ao nascimento, sendo invariavelmente fatal (Kahrs, 1977). Os animais infectados desenvolvem lesões necróticas no sistema digestivo, principalmente no fígado e também linfonodos. Frequentemente há comprometimento do trato respiratório, com sinais clínicos e lesões típicas da forma respiratória (Gibbs & Rweyemamu, 1977).

2.6.2. INFECCÃO PELO BHV-5

Os animais afetados são usualmente terneiros, com idade entre 5 e 7 meses. Os principais sinais clínicos são anorexia, isolamento do rebanho, corrimento nasal e ocular, salivação excessiva, depressão profunda, nistagmo, opistótono, tremores, marcha em círculos, andar cambaleante, cegueira, paralisia da língua, bruxismo e decúbito com movimento de pedalagem (Hill *et al.*, 1984; Salvador *et al.*, 1998).

A letalidade é próxima dos 100%, de acordo com Carrillo *et al.* (1983), embora outros autores relatem taxas mais baixas (Riet-Correa *et al.*, 1989). A duração do quadro clínico pode variar de 1 a 15 dias, com evolução média de 6 dias (Johnston e McGavin, 1962; Salvador *et al.*, 1998). Riet-Correa *et al.* (1996) relataram animais que sobreviveram até 7 dias após o início dos sinais clínicos.

Formas nervosas associadas com comprometimento do sistema digestivo e/ou respiratório foram relatados (Barenfus *et al.*, 1963; Riet-Correa *et al.*, 1989). Embora o vírus não seja primariamente associado à enfermidade respiratória, a inoculação experimental com BHV-5 pode causar sinais clínicos respiratórios leves e transitórios (Hall *et al.*, 1966; Belknap *et al.*, 1994).

Na necrópsia, com frequência, não são evidenciadas lesões significativas (Salvador *et al.*, 1998). Quando ocorrem, o córtex cerebral pode apresentar áreas de coloração amarelada ou acinzentada. Ocasionalmente, essas áreas apresentam-se

deprimidas podendo observar-se cavitação da substância cinzenta (Riet-Correa e Schild, 1995; Salvador *et al.*, 1998). No encéfalo, as principais alterações macroscópicas descritas são achatamento de circunvoluções, congestão, hemorragia, áreas de malácia corticais e protrusão cerebelar pelo foramen magno (Riet-Correa *et al.*, 1989; Weiblen *et al.*, 1989; Salvador *et al.*, 1998).

A infecção do sistema nervoso central (SNC) pelo BHV-5 se caracteriza histologicamente pelo desenvolvimento de meningoencefalite não supurativa com necrose do córtex cerebral (Hall *et al.*, 1966; Riet-Correa *et al.*, 1989; Riet-Correa *et al.*, 1996, Salvador *et al.*, 1998; Elias *et al.*, 2004). Corpúsculos de inclusão intranucleares podem ser encontrados em astrócitos e neurônios (Johnston *et al.*, 1962, Gardiner & Nairn, 1964, Weiblen *et al.*, 1989, Riet-Correa *et al.*, 1989, D'Offay *et al.*, 1993, Salvador *et al.*, 1998, Elias *et al.*, 2004).

De modo geral, é descrita a presença de manguitos perivasculares com variado número de camadas de células mononucleares nas meninges e em diversas áreas do SNC, gliose focal ou difusa, edema perivascular e perineuronal (Johnston *et al.*, 1962, Riet-Correa *et al.*, 1989, Riet-Correa e Schild, 1995). Segundo Gardiner e Nairn (1964), Riet Correa *et al.* (1989), as lesões inflamatórias podem variar de moderadas a acentuadas e são mais evidentes no córtex cerebral. Na cápsula interna, tálamos e tubérculos quadrigêmeos, estas lesões são menos evidentes e no cerebelo, ponte e medula oblonga, as alterações são discretas.

2.7. IMUNOLOGIA

As discussões sobre o papel da imunidade humoral e imunidade mediada por células nas infecções por herpesvírus têm sido relatadas desde a década de 70 (Gibbs & Rweyemamu, 1977). A imunidade mediada por células é efetivamente de maior importância para o desenvolvimento de uma resposta protetora precoce ao BHV-1 e ao BHV-5 (Feldens, 2000). Fenner *et al.* (1993a), relataram que são três os principais mecanismos de resposta às infecções virais: destruição de células infectadas, produção de interferons e neutralização da infectividade da progênie de vírus produzida durante o processo infeccioso.

O principal mecanismo de imunidade específica contra infecções virais estabelecidas é desempenhado por linfócitos T citotóxicos (LTC) que apresentam marcadores CD8+. Os LTC CD8+ reconhecem antígenos virais processados no interior das células em associação com moléculas do complexo de histocompatibilidade principal classe I (MHC-I), presentes em todos os tipos de células nucleadas. Os LTC induzem a lise das células infectadas pelo vírus, estimulando enzimas intracelulares que degradam o genoma viral, bem como a secreção de citocinas com atividade de interferon (IFN) (Abbas *et al.*, 1994). O mecanismo citotóxico dos LTC é desencadeado pelo contato do complexo receptor de células T (RCT) desta célula com o MHC da célula alvo. Este reconhecimento leva a emissão de sinais transmembrana que ativam uma variedade de funções da célula T. Ocorre a adesão entre as 2 células, com a degranulação do LTC, sendo a perforina liberada no meio extracelular. Na presença de íons Ca^{++} , a perforina sofre polimerização e se insere na membrana plasmática da célula alvo, causando um desequilíbrio hidroeletrolítico que leva à lise celular.

Outro mecanismo de lise por LTC envolve a fragmentação do DNA, mediada por endonucleases, levando à apoptose (Scroferneker *et al.*, 1996).

O mais potente sinal natural para a produção de IFN são as secreções virais. A infecção viral estimula diretamente a produção de IFN α pelas células infectadas, sendo o mais potente sinal para a síntese de citocinas. O IFN α possui três atividades principais: induzir as células adjacentes a um estado antiviral pela resistência à infecção viral e inibição da replicação viral, ativar o potencial lítico das células “Natural Killer” (NK) e aumentar a expressão de moléculas da classe I do MHC nas células infectadas por vírus (Abbas *et al.*, 1994).

Na imunidade humoral, a resposta primária é caracterizada pela formação de anticorpos das classes IgM e IgG, que são detectados aos 7 ou 8 dias após a infecção. A subclasse de IgG predominante é a IgG1, sendo que anticorpos IgG2 são também formados em baixa concentração. Na resposta secundária, em animais com sinais clínicos de rinotraqueíte, são identificados somente anticorpos da classe IgG. Animais onde se induz aborto, apresentam também uma elevação de IgM (Feldens, 2000).

Em secreções nasais e genitais, foi detectada atividade neutralizante localmente com o surgimento de anticorpos de duas subclasses: IgA secretora (IgAs) e IgG. A atividade da IgA parece estar restrita à parte superior do trato respiratório (Wyler *et al.*, 1989) e a IgG predomina na traquéia e pulmões (Wilkie, 1982).

A produção de anticorpos neutralizantes contra o BHV-1 pode ser detectada entre 8 a 12 dias pós infecção, podendo persistir por até 5 anos (Guy e Potgieter, 1985). Kahrs (1977) relatou que os anticorpos adquiridos pelo colostro podem ser medidos nos soros de terneiros de até 1 mês de vida, pois seus níveis diminuem rapidamente devido à rápida degradação metabólica. Entretanto, a persistência desta imunidade varia de terneiro para terneiro, e em alguns casos os anticorpos passivos foram detectados até os 4 a 6 meses de idade (Gibbs e Rweyemamu, 1977).

2.8. EPIDEMIOLOGIA DO BHV-1

Bovinos de todas as idades são suscetíveis em infecções experimentais (Blood *et al.*, 1979) mas, em condições naturais, os animais jovens são mais suscetíveis (Kahrs, 1977; Schudel *et al.*, 1986). A doença geralmente ocorre em bovinos jovens, preferencialmente confinados, nas estações de outono e inverno (Gustafson, 1981; Schudel *et al.*, 1986). Embora animais com idade superior a 6 meses sejam mais comumente afetados, pois refletem a idade em que ocorre maior estresse em função da movimentação de animais (Gustafson, 1981), quando acometidos antes dos 6 meses, desenvolvem doença mais severa (Kahrs, 1977). Surtos da doença podem aparecer quando animais portadores são colocados em rebanhos suscetíveis (Gibbs e Rweyemamu, 1977; Gustafson, 1981; Blood *et al.*, 1979). Não existem diferenças de suscetibilidade ao vírus de IBR/IPV, no que se refere a sexo e raça, mas provavelmente há quanto ao tamanho da exploração e tipo de manejo aos quais os animais são submetidos (Kahrs, 1977).

Segundo Kahrs (1977), o período de incubação varia de 2 a 6 dias, enquanto relatos de Gustafson (1981) salientam o aparecimento da doença de 10 dias a várias semanas após animais de diferentes origens haverem sido transportados juntos.

A doença, em sua forma venérea, é regularmente transmitida durante o coito ou inseminação artificial. Desta forma pode persistir por longos períodos em rebanhos servidos por touros ou sêmen infectados (Gustafson, 1981). Na Europa, a difusão da forma genital tem sido associada com o uso de inseminação artificial, tendo em vista o isolamento do vírus no sêmen (Gustafson, 1981; Majewska *et al.*, 1980).

Devido à evidência de maior concentração do vírus no trato respiratório, o exsudato nasal e perdigotos eliminados pela tosse devem ser considerados a principal

fonte de infecção (Blood *et al.*, 1979), além de secreções oculares e genital (Kahrs, 1977). A infecção se perpetua na população bovina pelo contato direto entre animais infectados e suscetíveis e por infecções subclínicas e infecções latentes que ocasionalmente são reativadas, acompanhadas de eliminação de vírus (Kahrs, 1977). Após infecção natural ou uso de vacina atenuada, o vírus pode permanecer de forma latente indefinidamente (Blood *et al.*, 1979).

Animais de todas as idades podem apresentar títulos de anticorpos contra BHV-1, mas alguns autores têm comprovado através de inquéritos sorológicos que animais adultos, geralmente com mais de 20 meses de idade, apresentam-se soropositivos com maior frequência (Jessett & Rampton, 1975; Mintzel *et al.*, 1986; Durham e Hassard, 1991).

2.9. EPIDEMIOLOGIA DO BHV-5

O BHV-5 afeta bovinos, os quais figuram como a principal fonte de infecção e disseminação da doença nos rebanhos. A disseminação da doença através de outras espécies (ovinos, caprinos) ou do próprio homem, ou ainda através do ar, é possível, embora não apresentem importância epidemiológica significativa (Salvador, 1997). A disseminação viral ocorre principalmente por aerossóis e secreções corpóreas, conforme Weiblen (1996a), embora outros autores afirmem que apenas o contato íntimo entre mucosas tenha importância epidemiológica (Salvador, 1997).

A manutenção do vírus no rebanho depende da efetividade dos mecanismos de transmissão e, principalmente, da presença de hospedeiros suscetíveis. Animais *in utero* ou recém-nascidos podem infectar-se, embora filhos de vacas imunizadas sejam considerados suscetíveis a partir de 10 semanas de idade (Hill *et al.*, 1984). Inicialmente, todos os animais que não tiveram contato com o herpesvírus são suscetíveis. Num rebanho endêmico, a faixa etária mais afetada é de animais de até 6 meses de idade, período no qual ocorre a perda da imunidade colostrar. Porém, animais de qualquer idade, introduzidos no rebanho, também são suscetíveis (George, 1991; Smith, 1996). Nestes rebanhos endêmicos, o vírus pode estabelecer uma infecção inaparente, caracterizada pela sua latência nos gânglios trigêmeos. Condições de estresse podem reativar o ciclo de replicação viral, fazendo com que o animal volte

a ser capaz de excretá-lo. Desta maneira, surtos esporádicos da doença comumente ocorrem em rebanhos endêmicos (Salvador, 1997).

Estudos sobre suscetibilidade racial não foram encontrados. As condições de criação parecem influenciar, uma vez que em rebanhos de criação intensiva e onde aglomeram-se animais de diferentes origens, surtos da doença são mais comuns (George, 1991).

São reportadas taxas entre 15 e 50% de morbidade, com índices de letalidade próximos de 100% (Johnston *et al.*, 1962; Gardiner & Nairn, 1964; Carrillo *et al.*, 1983; Hill *et al.*, 1984).

A forma sistêmica do herpesvírus acomete principalmente animais de 1 a 6 semanas de idade, em regime de confinamento e onde aglomeram-se animais de diferentes origens (Reed *et al.*, 1973).

2.10. SITUAÇÃO NO MUNDO

2.10.1. BHV-1

O BHV-1 apresenta distribuição mundial (Kahrs, 1977; Gustafson, 1981; Porterfield, 1989, Weiblen *et al.*, 1992b) sendo reconhecido como responsável por severas perdas econômicas em rebanhos de corte e de leite (Smith *et al.*, 1995, Van Oirschot, 1998).

Na América do Sul, estudos sobre prevalência de BHV-1, têm revelado uma distribuição variada do agente (13-68%) empregando-se diferentes métodos sorológicos (Roehe *et al.*, 1998).

Na Argentina, em estudos soroepidemiológicos realizados em várias regiões do país, determinou-se que 100% das propriedades possuíam animais soropositivos, com prevalência entre 32,3% e 56,7% (Odeon, 1998). Galarza & Periolo (1983) realizaram na província de Formosa, inquérito sorológico para BHV-1 em 2.140 amostras, revelando pela imunofluorescência indireta prevalência de 48,13%. Fort *et al.* (1996), na província de La Pampa, utilizando a técnica de ELISA estudaram a prevalência de BHV-1 em animais menores de 1 ano, de 1 a 2 anos e maiores de 2 anos, encontrando respectivamente em 1.930 amostras, 17%, 30% e 68% positivas. As

prevalências por categoria foram de 15%, 35% e 75% utilizando o mesmo número de amostras.

No Chile, Hochstein-Mintzel *et al.* (1986), analisaram 21 rebanhos bovinos pela técnica de soroneutralização, encontrando 47,2% (714/1512) de amostras positivas ao BHV-1. Riedemann *et al.* (1996) examinaram 2.864 amostras pela mesma técnica, encontrando prevalência de 41,0%.

No Peru, Andrade *et al.* (1967) estudaram a prevalência de BHV-1 em várias regiões, através da técnica de soroneutralização, detectando 4,39% (35) de amostras reagentes de um total de 797 amostras. Fondevila *et al.* (1981) pesquisaram em 2.380 amostras de soro sanguíneo provenientes de 119 rebanhos de diversas regiões, anticorpos contra BHV-1 através da técnica de soroneutralização. Foi observado que em todos os rebanhos haviam animais infectados, com prevalência de 43,3% para animais com idade inferior a 2 anos e de 54,3% para animais com idade superior a 2 anos.

Na Colômbia, os levantamentos sorológicos do BHV-1 em bovinos revelam uma distribuição variável segundo a região do país, com valores de 13% a 16,6% (Zuñiga *et al.*, 1978) e 50% (Griffith *et al.*, 1982).

Na América do Norte, as infecções pelo BHV-1 são freqüentes e muito prevalentes. A forma predominante da doença envolve o trato respiratório e infecções uterinas, enquanto que as formas genitais, comumente descritas na Europa, são raras na América do Norte. As formas encefálicas, geralmente vistas na América do Sul, são esporádicas na América do Norte e Europa (Osorio, 1998).

Em países da Comunidade Européia, as infecções pelo BHV-1 apresentam prevalência variada. Em alguns países está em processo de erradicação, enquanto outros apresentam prevalências entre 20 e 90% (Van Oirschot *et al.*, 1996). Áustria, Dinamarca, Finlândia, Noruega, Suécia e Suíça são países considerados livres de BHV-1 (Van Oirschot, 1998)

Na Holanda e Bélgica, 60-90% dos rebanhos parecem conter ao menos alguns bovinos infectados. Na Holanda aproximadamente 50% dos bovinos adultos são soropositivos ao BHV-1 (Van Oirschot, 1998). Já Van Wuijckhuise *et al.* (1998), na Holanda, testou amostras de leite para a presença de anticorpos contra BHV-1 pela técnica de ELISA, onde encontrou 84% dos rebanhos positivos para BHV-1.

O grau de infecção em muitos outros países Europeus é baixo. Na França somente 20% dos rebanhos parecem estar infectados; na Alemanha isto já variou entre

30-50%, e na Inglaterra estima-se que 50% dos rebanhos estejam infectados (Van Oirschot, 1998).

No período de 1979 a 1990 foram realizados testes sorológicos em 2 laboratórios na Itália para evidenciar anticorpos contra o BHV-1 nas amostras de soro de 25.129 animais. Essas amostras foram coletadas de animais pertencentes a 1.345 propriedades do país que apresentavam a infertilidade como um problema endêmico. Foram detectados anticorpos em 65% das propriedades e 49% dos animais em cada ano estudado, por meio da técnica de soroneutralização (Cavirani *et al.*, 1992).

2.10.2. BHV-5

A real prevalência do BHV-5 ainda não está esclarecida no mundo (Van Oirschot, 1998, Osorio, 1998). Inúmeros surtos de meningoencefalite têm sido reportados em países do Hemisfério Sul, associados à ocorrência de BHV-5 (Studdert, 1989, Heinlein *et al.*, 1993, Salvador *et al.*, 1998).

Em países do Hemisfério Norte, a baixa prevalência de encefalites parece estar relacionada aos programas de vacinação contra BHV-1. Assim, devido às reações de proteção cruzada entre BHV-1 e BHV-5, a prevalência de BHV-5 pode estar sendo mascarada por estratégias para o controle de BHV-1 (Belknap *et al.*, 1994, Cascio *et al.*, 1999).

2.11. SITUAÇÃO NO BRASIL

2.11.1. BHV-1

O primeiro isolamento no Brasil foi realizado por Alice (1978), no Estado da Bahia, a partir de pústulas de vaginas de vacas. No mesmo ano, Muller *et al.* (1978), no Estado de São Paulo, isolaram e identificaram o BHV-1 a partir de rim de feto bovino colhido em matadouro. Em 1979, no mesmo Estado, Muller *et al.* (1979) isolaram o vírus a partir de swabes vaginais, pústulas nasais e fígado, de material proveniente de um surto da doença. Galvão (1985) isolou o BHV-1 de 51% das 162 amostras proveniente de 315 animais de Minas Gerais, utilizando muco cérvico-

vaginal, raspados vaginais e prepuciais. Nogueira *et al.* (1986) diagnosticou um surto de IBR/IPV no Rio de Janeiro, com isolamento do vírus a partir de um surto de doença respiratória e reprodutiva em 22 vacas leiteiras.

Na Bahia, Galvão *et al.* (1963) efetuaram o primeiro levantamento sorológico, detectando 34,49% de 458 amostras positivas à soroneutralização. Ribeiro *et al.* (1982) verificaram pelo mesmo método, que 74% de 2.057 amostras de soro bovino foram reagentes.

No Estado de São Paulo, Muller *et al.* (1981) avaliaram 384 amostras de soro sanguíneo de bovinos, através das reações de soroneutralização em tubo, demonstrando prevalência de 42,18%. Apesar de não haver uma distribuição uniforme e da pequena amostragem utilizada, concluiu que o vírus está presente no rebanho paulista.

No Paraná, município de Palotina, Barros Filho *et al.* (1997), avaliaram a ocorrência de bovinos soropositivos ao BHV-1, encontrando 27,1% (65) de animais reagentes à soroneutralização de um total de 240 animais e 66,7% (16) das 24 propriedades com animais infectados.

Dados da Seção de Febre Aftosa, do Instituto Biológico de São Paulo, referentes ao período de 1988 a 1997, demonstraram 37% (11.162) de amostras soropositivas de um total de 30.151 amostras, provenientes de rebanhos com problemas reprodutivos dos Estados de Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Distrito Federal, Alagoas e Ceará (Del Fava e Pituco, 1998).

Alguns autores realizaram avaliação sorológica em touros de centrais de inseminação artificial no Brasil, demonstrando elevada prevalência de soropositivos ao BHV-1. Pituco (1988), em centrais de inseminação de São Paulo, Minas Gerais e Rio Grande do Sul, verificou 72,5% (95) de animais soropositivos de um total de 131 animais, pela técnica de soroneutralização. Rocha *et al.* (1994), em uma central de inseminação artificial, utilizando a mesma técnica, encontraram 63,15% (36) de amostras positivas de um total de 57 amostras. A Seção de Febre Aftosa, do Instituto Biológico de São Paulo (1988) diagnosticou, no período de janeiro de 1997 a fevereiro de 1998, 517 soros de touros, sendo 59,9% (310) de amostras positivas (Del Fava e Pituco, 1998).

Em um levantamento sorológico realizado no período de 1988 a 1992, Pituco *et al.* (1993) utilizando a técnica de soroneutralização, evidenciaram diferentes percentagens de positivos em vários Estados brasileiros. Os resultados demonstram que, no período estudado, em São Paulo, 1.296 de 2.967 (43,6%) apresentaram anticorpos contra BHV-1; no Paraná 96 de 489 (19,7%); em Minas Gerais 113 de 210 (53,8%); no Rio Grande do Sul 66 de 94 (70,2%); no Mato Grosso do Sul 38 de 71 (53,5%); no Rio de Janeiro 31 de 49 (63,2%); na Bahia 17 de 20 (85%) e em Santa Catarina 0 de 10 (0%). Este levantamento permitiu conhecer-se a real ocorrência desta enfermidade nas diferentes regiões do país.

No Rio Grande do Sul, o vírus foi isolado pela primeira vez em 1990 a partir de suabe prepucial e do sêmen de touros de uma central de inseminação artificial, os quais apresentavam hiperemia, pequenas erupções e exsudato mucopurulento na mucosa peniana (Weiblen *et al.*, 1991). Embora não haja uma explicação definitiva da forma como ocorreu a transmissão deste vírus, os sinais clínicos foram observados aproximadamente 30 dias após a introdução de novos touros na estação (Weiblen *et al.*, 1991). Têm sido diagnosticados no Estado surtos de IBR (Riet-Correa *et al.*, 1989), balanopostite (Weiblen *et al.*, 1991; 1992b) e vulvovaginite pustular infecciosa (Canabarro *et al.*, 1993).

Em fevereiro de 1993, no município de Pinhal Grande, no Rio Grande do Sul (RS), foi descrito um surto de uma enfermidade caracterizada por lesões vulvares, repetição de cio e infertilidade. Suabes vaginais de 20 animais afetados foram coletados em 5 propriedades da região e processados em laboratório, sendo isolado o BHV-1 de 4 amostras. A provável causa da introdução do BHV-1 na propriedade foi a utilização de um touro durante a estação de monta, motivada pela ausência do serviço de inseminação artificial naquele período (Lovato *et al.*, 1995a).

No ano de 1996 o BHV-1 foi novamente isolado de animais apresentando sinais clínicos de IBR. Este caso ocorreu no município de São Borja, onde 30 novilhas de um mesmo rebanho apresentaram descarga nasal e dificuldade respiratória. Foram coletados suabes de 8 animais e o vírus foi isolado de uma amostra (Lovato, 1998).

A frequência de anticorpos contra o BHV-1 no RS indica que o vírus está bastante difundido (Ravazzolo *et al.*, 1989; Lovato *et al.*, 1995a). Wizigmann *et al.* (1972), analisando amostras de soro sanguíneo de 229 bovinos de 11 municípios, encontraram frequência de 33% reagentes à soroneutralização para o BHV-1.

Ravazzolo *et al.* (1989), demonstraram a evidência do BHV-1 em 19 municípios do Rio Grande do Sul, através de um estudo onde foram examinadas 526 amostras de soro bovino através da técnica de soroneutralização em microplaca. No referido estudo, foram detectados 81,75% de animais sorologicamente positivos, o que sugere uma ampla distribuição da doença no Estado.

Estima-se que cerca de 10% da população bovina do Rio Grande do Sul, ou seja, aproximadamente 1.2 milhões de cabeças, já teve contato com o BHV-1 (Rosa *et al.*, 1992).

De Stefano *et al.* (1993) utilizando amostras de soro do município de Ibirubá (RS), obteve 17,2% de amostras positivas de um total de 448 amostras testadas. As amostras foram coletadas em 16 propriedades da região e para determinação dos títulos de anticorpos contra o BHV-1 foi utilizada a prova de soroneutralização.

Quincozes *et al.* (2003), fizeram um levantamento de 2.314 amostras de soro bovino, no período de janeiro de 1987 a setembro de 2003, visando detectar anticorpos contra o BHV. Os rebanhos pertenciam a 132 propriedades de 17 municípios do sul do RS, e apresentavam distúrbios reprodutivos. Os anticorpos foram testados pelo teste de soroneutralização, em células Madin Darby Bovine Kidney (MDBK), frente a 100 doses infectantes (DI) 50% da amostra de vírus padrão Los Angeles. Foram detectados 34,6% (800) de amostras positivas ao BHV, com 77,2% (102) propriedades diagnosticadas positivas ao BHV.

Embora os casos clínicos descritos no Rio Grande do Sul estejam relacionados com a encefalite, é possível que as outras formas também apresentem incidência elevada, porém a sintomatologia mais branda possivelmente dificulte a identificação dos surtos (Riet-Correa *et al.*, 1996).

Sorologia realizada em 7.956 animais do rebanho bovino leiteiro do Estado do Rio Grande do Sul demonstrou uma prevalência de 18,8% de amostras positivas ao BHV-1, 54,5% (371) das 684 propriedades com animais infectados e 91,9% (91) dos 99 municípios com pelo menos um animal positivo. (Lovato *et al.*, 1995a). As amostras de soro utilizadas no inquérito sorológico citado acima foram coletadas em 99 municípios das 9 bacias leiteiras do Estado do Rio Grande do Sul no período de 1990 a 1993. Esta prevalência foi considerada baixa, quando comparada a outros trabalhos realizados no país. Vidor *et al.* (1995) relataram a presença de anticorpos neutralizantes para o BHV-1 em 31,9% (747) de um total de 2.341 soros examinados, provenientes de rebanhos de gado de corte com história de doença reprodutiva. Krahl

et al. (1997), utilizando a técnica de soroneutralização, encontraram 29,3% (534) de animais positivos, de um total de 1.823 animais e 61,5% das 265 propriedades examinadas com, pelo menos, um animal positivo ao BHV-1. Entretanto, a conclusão final desses trabalhos é a mesma: de que o BHV-1 encontra-se disseminado no rebanho bovino de vários Estados brasileiros.

2.11.2. BHV-5

O diagnóstico de surto de encefalite por BHV-5 tem sido descrito no Estado do Rio Grande do Sul (Riet-Correa et al. 1996).

Weiblen et al. (1989) descreveram um caso de encefalite em 1 terneiro com menos de 1 mês de idade, no qual o diagnóstico baseou-se nas lesões histológicas e no isolamento viral. Em outro caso, em um bezerro de 3 meses de idade, o diagnóstico baseou-se nos achados histológicos e sintomatologia características.

Riet-Correa et al. (1989) relataram 2 surtos da doença. No primeiro surto, ocorrido no município de Rio Grande, em um rebanho de 40 bezerros de aproximadamente 1 mês de idade, 12 apresentaram sinais clínicos, 9 morreram e 3 sobreviveram. Dos 3 sobreviventes, 2 ficaram com sinais clínicos crônicos evidenciada por impossibilidade de mamar, sendo alimentados artificialmente. O segundo relato consistiu de um caso esporádico da doença, onde apenas um animal, de 12 dias de idade, adoeceu e morreu em 3 dias. Nestes relatos a encefalite foi associada à forma sistêmica do herpesvírus em animais jovens. Vasconcelos et al. (1993) relataram um caso esporádico em um bovino, fêmea, 2,5 anos de idade, com 6 dias de evolução. O diagnóstico baseou-se na histopatologia e a presença do vírus foi constatada por microscopia eletrônica.

Em 1993, no município de Capão do Leão, foi diagnosticado um surto de BHV-5. Em um lote de 237 novilhos, de aproximadamente 1,5 anos de idade, 5 animais morreram espontaneamente, 3 foram sacrificados e necropsiados e 3 foram abatidos. O surto ocorreu 30 dias após a data na qual os animais tinham sido transportados do município de Santa Vitória do Palmar para o município de Capão do Leão. Os autores sugerem que o estresse pode ter atuado como fator de reativação de uma infecção latente pelo BHV-5 (Schild et al., 1994).

No ano de 1994, foi diagnosticado um surto de encefalite por BHV-5 em uma propriedade no município de Santa Vitória do Palmar. De um grupo de 406 bezerros de 7 e 8 meses de idade, recém desmamados, 27 adoeceram e 21 morreram. Foi realizado diagnóstico histológico e isolamento viral em cultivo celular. Os autores sugerem que o surto ocorreu em consequência do estresse do desmame (Riet-Correa e Schild, 1995). O BHV-5 foi também isolado de um surto de meningoencefalite, envolvendo 8 animais de 2 meses de idade, no município de São Martinho da Serra, RS, em 1993 (Weiblen *et al.*, 1996b).

Recentemente, a enfermidade tem sido detectada com frequência acentuada no Estado do Mato Grosso do Sul, afetando animais numa ampla faixa etária entre 6 e 60 meses (Salvador *et al.*, 1998).

A prevalência de infecções causadas pelo BHV-5 ainda é desconhecida, essencialmente porque ainda não existem testes capazes de diferenciar com praticidade as infecções por BHV -5 daquelas causadas pelo BHV -1 (Roche *et al.*, 1998). Por essa razão, grande parte dos animais identificados como positivos para o BHV-1 podem, na realidade, ser soropositivos para BHV-5.

2.12. DIAGNÓSTICO

O diagnóstico virológico de infecções por BHV-1 e BHV-5 é realizado através da identificação de antígenos virais sobre secreções ou tecidos de animais infectados, do isolamento do vírus em cultivos celulares ou, ainda, através de métodos moleculares de diagnóstico (Roche *et al.*, 1997b).

O isolamento viral é a técnica padrão para a detecção de BHV-1 e BHV-5 (Roche *et al.*, 1997b). Para sua execução, suspensões de tecidos ou secreções são colocadas sobre cultivos de células, os quais podem ser cultivos primários ou linhagens celulares contínuas. Após um período de incubação variável (1 à 5 dias), a presença de vírus é detectada pelo efeito citopático (ECP) característico (arredondamento celular, vacuolização, agrupamento das células e desprendimento do tapete celular) causado no cultivo celular (Weiblen *et al.*, 1992b). Neste momento, o isolamento viral pode ser confirmado. No isolamento viral em cultivo celular não é possível a caracterização do herpesvírus como tipo 5, uma vez que a metodologia empregada é a mesma para o isolamento do BHV-1 (Roche, 1996). O diagnóstico,

buscando a identificação dos herpesvírus, pode ser obtido através das provas de imunofluorescência direta (ID) ou imunoperoxidase (IPX). Estes testes dependem essencialmente do tipo de anticorpos empregados para a detecção do antígeno. Se realizados com soros policlonais, provavelmente serão incapazes de diferenciar entre amostras de BHV-1 e BHV-5. Entretanto, se realizados com anticorpos monoclonais tipo-específicos, poderão ser capazes de diferenciar estes vírus (Roehe *et al.*, 1997a). O vírus é excretado nas secreções nasais de 10 a 11 dias após a infecção, período correspondente ao tempo de incubação e início dos sinais clínicos da doença (Bagust & Clark, 1972).

Com relação à sorologia para a detecção de anticorpos contra o BHV-5, os testes empregados são os mesmos para BHV-1 (Riet-Correa *et al.*, 1996). As técnicas mais utilizadas incluem a soroneutralização e o ensaio imuno-enzimático (ELISA). Outras técnicas como a hemaglutinação passiva, gel difusão e fixação de complemento são citados, embora menos utilizados na rotina de laboratório (Roehe, 1996).

Outras doenças que cursam com sintomatologia nervosa devem ser consideradas no diagnóstico diferencial da encefalite por BHV-5, como a raiva, a pseudoraiva, polioencefalomalácia, intoxicação por chumbo, intoxicação por sal, hipomagnesemia e trauma (George, 1991).

2.12.1. DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO

Durante a replicação do vírus são formados corpúsculos de inclusão intranucleares característicos de infecções por herpesvírus, sendo eventualmente encontrados em tecidos de animais infectados (Pastoret *et al.*, 1982). Inclusões virais intranucleares são ocasionalmente encontradas em biópsias de células vaginais, mas não em células presentes em descargas nasais de animais com IBR (Crandell *et al.*, 1959). As inclusões são transitórias, portanto, o seu uso para diagnóstico histopatológico é de valor limitado.

Em animais com meningoencefalite, são descritas áreas de lesões como leptomeningite e encefalite difusas, não purulentas, associadas à presença de inclusões intranucleares em astrócitos e neurônios. As lesões inflamatórias caracterizam-se por infiltrados perivasculares constituídos principalmente por macrófagos e linfócitos (Johnston *et al.*, 1962; Bagust & Clark, 1972; Salvador *et al.*, 1998). As lesões

inflamatórias associadas a áreas de necrose do córtex cerebral são frequentemente citadas por vários autores, mas o diagnóstico histopatológico somente é considerado conclusivo na presença de corpúsculos de inclusão intranucleares em astrócitos e neurônios (Riet-Correa *et al.*, 1989).

Em casos de meningoencefalite secundária à forma sistêmica, além das lesões no sistema nervoso central, são encontradas lesões na mucosa da língua, esôfago e rúmen, hepatite intersticial e broncopneumonia necrosante supurativa (Belknap *et al.*, 1994).

2.12.2. DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO

O teste sorológico padrão para a detecção de anticorpos anti-BHV é a prova de soroneutralização (SN) (House & Baker, 1971, Gibbs & Rweyemamu, 1977, Cho e Bohac, 1985, Teixeira *et al.*, 1998). O teste é confiável e específico. Os animais positivos apresentam títulos médios entre 8 e 64. Ocasionalmente são obtidos títulos mais altos e alguns animais parecem desenvolver títulos muito baixos ou não detectáveis (Gibbs & Rweyemamu, 1977).

Em qualquer uma das formas da doença, a coleta pareada de soro (no início do quadro clínico e após duas a quatro semanas) dos animais pode auxiliar o diagnóstico (Schild *et al.*, 1994).

O primeiro pesquisador a demonstrar a utilização da técnica de soroneutralização em microplacas para o vírus da IBR foi Black, em 1970. O autor apresentou como vantagens um grande ganho de tempo, menor trabalho e custos para o teste, quando comparados à forma antiga de utilização de tubos de vidro contendo cultivo celular.

A maioria dos laboratórios de diagnóstico virológico veterinário utilizam a SN, isolada ou juntamente com outros ensaios (Ravazzolo *et al.*, 1989, Weiblen *et al.*, 1992b, De Stefano *et al.*, 1993, Lovato *et al.*, 1995a, Vidor *et al.*, 1995).

Atualmente os testes imunoenzimáticos têm sido empregados no diagnóstico sorológico de infecções pelo herpesvírus bovino, devido à sua sensibilidade e sua rapidez de execução (Edwards & Gitao, 1987b, Osório *et al.*, 1989, Shen *et al.*, 1991, Graham *et al.*, 1997, Anônimo, 1998).

2.13. CONTROLE E PREVENÇÃO

Os principais fatores que vêm contribuindo para a difusão dessa enfermidade são a introdução nos rebanhos de animais oriundos de leilões ou de importações, sem exigências sanitárias necessárias para prevenir a infecção, a crescente utilização de confinamentos para a engorda de animais, a não obrigatoriedade do controle virológico do sêmen comercializado no País e, principalmente, a falta de informação dos criadores, das autoridades e veterinários sobre estas viroses (Silva *et al.*, 1998). A presença de animais portadores favorece a perpetuação do vírus no rebanho, uma vez que eles têm recorrências da infecção eliminando o vírus e, quando a percentagem de vacas infectadas é alta, elas infectam o rebanho jovem antes da idade reprodutiva (Sheffy e Rodmann, 1973, Roehle *et al.*, 1997b).

Devido a isso, a infecção por herpesvírus bovino tem sido controlada e prevenida através da combinação de uma variedade de práticas de manejo e com um bom programa de vacinação (Donkersgoed & Babiuk, 1991).

O controle de um surto pode ser conseguido através de medidas de higiene e isolamento dos animais enfermos, embora seu sucesso dependa da distribuição geográfica da enfermidade. Devido à possibilidade da infecção latente, todos os animais soropositivos devem ser considerados potenciais fontes de infecção (Kahrs, 1977; Ackermann *et al.*, 1982). Nos estágios iniciais de um surto, a vacinação dos animais expostos pode diminuir o número de novos casos e não devem ser introduzidos animais na propriedade (Donkersgoed & Babiuk, 1991). Os surtos ocorrem mais freqüentemente em rebanhos não vacinados, após situações de estresse. Isto acontece geralmente quando o vírus origina-se de uma infecção latente e é disseminado a animais suscetíveis. Durante o surto, os animais doentes devem ser isolados e tratados com antibióticos de largo espectro para prevenir infecções secundárias (Fenner *et al.*, 1993a).

A maior incidência da encefalite em rebanhos confinados sugere que a densidade populacional é um fator crítico na disseminação viral. Portanto, a redução da densidade populacional nestes rebanhos pode prevenir a transmissão da doença entre os animais (George, 1991).

Variadas formas de controle e erradicação foram propostas por diversos pesquisadores. Na Europa, a utilização de vacinas com marcadores genéticos, juntamente com o manejo higiênico-sanitário adequado, vem alcançando resultados positivos no que se refere ao controle desta virose (Van Oirschot *et al.*, 1996).

No Brasil, o controle da enfermidade baseia-se principalmente na vacinação com vacinas convencionais, pois são essas as únicas disponíveis em nosso mercado. A utilização dessas vacinas objetiva, principalmente, reduzir os sinais da doença após infecção e desse modo diminuir o impacto econômico das infecções pelo vírus (Van Oirschot *et al.*, 1996).

2.14. DIARRÉIA VIRAL BOVINA

O vírus da Diarréia Viral (ou Vírica) Bovina/ Doença das Mucosas, em inglês denominado “Bovine Viral Diarrhea Virus/Mucosal Disease” (BVDV), é um agente infeccioso de distribuição mundial, presentemente classificado na família *Flaviviridae*, e incluído, juntamente com os vírus da Peste Suína Clássica (VPSC) e o “vírus da border disease” (VBD) ou “Doença da Fronteira” dos ovinos, no gênero *Pestivirus* (Francki *et al.*, 1991).

O BVDV tem sido associado à uma série de síndromes em bovinos, que variam desde infecções inaparentes até uma enfermidade altamente fatal. Este vírus também é reconhecido por sua capacidade de cruzar a barreira placentária e induzir sérias perdas reprodutivas, que podem variar desde infecções congênitas inaparentes até perdas embrionárias, abortos, nascimento de animais fracos ou aparentemente normais, porém persistentemente infectados e capazes de disseminar a infecção por longos períodos (Van Oirschot, 1983).

Uma das importantes características do BVDV é a grande diversidade de cepas (Paton, 1995, Hamers *et al.*, 2000). Um aspecto observado desta diversidade é a diferença na virulência entre cepas; de fato, enquanto muitas cepas são de baixa ou moderada virulência, outras são hipervirulentas e associadas com síndromes hemorrágicas de alta mortalidade. Estas surgiram na América do Norte no fim de 1980 (Corapi *et al.*, 1989, Rebhun *et al.*, 1989).

O vírus da BVD apresenta 2 biotipos baseados na sua replicação em cultura de células: citopatogênico (CP) e o não citopatogênico (NCP) (Meyers e Thiel, 1996, Fray *et al.*, 2000). O NCP é mais comumente isolado no campo; replicam em cultura de células sem causar nenhum efeito citopático (Baker, 1987), e podem atravessar a placenta estabelecendo uma infecção persistente (Fray *et al.*, 2000). Este biotipo é responsável pela circulação permanente do BVDV na população bovina (Brownlie, 1990; Booth *et al.*, 1995). Em contraste, o biotipo CP, que origina-se de mutações do vírus NCP (Corapi *et al.*, 1988, Donis, 1995), produz efeito citopático característico, que se traduz em vacuolização citoplasmática e morte celular (Gillespie *et al.*, 1960, Zhang *et al.*, 1996) e é incapaz de estabelecer infecção fetal persistente (Brownlie *et al.*, 1989).

Uma posterior classificação do vírus BVD, baseado em diferenças encontradas na seqüência genética de uma região do genoma, conhecida como região 5'UTR, determinou a existência dos grupos 1 e 2, existindo diferenças a nível molecular e quanto à severidade dos sinais clínicos que produzem (Ridpath *et al.*, 1994). O genotipo 1 inclui isolados clássicos de virulência baixa ou moderada, além de cepas tradicionalmente usadas na pesquisa (ex: Oregon C24V, Osloss) enquanto o genotipo 2 inclui não somente isolados de doenças severas na América do Norte, mas também cepas de baixa virulência e isolados previamente classificados como atípicos (Hamers *et al.*, 2002).

2.15. PROPRIEDADES

2.15.1. MORFOLOGIA E ESTRUTURA

O BVDV mede de 40 a 60 nm de diâmetro (Francki *et al.*, 1991) e está entre os menores vírus RNA envelopados que causam infecções em animais (Horzinek, 1981). O seu genoma é constituído por um único segmento de RNA, fita simples, com aproximadamente 12,5 Kb de extensão (Renard *et al.*, 1985; Francki *et al.*, 1991). O ácido nucléico possui polaridade positiva, utilizando quase todo seu genoma como RNA mensageiro (Collett *et al.*, 1988). O RNA está protegido por um capsídeo icosaédrico (Horzinek, 1981), formado por proteínas até hoje ainda não completamente caracterizadas. O capsídeo é envolto externamente por um envelope de

constituição lipoprotéica, composto por uma bicamada lipídica derivada das membranas celulares. Do envelope emergem projeções de glicoproteínas em toda a sua superfície, as quais são denominadas peplômeros (Fenner *et al.*, 1993b).

2.15.2. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS

Devido à constituição lipoprotéica de seu envelope, o vírus é sensível à solventes orgânicos e detergentes (Fenner *et al.*, 1993b). O vírus também é rapidamente inativado a 56°C, sendo sensível a ácidos (pH 3,0) e estável em pH alcalino (Andrewes *et al.*, 1978b). Harkness & Duffel (1985) observaram que o vírus é sensível a desinfetantes tais como fenol, aldeído e hipoclorito de sódio. É estável a baixas temperaturas, especialmente quando suspenso em meio contendo proteínas (Andrewes, *et al.*, 1978b). O vírus preserva sua infectividade por alguns dias quando mantido a 4°C, e durante anos quando estocado em temperaturas inferiores a -70°C (Fenner *et al.*, 1993b).

2.15.3. PROTEÍNAS

As proteínas do vírus da diarréia viral bovina (BVDV) são derivadas de um único polipeptídeo (Collett *et al.*, 1988). São classificadas em proteínas precursoras, que através de um processo seqüencial de clivagens originarão as proteínas maduras do vírus (Collett *et al.*, 1991; Fenner *et al.*, 1993b), e proteínas intermediárias, algumas com função enzimática, as quais, na sua maioria, estão envolvidas na transcrição do ácido nucléico, regulação da multiplicação, processamento ou replicação viral (Fenner *et al.*, 1993b). Como exemplo, temos a proteína NS2-3, sendo considerada a mais importante na replicação viral (Franki *et al.*, 1991, Donis, 1995). Além disso, três prováveis glicoproteínas estruturais E0, E1 e E2 localizadas no envelope viral (Collett *et al.*, 1991; Donis, 1996). As proteínas estruturais exercem funções importantes no revestimento protetor do ácido nucléico viral e permitem sua saída da célula infectada, bem como sua entrada em outras células (Donis, 1996). É importante ressaltar que a produção de NS3 está correlacionada com a produção de citopatologia em culturas de células; tais isolados estão classificados como biotipos citopáticos. Em

contraste, muitos isolados do BVDV expressam somente a NS2-3 e não produzem citopatologia, sendo classificados como não citopáticos (Donis, 1995, Donis & Dubovi, 1987b).

As glicoproteínas E0 e E2 são responsáveis pela adsorção do vírus a receptores específicos nas células (Corapi *et al.*, 1988; Boulanger *et al.*, 1991; Reddy *et al.*, 1995). A E2 é a proteína indutora de anticorpos neutralizantes (Donis *et al.*, 1988; Bolin & Ridpath, 1989; 1990).

Os anticorpos monoclonais (AcMs) têm sido amplamente utilizados como ferramentas para estudo de amostra de BVDV. Painéis de AcMs tem permitido determinar os perfis de reatividade do vírus (Corapi *et al.*, 1990b). O perfil de reatividade permite caracterizar amostras isoladas de diferentes animais em surtos ou rebanhos (Corapi *et al.*, 1988). Os AcMs são específicos para um só determinante antigênico de proteína viral e, permitem diferenciar várias cepas em um sistema viral (Howard *et al.*, 1987).

Estudos com AcMs demonstraram que isolados de BVDV possuem alto grau de variação antigênica, na maior parte restrita a glicoproteínas do envelope; esta variação estaria localizada nas E0 e E2, o que possivelmente indicaria a ocorrência de mutações (Corapi *et al.*, 1988, 1990b). Estudos similares realizados no Rio Grande do Sul (Flores *et al.*, 2000b) frente a uma bateria de AcMs, demonstraram muita diferença a nível de proteínas, entre as cepas Singer, NADL, Oregon c24v e várias cepas isoladas no país. Em outro estudo, Deregt *et al.* (1998) obtiveram AcMs que reagiram com todas as amostras “clássicas” e isolados testados, indicando que várias amostras de BVDV possuem epitopos comuns, o que possibilita a utilização de um “pool” destes AcMs para a detecção do vírus.

2.16. MULTIPLICAÇÃO VIRAL

A adsorção celular dos pestivírus é lenta e depende do tipo de célula utilizada (Horzinek, 1981; Watson *et al.*, 1987; Roehe, 1991). A completa adsorção do BVDV em células de testículo de carneiro (TT) foi obtida somente após 100 minutos (Roehe, 1991). Evidências sugerem que os vírions entram na célula por endocitose mediada pela fusão das proteínas do envelope viral com os receptores da membrana celular (Heinz *et al.*, 1994). Os vírions são posteriormente encontrados em vesículas pré-

lisossomais, onde a fusão ácido-catalizada da proteína do envelope viral com a membrana endossomal possibilita liberação do nucleocapsídeo no citoplasma (Watson *et al.*, 1987; Heinz *et al.*, 1994).

Com a liberação do RNA no citoplasma, a replicação ocorre pela síntese da fita complementar negativa, através da RNA polimerase-RNA dependente, a qual será utilizada como modelo para a produção de fitas positivas adicionais (Fenner *et al.*, 1993b). Este material genético poderá ser utilizado para a tradução de polipeptídeos estruturais e não estruturais, síntese de novas fitas negativas, ou ser encapsulado durante a formação do vírion (Donis & Dubovi, 1987b). A tradução do genoma viral ocorre a partir de uma única grande fase de leitura ou “open reading frame” (ORF) que se estende por quase todo o RNA, codificando 3988 aminoácidos na amostra NADL (Collett *et al.*, 1988). A ORF codifica uma única poliproteína seguindo a ordem predita da seqüência genômica que, após um processo seqüencial de clivagens, resulta nas proteínas virais intermediárias e maduras (Collett *et al.*, 1991).

Uma vez sintetizadas as proteínas estruturais, os vírions são montados e adquirem o envelope durante a maturação, provavelmente a partir das membranas do retículo endoplasmático perinuclear (Westaway, 1987). Depois, são liberados ao meio extracelular, podendo ou não causar lise celular, dependendo das características da amostra (Fenner *et al.*, 1993b). Os primeiros vírions foram encontrados cerca de 8 horas pós-infecção, seguida por uma fase exponencial de cerca de 20 horas (Nuttall, 1980).

2.17. PATOGENIA E SINAIS CLÍNICOS

Para maior entendimento, a patogenia das infecções pelo BVDV será dividida em infecções pré-natais e infecções pós-natais.

2.17.1. INFECÇÕES PRÉ-NATAIS

A gestação é o período mais importante na infecção e disseminação do BVDV (Casaro *et al.*, 1971; Coria & McClurkin, 1978). O resultado da infecção pré-natal dependerá do período da gestação em que ela ocorre e o biotipo do vírus infectante (Osburn, 1989; Brownlie, 1990).

A patogenia da infecção durante os primeiros 30 dias de gestação ainda é incerta, a nível de células germinativas e implantação embrionária (Brownlie, 1990). Nesta época, o estabelecimento da infecção persistente pode ocorrer, mas é provavelmente um evento raro (Paton *et al.*, 1990). Neste estágio inicial, poucos casos de infecção transplacentária ocorrem (Whitmore *et al.*, 1978), provavelmente porque o contato entre o epitélio maternal e o trofoblasto não é suficientemente íntimo (Kendrick, 1976). Vários autores observaram que o BVDV, neste período, pode causar queda nos índices de concepção, morte fetal ou reabsorção embrionária e infertilidade temporária (McClurkin *et al.*, 1979; Whitmore *et al.*, 1981; Grahn *et al.*, 1984; Barlow *et al.*, 1986; Virakul *et al.*, 1988; Paton *et al.*, 1990; Houe *et al.*, 1993).

A infecção com o BVDV no período entre 37 e 99 dias de gestação leva freqüentemente ao aborto (Casaro *et al.*, 1971; Meyling *et al.*, 1987), mas também pode causar mumificação fetal e nascimento de natimortos (Scott *et al.*, 1973; McClurkin *et al.*, 1984; Brownlie *et al.*, 1989). Mumificações fetais têm sido ocasionalmente encontradas nas infecções induzidas até 107 dias de gestação (Scott *et al.*, 1973). Outro resultado da infecção fetal nos primeiros 100 a 125 dias da gestação, é o nascimento de animais persistentemente infectados (PI) (Liess *et al.*, 1984; McClurkin *et al.*, 1984; Brownlie *et al.*, 1989).

Infecção no período aproximado de 110 a 150 dias, podem resultarem em malformações ou degenerações de órgãos fetais (Casaro *et al.*, 1971; Brown *et al.*, 1973; Done *et al.*, 1980; Baker, 1987). Nesta fase da gestação, o SNC é um alvo comum nas infecções pelo BVDV, podendo dar origem a lesões cavitativas ou anomalias anatômicas que, dependendo de sua gravidade ou localização, podem ocasionar a morte ou aborto (Scott *et al.*, 1973; Liess *et al.*, 1984; Brownlie, 1990).

Aproximadamente após os 150 dias de gestação o feto está geralmente apto a desenvolver uma resposta imunológica eficaz, sendo capaz de responder à infecção e eventualmente eliminar completamente o vírus. Ao exame do soro fetal (pré-colostal), a presença de anticorpos neutralizantes específicos pode ser a única alteração notável no recém-nascido (Casaro *et al.*, 1971; Brown *et al.*, 1979).

2.17.2. INFEÇÕES PÓS-NATAIS

Os animais adultos, afetados pelo BVDV CP ou NCP irão desenvolver a Diarréia Viral Bovina (BVD), caracterizada por um quadro sub-clínico, ocasionalmente causando uma infecção aguda relativamente leve (Brownlie, 1985), por amostras do BVDV tipo 1 (Pellerin et al., 1994). Durante o curso da BVD ocorre imunossupressão, se manifestando por diminuição da produção de interferon (Malmquist, 1968), e pela queda no número de neutrófilos e linfócitos B e T circulantes (Bolin et al., 1985d). Esta imunossupressão pode ocasionar o aumento da patogenicidade de agentes secundários no trato respiratório e digestivo, como os da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR), da Parainfluenza-3 (PI-3), de pneumonias microfibrinopurulentas por *Pasteurella hemolytica* e diarréias por *Salmonella spp*, Coronavírus ou Rotavírus (Baker, 1987).

As amostras de BVDV tipo 2 têm se caracterizado por uma alta patogenicidade, estando associadas com taxas elevadas de mortalidade, chegando a atingir 25% dos animais jovens (Rebhun et al., 1989; Pellerin et al., 1994). Estas amostras, mais virulentas que as amostras clássicas de BVDV, induzem uma severa imunodepressão (Bolin & Ridpath, 1992), intensa trombocitopenia e hemorragias generalizadas (Corapi et al., 1990a).

2.17.3. DOENÇA DAS MUCOSAS

Os animais persistentemente infectados estão sujeitos a desenvolver uma síndrome usualmente fatal produzida pelo BVDV, denominada Doença das Mucosas (DM) (Liess et al., 1974). Esta é uma enfermidade com manifestação severa que acomete animais geralmente entre 6 e 24 meses de idade, levando invariavelmente a morte (Brownlie et al., 1984). A doença ocorre quando um animal PI com o vírus NCP é superinfectado com o vírus CP "homólogo". A estreita semelhança antigênica dos "pares" de amostras CP e NCP isoladas de casos de DM foi verificada pela similaridade nos títulos neutralizantes produzidos pelos pares de amostras (Howard et al., 1987), pela semelhança nos pesos moleculares dos polipeptídeos imunoprecipitados (Pocock et al., 1987) e pelo perfil de reatividade antigênica (Corapi

et al., 1988). Howard et al. (1987) e Corapi et al. (1988) supõem que a amostra CP de surtos de DM tem origem por mutação do vírus NCP no animal PI.

O surgimento do biotipo CP em casos de DM, tem sido explicado por dois possíveis mecanismos. Um deles é através de rearranjos dos genes responsáveis pela proteína não estrutural NS23, da qual se origina a NS3. O segundo é pela inserção de genes celulares no genoma viral (Meyers et al., 1991; Qi et al., 1992). Uma vez originada a amostra CP, a partir do vírus homólogo NCP em um dos animais PI, a transmissão horizontal do vírus CP para outros animais PI provocaria o desencadeamento de surtos de DM dentro dos rebanhos (Meyers et al., 1990).

Outra possibilidade seria a superinfecção com o vírus CP originado por transmissão horizontal. Experimentalmente, superinfecções com amostras CP homólogas foram produzidas em animais PI (Brownlie et al., 1984; Bolin et al., 1985 a)

2.18. IMUNOLOGIA

2.18.1. IMUNOSUPRESSÃO

Embora infecções agudas com BVDV ncp sejam muitas vezes assintomáticas ou produzam somente sinais clínicos brandos, há evidências que estes sinais resultem em imunossupressão aumentando a susceptibilidade a doenças (Edwards et al., 1986, Wray e Roeder, 1987). O mecanismo de imunossupressão induzido pelo BVDV não foi estabelecido, embora especulações tem sido importantes, baseado amplamente em observações *in vitro* (Potgieter, 1995).

A capacidade do BVDV ncp de causar imunossupressão pode estar relacionado ao tropismo do vírus por células do sistema imune. O vírus infecta células TCD4+ e células TCD8+, células B e células apresentadoras de antígeno (APC) *in vivo* (Bruschke et al., 1998, Sopp et al., 1994). Monócitos, macrófagos e células dendríticas (DCs) constituem a maioria de APCs envolvidas na resposta imune. Destas APCs, as DCs são as mais efetivas e tem a habilidade para iniciar uma resposta imune primária em animais novos (Banchereau et al., 2000). Além disso, o BVDV tem sido relatado por modular funções de células imunes após infecção *in vitro*, com aumento na produção de óxido nítrico em macrófagos infectados (Adler et

al., 1994), diminuição na produção de Fator de Necrose Tumoral α (TNF α) (Adler et al., 1996), redução da expressão de receptores para Fc e proteínas do complemento (C3) e da atividade fagocítica de macrófagos alveolares (Welsh et al., 1995).

O estudo da interação de DCs e monócitos com BVDV e como isto pode influenciar na resposta imune primária é decisivo para compreender a patogênese da doença e a imunidade à infecção. Foram feitos experimentos com DCs e monócitos infectados com BVDV ncp e cp, para investigar se existem diferenças no crescimento viral e citopatogenicidade nestes dois tipos de células (Glew et al., 2003). Foi mostrado que monócitos e DCs são susceptíveis à infecção com BVDV ncp e BVDV cp *in vitro*. Monócitos infectados com BVDV ncp foram comprometidos em sua habilidade para estimular alogênicos e respostas de célula T CD4+ de memória, mas DCs não foram afetadas. Diferenças na resposta dos 2 tipos celulares à infecção com BVDV citopático foram vistas. As células dendríticas não foram susceptíveis ao efeito citopático causado pelo BVDV cp, enquanto os monócitos foram destruídos.

2.18.2. EFEITOS DO BVDV NA PRODUÇÃO DE INTERFERON E RESPOSTA IMUNE ADAPTATIVA

Uma série de estudos têm sido feitos para examinar a produção *in vivo* de IFN α / β . Análises da produção de interferon (IFN) α/β mostraram níveis similares em monócitos e DCs expostos ao BVDV cp, mas nenhum dos IFN foi detectado em células expostas ao BVDV ncp (Glew et al., 2003). Cella et al. (1999) concluíram que a prevenção de morte celular em DCs não está associada com o aumento na produção de IFN- α/β . Foi excluído o papel de interferon α/β na proteção de efeito citopático. Tem sido mostrado que isolados de BVDV ncp não induzem IFN α / β *in vitro* (Diderholm e Dinter, 1966, Adler et al., 1997). Em contraste aos estudos *in vitro*, infecções experimentais com BVDV ncp mostrou induzir forte produção de IFN α / β (Charleston et al., 2002). Elevados níveis de IFN α / β foram detectados no soro entre 1 e 7 dias após infecção. Estes resultados indicam que a imunossupressão causada pelo BVDV não está associada com respostas baixas de interferon. De forma interessante, IFN α / β não foram detectados no soro de animais PI, sugerindo que a infecção persistente pode resultar em baixa regulação da resposta e/ou que uma resposta imune

adaptativa pode ser exigida para aumentar a resposta de IFN α / β (Brackenbury *et al.*, 2003).

Infecções precoces do feto (< 120 dias) com o BVDV ncp resultam no estabelecimento de infecção persistente (PI). A PI é caracterizada por imunotolerância específica para a cepa infectante (Peterhans *et al.*, 2003). Anticorpos ao vírus persistente estão ausentes em animais PI (Donis & Dubovi, 1987b). A instalação da tolerância imune se deve ao fato do vírus infectar o timo e a medula, onde seus antígenos são apresentados como próprios aos linfócitos por ocasião da seleção clonal, tanto de linfócitos T como dos linfócitos B. Desta forma, todos os linfócitos capazes de reconhecer os antígenos virais da amostra infectante, serão eliminados. Porém, animais PI são imunocompetentes, respondem imunologicamente a uma variedade de organismos, inclusive a antígenos de BVDV heterotípicos (Bolin *et al.*, 1985a, Roberts *et al.*, 1988). Vírus cp são incapazes de estabelecer infecção persistente (Brownlie *et al.*, 1989). Entretanto, isto não está claro se ocorre devido à ausência de células capazes de auxiliar na replicação do vírus cp neste estágio de desenvolvimento ou na habilidade do feto de combater a infecção. Para determinar se a habilidade de estabelecer infecção *in utero* está associada com a capacidade para induzir IFN α / β , fetos bovinos com 60 dias foram infectados com BVDV ncp ou BVDV cp e então abatidos 3, 5 e 7 dias após para exame pós-mortem (Charleston *et al.*, 2001). Ambos os vírus foram encontrados no baço do feto. IFN α / β foram encontrados no líquido amniótico dos fetos infectados com BVDV cp, mas não foram detectados no líquido amniótico de fetos infectados com BVDV ncp. Estes resultados sugerem que o insucesso do BVDV ncp em induzir síntese de IFN α / β pode estar relacionado na habilidade do vírus estabelecer infecção persistente precoce no feto. Com isto, fica mostrado que a supressão de síntese de IFN pode ser essencial para o estabelecimento da infecção persistente e imunotolerância (Peterhans *et al.*, 2003).

Em vista da evidência que células T CD4+ representam um papel essencial na imunidade contra BVDV (Howard *et al.*, 1992), os estudos têm focalizado em examinar a cinética, especificidade e fatores funcionais de respostas células T CD4+. Infecções experimentais de bovinos com BVDV ncp mostraram aumento na viremia transitória e na excreção nasal do vírus, com detecção da infecção aproximadamente 12-14 dias após infecção. Em contraste, infecções de bovinos com BVDV cp homólogos resultaram em baixos títulos do vírus nas secreções nasais e a viremia não foi detectável (Lambot *et al.*, 1998). Porém, anticorpos vírus-específicos foram

primeiro detectados imediatamente após liberação viral de ambos biotipos. Esta é uma diferença marcante na cinética do desenvolvimento de uma resposta à células T específicas após infecção com BVDV ncp e BVDV cp. Consta-se que respostas proliferativas a células T não são detectáveis até aproximadamente 6-8 semanas após a infecção com BVDV ncp, mas quando infectados com BVDV cp, estas respostas a células T foram detectadas de 3-4 semanas pós- infecção (Collen e Morrison, 2000). A cinética da resposta a células T ao BVDV ncp é então, acentuadamente diferente daquela observada com outras infecções virais agudas em bovinos.

O BVDV é fascinante, por causa desta interação que tem com o sistema imune e a disponibilidade de pares antígenicamente homólogos de vírus ncp e cp. A divisão da interação hospedeira com os dois biotipos é mais claramente demonstrada por infecção fetal durante o primeiro trimestre de prenhez (Brownlie *et al.*, 1989, Charleston *et al.*, 2001). Porém, isto já tornou claro que a diferença na capacidade dos 2 biotipos de estimular a resposta imune inata é influenciada pelo desenvolvimento da resposta imune adaptativa. Exames dos níveis de IFN α / β no soro após infecção intranasal aguda com BVDV cp ou ncp revelaram diferentes descobertas em estudos *in vitro*. *In vivo*, infecções com vírus ncp resultaram em produção de IFN α / β em níveis altos e prolongados detectáveis no soro (Charleston *et al.*, 2002), enquanto IFN α / β não foram detectados após infecção com BVDV cp (dados não mostrados). Foi concluído que infecções intranasais com cepas cp estavam limitadas a tecidos da mucosa e submucosa relacionados com uma rápida e potente indução de IFN α / β . Porém, apesar desta limitação na disseminação do vírus, a ativação de DCs e processamento do antígeno viral ocorrem para estimular uma resposta imune primária. Os estudos *in vitro* com o vírus cp, mostraram que o vírus não mata as DCs (Glew *et al.*, 2003), deixando estas células migrarem e iniciarem uma resposta imune em linfonodos locais.

Em contraste, infecções com vírus ncp resultam em uma seqüência de diferentes eventos. Os vírus ncp não estimulam a resposta imune inata na superfície da mucosa após desafio intranasal. Desde que a imunidade inata não é estimulada no local, as DCs não tornam-se ativadas e o crescimento viral não fica limitado. Contudo, quando o vírus livre penetra no linfonodo, a interação com DCs plasmacitóides resulta na indução de IFN α (Cella *et al.*, 1999). Estas, recentemente reconhecidas DCs plasmacitóides, também chamadas células produtoras de interferon natural, são as células-chave na ligação entre a resposta imune inata e adaptativa. Esta subpopulação

especializada de DCs precursoras são capazes de produzir grandes quantidades de IFN α / β , o que influencia o desenvolvimento e a sensibilidade de um número de outras subpopulações de DCs e dão formação à resposta imune adaptativa. A indução de IFN α no linfonodo levou à elevação dos níveis de IFN α no soro e tecidos, resultando na ativação e aumento na migração de DCs, estimulando uma resposta imune primária (Howard et al., 1999). O estabelecimento de viremia por um período de dias após a infecção aguda é crucial no ciclo de vida do BVDV ncp (Niskanen et al., 2002).

2.19. EPIDEMIOLOGIA

Infecções nos rebanhos são muito comuns, as quais são evidenciadas por uma alta taxa de animais soropositivos na população bovina com idade acima de 3 anos. A prevalência média de animais portadores de anticorpos situa-se entre 60% e 90% nos diferentes países (Brownlie, 1990)

Harkness et al. (1978) evidenciaram que na Grã-Bretanha aproximadamente 25% dos animais eram infectados com o BVDV durante seu primeiro ano de vida, sendo que 60-80% dos bovinos com mais de 1 ano de idade eram soropositivos. Bolin et al. (1985 a); Edwards et al. (1987a) obtiveram índices de 65-89% dos bovinos apresentando anticorpos contra o BVDV. Wizigmann et al. (1972) no estado do Rio Grande do Sul, detectou 39% de animais soropositivos em 229 soros examinados. Os resultados de 318 exames sorológicos, de diferentes municípios do Rio Grande do Sul no ano de 1993, mostraram uma incidência de anticorpos contra o BVDV de 51% em casos de suspeita clínica de BVD (Oliveira & Roehe, dados não publicados).

2.19.1. TRANSMISSÃO

A transmissão do BVDV pode se dar através de dois principais mecanismos: contato direto ou indireto com animais virêmicos e sua secreções e infecção transplacentária. Pritchard (1956; 1963) observou que o vírus pode ser transmitido horizontalmente pelo contato direto com secreções orais e nasais, ou pelo contato

indireto com fetos abortados e placentas. A infecção oronasal é considerada uma das principais vias de transmissão do BVDV.

A possibilidade de infecção venérea foi constatada por Whitmore *et al.* (1978) e Kirkland *et al.* (1991) ao observarem que o sêmen de reprodutores cursando a forma aguda da doença pode se tornar fonte transitória de infecção. Revell *et al.* (1988) constataram que o BVDV pode estar presente no sêmen de reprodutores com infecção persistente e ser eliminado intermitentemente, difundindo assim a infecção (McClurkin *et al.*, 1979).

Além disso, o homem pode contribuir para a disseminação do vírus, através de instrumentos de trabalho, inseminação artificial, transferência de embriões, premunicação contra Babesiose e Anaplasmosse e vacinas contaminadas com o BVDV (Moennig & Plagemann, 1992).

A infecção transplacentária ocorre em fêmeas prenhes suscetíveis, situação em que o vírus invade o placentoma, multiplica-se e alcança o feto (Casaro *et al.*, 1971). A capacidade do BVDV de estabelecer infecções persistentes “*in utero*” (Brownlie *et al.*, 1984), faz com que o animal infectado albergue o vírus provavelmente durante toda sua vida, o que o torna um reservatório capaz de transmitir o vírus a outros animais (Houe *et al.*, 1993). Acredita-se que a infecção persistente esteja associada somente à amostra NCP, pois estas não comprometeriam o desenvolvimento fetal (Brownlie *et al.*, 1989; Osburn, 1989), ao passo que as amostras CP levariam à interrupção da gestação. O vírus NCP, infectando o feto no período em que ele ainda não é imunocompetente, será reconhecido como “próprio”, instalando-se a imunotolerância específica à amostra infectante (Brownlie *et al.*, 1987; Brownlie, 1990). Este fenômeno, isto é, o estabelecimento de infecções persistentes, provavelmente representa o mais importante fator na manutenção dos pestivírus na natureza (Coria & McClurkin, 1978). Ocasionalmente, fêmeas PI podem sobreviver até a idade reprodutiva e dar origem a “famílias” de animais PI, as quais são perpetuadas através de infecções transplacentárias (Littlejohns & Walker, 1985). Animais PI usualmente apresentam no sangue altos títulos de BVDV circulante, os quais atingem níveis tais como 10^3 a 10^6 doses infectantes para 50% dos cultivos celulares (DICC)₅₀ (Bolin *et al.*, 1985b; Brownlie *et al.*, 1984; Shimizu & Satou, 1987).

Animais PI representam aproximadamente de 0,5 a 2,0% da população bovina e são os maiores disseminadores do vírus nos rebanhos (Bolin *et al.*, 1985c; Howard *et al.*, 1986; Edwards *et al.*, 1987a; Peters *et al.*, 1987; Van Oirschot, 1998). Apesar da prevalência de animais PI ser usualmente baixa, esta pode ser muito alta em determinados rebanhos (Bolin *et al.*, 1985c; Frey *et al.*, 1991). Bolin *et al.* (1985c) em uma única propriedade onde testou 115 animais, isolou vírus de 31 amostras, representando 27% de animais virêmicos no rebanho.

Para o controle de BVDV, a determinação da prevalência de animais PI é de grande importância, porque eles são a principal fonte de disseminação do vírus. Na Alemanha ao redor de 45%, e na Dinamarca 53%, dos rebanhos examinados têm sido descritos por conter animais PI (Houe, 1995).

2.20. SITUAÇÃO NO MUNDO

Na América do Sul, foi relatada a presença da BVD em diversos países. Na Argentina, Romeno (1968) relatou pela primeira vez um surto de BVD. Rweyemamu *et al.* (1990) detectaram uma prevalência de animais soropositivos para BVD no período de 1986 a 1987 de 37%, em 1.494 amostras colhidas. Muñoz *et al.* (1996), avaliaram a frequência de isolamento de BVDV a partir de órgãos de fetos bovinos colhidos em matadouro, no período de 1992 à 1994. Foi feita cultura primária de testículo de feto, inoculada com homogenado de baço, rim, pulmão e fígado de 52 fetos. A investigação do antígeno se deu por Imunofluorescência Indireta (IFI), detectando-se o BVDV não citopático em, pelo menos, um órgão em 11 dos 52 fetos (21,2%). Em 2 fetos foi detectado BVDV citopático e não citopático e 2 fetos negativos para isolamento revelaram anticorpos contra o vírus. Como as vacinas contra o BVDV na Argentina são inativadas, os autores concluem que os isolados são vírus de campo. Dois dos fetos com isolamento de BVDV apresentaram anticorpos contra o vírus. Pinto *et al.* (1993), efetuaram ensaio sorológico em 196 fetos, detectando 2% (4) positivos para BVDV.

No Uruguai, desde 1974 existem suspeitas clínicas da enfermidade. Também existem evidências sorológicas, histopatológicas e imunohistoquímicas de que a enfermidade surgiu no Uruguai antes de 1980. Em 1982, no Uruguai, foi realizado um pequeno estudo sorológico com 71 amostras de casos suspeitos de BVD onde 66%

foram positivas. Esta percentagem não está muito longe do estimado, de acordo com um estudo realizado em 1996, cujos resultados preliminares mostraram uma prevalência de 62%. Esta prevalência foi estimada mediante ELISA para a detecção de anticorpos no soro e leite (Maisonave, 1998).

No Chile, Reinhardt *et al.* (1986) isolaram cepas citopatogênicas e não citopatogênicas de BVDV a partir de um surto de doença das mucosas em terneiros na região sul do país. Estes pesquisadores efetuaram estudo sorológico em 40 rebanhos no ano de 1986, demonstrando que 100% dos rebanhos estavam infectados, com prevalência de 69,2% de animais soropositivos. Rweyemamu *et al.* (1990) detectaram prevalência de animais soropositivos para BVDV, de 77%, em 525 amostras provenientes de duas províncias, no período de 1987. Reinhardt *et al.* (1992) efetuaram isolamento do BVDV e identificação por imunofluorescência, inclusive de animais persistentemente infectados. Segundo Celedón (1993), a infecção de gado bovino pelo BVDV no Chile é descrita desde os anos 1982 e 1984, pela observação de lesões típicas da forma entérica, detectada em exames anatomopatológicos. Atualmente, a BVD está oficialmente reconhecida no país, que não dispõe de um programa oficial de controle. Vacinas inativadas são aplicadas de forma massiva em algumas zonas da região sul do país, concluindo-se serem necessárias mais informações epidemiológicas, do comportamento patogênico e antigênico das cepas atuantes nas regiões. Além disso é preciso dispor de melhores técnicas de diagnóstico e de vacinas adequadas que permitam maior conhecimento e controle desta virose no país.

Celedón *et al.* (1996) observaram que a prevalência de anticorpos soroneutralizantes para BVD, na região metropolitana do Chile, para gado de leite, foi de 60% (258/432) e gado de corte 82% (262/305). Isolaram cepa não citopatogênica de 5 animais adultos, 14 fetos abortados, 1 natimorto e 3 bezerras. De 99 bovinos aparentemente saudáveis, isolaram cepa não citopatogênica em 53% (52). Em 238 bovinos suspeitos de serem persistentemente infectados, 40% isolou-se BVD. Riedemann *et al.* (1996) analisaram 2.864 amostras de soro provenientes de 12 rebanhos leiteiros da província de Valdivia, Chile, contra BVD, pela técnica de soroneutralização. A soroprevalência foi de 50,9% e 100% dos rebanhos estavam infectados.

Reinhardt *et al.* (2001) analisaram 500 amostras de soro bovino provenientes de 50 rebanhos leiteiros da Região X, Chile. O objetivo do estudo foi comparar a técnica de soroneutralização (SN) com o teste de ELISA indireto (ELISA-I) em termos de especificidade e sensibilidade na detecção de anticorpos para BVDV. Os resultados mostraram que a SN detectou 278 amostras positivas, enquanto o teste de ELISA-I revelou 347 amostras como positivas.

Amostras altamente virulentas do BVDV foram isoladas de surtos severos de BVD aguda na América do Norte, com mortalidade alta em animais de várias idades. Trombocitopenia e enfermidade hemorrágica foram descritos em alguns rebanhos (Corapi *et al.*, 1989, Alves *et al.*, 1996, Carman *et al.*, 1998). Foi demonstrado que as amostras isoladas destes surtos tinham características genéticas e antigênicas distintas das amostras clássicas do BVDV. Estes vírus isolados foram então classificados como BVDV tipo 2 e as amostras clássicas denominadas de BVDV tipo 1 (Pellerin *et al.*, 1994, Ridpath *et al.*, 1994). Amostras de BVDV tipo 2 têm sido identificadas predominantemente nos Estados Unidos e Canadá, com poucos relatos na Europa (Wolfmeyer *et al.*, 1997).

O vírus está amplamente distribuído por todo o Continente Europeu; a prevalência em diferentes países parece variar consideravelmente. A prevalência de rebanhos infectados pode estar entre 70 e 100%, mas também pode ser menor do que 40% (Houe, 1995). Tem sido demonstrado que ambas as cepas de BVDV, tipo 1 e 2, estão circulando no continente (Paton, 1995, Hamers *et al.*, 2002).

Mockeliuniene *et al.* (2004) fizeram um estudo em 147 rebanhos leiteiros de 27 diferentes regiões da Lituânia no período de 1997 a 2001. Foi diagnosticado BVDV em todas as regiões investigadas. O número de animais soropositivos variou de 11,9% a 100%. É importante salientar que 29,9% dos rebanhos não estavam infectados com BVDV e em 32,7% dos rebanhos de 70% à 100% de bovinos foram soropositivos ao BVDV.

Em outro trabalho, Luzzago *et al.* (1999) demonstrou a prevalência de anticorpos para BVDV em rebanho leiteiro no norte da Itália, entre 1995 à 1996. Um total de 704 amostras de soro de 29 rebanhos não vacinados, com problemas reprodutivos, foram testados pela técnica de soroneutralização. Como resultado do estudo, 53,3% das amostras foram sorologicamente positivas.

2.21. SITUAÇÃO NO BRASIL

Inicialmente, casos clínicos em que o BVDV foi relacionado como provável agente causal foram descritos (Correa *et al.*, 1968), embora o vírus não tenha sido isolado, nem tão pouco estudos sorológicos tenham sido realizados. O primeiro estudo sorológico evidenciando a presença de anticorpos anti-BVDV em rebanhos brasileiros foi publicado em 1972, no Estado do Rio Grande do Sul, onde foram detectados 39% de animais soropositivos em 229 soros examinados (Wizigmann *et al.*, 1972). A seguir, outros estudos sorológicos foram feitos em outras regiões do país (Roehe *et al.*, 1998). Logo em seguida, foi realizado o primeiro isolamento do vírus, a partir de soro de terneiro utilizado em cultura de células (Vidor, 1974). Desde então, vários laboratórios de pesquisa vêm realizando isolamento do BVDV.

Estudos recentes têm demonstrado que a infecção pelo BVDV está amplamente difundida no rebanho bovino do Brasil (Canal *et al.*, 1998, Botton *et al.*, 1998 a,b). A análise filogenética de amostras isoladas no país revela a presença do vírus dos 2 genótipos no rebanho brasileiro (Canal *et al.*, 1998, Gil, 1998).

A Seção de Febre Aftosa do Instituto Biológico, em São Paulo, submeteu ao isolamento em cultivo celular, 1797 amostras de diversos materiais de bovinos de rebanhos com problemas reprodutivos, nos anos de 1995 e 1996, tais como órgãos de feto abortado, placenta, swabes nasal, ocular e vaginal, cérebro, leucócitos e sêmen. Foram isolados 4 amostras citopatogênicas de vírus da BVD a partir da fração leucocitária.

Pinto *et al.* (2001), de janeiro à junho de 2000, analisaram 22 amostras de cérebro bovino, negativos para raiva e herpesvirus bovino por imunofluorescência indireta (IFI). Dez por cento de homogenado dos cérebros foram preparados em Meio Mínimo Essencial Eagle (MEM) e inoculado em células de rim bovino (MDBK). Após a 5ª passagem do vírus de BVD em célula, a presença deste foi investigada por imunofluorescência indireta. Como resultado do estudo, 2 (9%) de dentro dos 22 isolados, observou-se efeito citopático na 5ª passagem em células MDBK. A presença do antígeno viral foi confirmada por IFI.

Flores *et al.* (2000a) isolaram o vírus de 2 novilhas de diferentes rebanhos. Um dos animais apresentou enfermidade aguda, o outro animal desenvolveu enfermidade de longa duração (7 meses). Os animais afetados foram necropsiados e fragmentos de tecidos foram coletados para imunohistoquímica e tentativas de

isolamento viral. Antígenos do BVDV foram demonstrados por imunohistoquímica e amostras não citopáticas foram isoladas em cultivo celular a partir de leucócitos e baço dos animais afetados e identificados por imunofluorescência. A caracterização antigênica e análise filogenética desses isolados, revelou tratar-se de BVDV tipo 2.

A Sessão de Febre Aftosa do Instituto Biológico, em São Paulo, realizou, no período de julho de 1995 a agosto de 1997, 4.065 exames de soroneutralização para BVD, em soros de rebanhos com problemas reprodutivos, provenientes de diferentes Estados, encontrando 47,7% (1.939) de amostras positivas. Com relação a soros de touros provenientes de 5 Centrais de Inseminação Artificial, durante o período de janeiro de 1997 a fevereiro de 1998, foram encontradas 40,8% (201/493) de amostras reagentes, com títulos variando de 4 a 8096 (Pituco & Del Fava, 1998).

Pituco et al.(1997) estudaram a prevalência de anticorpos contra BVD na região do Vale do Ribeira, Estado de São Paulo. Foram examinadas 425 amostras de soro sangüíneo de búfalas com idade a partir de 1 ano, provenientes de 16 propriedades dos municípios de Registro, Pariqueraçu, Sete Barras, Iguape, Canadéia, Eldorado e Jacupiranga. A técnica empregada foi a de soroneutralização em microplacas. A prevalência encontrada foi de 16,2% (69). Em 5 propriedades estudadas (33,3%) não foram detectados anticorpos no soro dos animais e em 11 propriedades, a prevalência variou de 3,0% a 85,7%. Em todos os municípios foram identificados animais positivos. Os dados demonstram a disseminação do BVDV em rebanhos bubalinos e que há necessidade de maiores estudos para se estabelecer a importância desta espécie na cadeia epidemiológica.

Dias e Samara (2003) analisaram amostras de soro sangüíneo e leite individual de 376 vacas lactantes, entre os meses de março e junho de 2000, não vacinadas, provenientes de 10 propriedades localizadas nas regiões Sul do Estado de Minas Gerais e Nordeste do Estado de São Paulo. Para a pesquisa de anticorpos contra o BVDV, utilizou-se o teste de ELISA indireto. Como resultado do estudo, em todas as propriedades foram encontradas vacas reagentes no soro sangüíneo, cuja frequência variou de 12,28 a 100%, num total de 215 animais reagentes (57,18%). Na análise do leite individual, não revelou animais reagentes em 2 propriedades, e nas demais a frequência variou de 5,26 à 70,83%, num total de 98 animais reagentes (26,07%)

A detecção de animais persistentemente infectados (PI) em rebanhos com grande número de cabeças é difícil. Os PI são usualmente pouco numerosos e sua identificação requer que sejam testados essencialmente todos os animais do rebanho.

O primeiro levantamento feito buscando identificar animais PI em um número relativamente grande de animais, foi realizado por Oliveira (1996). Na ocasião, foram testados 2.186 soros, sendo isolado vírus de 2 amostras, o que corresponde a uma taxa de 0,26% de animais PI. No entanto, outros levantamentos são necessários para que se possa ter uma idéia precisa da prevalência de infecções persistentes nos rebanhos no País.

Em um outro estudo, foi detectado o vírus em um lote de neonatos persistentemente infectados enviados ao matadouro, em que 15 de 40 animais apresentavam viremia no momento da coleta das amostras (Oliveira *et al.*, 1996). Esta situação, é claro, é consistente com a patogenia de infecções pelo BVDV adquiridas durante a gestação, onde grupos de animais prenhes, que não tenham tido contato prévio com o vírus ou não tenham sido imunizados, são expostos à infecção durante a gestação. Nessa população alvo, a introdução do vírus traz invariavelmente conseqüências desastrosas (Roche *et al.*, 1998). No entanto, Botton *et al.* (1998a) mencionaram a detecção de vírus em 0,78% e anticorpos em 1,36% de uma amostra de 1.396 soros fetais coletados em matadouro. Estas taxas seriam certamente suficientes para garantir a perpetuação da infecção nos rebanhos.

Em Pernambuco, região de Garanhuns, Castro *et al.* (1994) avaliaram a ocorrência de BVD em bezerros de até 1 ano de idade, com e sem sintomatologia respiratória, por amostragem pareada, pela prova de soroneutralização. Dentre os 27 bezerros afetados por broncopneumonia, 5 soroconverteram para BVD, enquanto que no grupo dos aparentemente saudáveis, não houve soroconversão.

Em Minas Gerais, Figueiredo *et al.* (1997) avaliaram pela soroneutralização, a prevalência de portadores de anticorpos contra o BVDV em 287 soros de bovinos de diversas regiões, colhidos em matadouro, encontrando soropositividade entre 61,47% e 75,13% das amostras.

Na região do Triângulo Mineiro, Mineo *et al.* (2002) testaram pelo método ELISA, 2 rebanhos com falhas reprodutivas conhecidas. Ambos rebanhos mostraram padrão alto de anticorpos, com 55,8% soropositivos para BVDV. O rebanho 1 teve um grande número de amostras positivas com uma prevalência de 61%. O rebanho 2 apresentou prevalência de 45,7%.

Vieira *et al.* (1999) analisaram 282 amostras de soro bovino provenientes de 34 rebanhos de bovinos de corte e leite com sinais clínicos de infertilidade, coletadas de diferentes distritos de Goiás. Cento e oitenta e quatro amostras foram testadas para

BVDV pelo teste de ELISA comercial, encontrando uma percentagem de 15,8% (29) das amostras positivas. Dentro dos 25 municípios de Goiás, 52% (13) tiveram amostras positivas e dentro os rebanhos, 47,1% (16) tiveram no mínimo um animal positivo.

Em 10 municípios de Goiás, Brito *et al.* (2002) analisaram 452 amostras de soro de 37 rebanhos de bovinos de leite, com problemas reprodutivos, não vacinados contra BVDV. Foram utilizados 2 testes sorológicos: o teste de ELISA de bloqueio comercial e a técnica de soroneutralização (SN). Do total das amostras, 35,2% foram soropositivas no ELISA enquanto 34,5% foram soropositivas no teste de SN. Setenta por cento dos rebanhos e 80% dos municípios apresentavam no mínimo um animal soropositivo.

Noronha *et al.* (2003), coletaram sangue de 156 bovinos, de 1 à 4 anos de idade, de 8 propriedades de diferentes municípios da Bahia, sem diagnóstico prévio ou antecedentes de vacinação contra BVDV. Foram também obtidas amostras (64) do matadouro local, de outros 3 municípios diferentes. O teste utilizado para análise das amostras foi a técnica de soroneutralização. O teste demonstrou que 56% (123) das amostras foram positivas e 44% (96) foram negativas. A distribuição dos títulos de anticorpos soroneutralizantes (TSN), mostrou que 82% das amostras apresentaram TSN de até 512, enquanto que 18% apresentaram TSN maiores que 512. Neste trabalho também foi feito isolamento viral a partir da fração leucocitária e de secreções nasais em células MDBK. Do total de 220 bovinos, 145 animais foram utilizados para o isolamento viral. Foi confirmado a presença do vírus em 4 bovinos aparentemente saudáveis e de 1 bezerro com sinais clínicos respiratórios. Os 5 isolados não apresentaram efeito citopático nos cultivos celulares. A presença do antígeno viral foi confirmada por IFI.

Pellegrin *et al.* (1997), em uma propriedade localizada no Pantanal, MS, composta de 533 vacas e 44 touros, coletaram 153 amostras de soro de matrizes Nelore de forma aleatória, onde estas amostras foram testadas para a presença de anticorpos soroneutralizantes para o BVDV. Os resultados mostraram 43,6% de reações positivas ao teste.

No Rio Grande do Sul, Krahl *et al.* (1997), pesquisaram anticorpos para BVD em 1823 soros de bovinos, pela técnica de soroneutralização. Encontraram 23,4% amostras soropositivas, sendo que das 265 propriedades examinadas, 45,3% (171) apresentaram animais reagentes.

Canal *et al.* (1998) obtiveram amostras de soro de 430 bovinos, provenientes de 19 propriedades do Rio Grande do Sul e 1 propriedade de Corrientes, Argentina, para a detecção de anticorpos para BVDV. Para análise, foi desenvolvido um teste de ELISA baseado em antígenos derivados da cepa BVDV genotipo 1 isoladas na Suíça. Com isso, foram constatados anticorpos em 56% dos soros testados para BVDV, indicando que no Brasil a prevalência de infecção com o BVDV é similar à encontrada na Europa e EUA.

Vilela *et al.* (2003) no Laboratório de Virologia e Imunologia, no período de janeiro a setembro de 2003, analisaram 260 amostras de soro bovino, de 20 propriedades pertencentes a 11 municípios do sul do Rio Grande do Sul, com histórico de problemas reprodutivos. As amostras foram testadas pela técnica de soroneutralização, mostrando uma prevalência de 38,9% (101).

Vilela *et al.* (2004) analisaram 254 amostras de soro bovino no período de outubro de 2003 à setembro de 2004, em 16 propriedades de 7 municípios da Região Sul do RS. O monitoramento sorológico foi feito pela técnica de soroneutralização. Das 218 amostras testadas para BVDV, 70,18% (153) foram soropositivas.

Em outro estudo, Storch *et al.* (2004) fizeram um levantamento das inseminações artificiais realizadas no município de Pelotas/RS, em um plantel de vacas leiteiras da raça Holandesa, no período de 1997 à 2003, registrando-se o percentual de retorno ao cio. Ao mesmo tempo, amostras de sangue foram examinadas no Laboratório de Virologia e Imunologia da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), pela técnica de SN, constatando a presença de anticorpos para BVDV. Com os dados obtidos na sorologia, associado aos sinais clínicos, chegou-se ao diagnóstico presuntivo de BVD. A relação entre as inseminações e concepções com a porcentagem de retorno ao cio foram respectivamente: 1997 de 12:11 (8.34%); 1998 de 24:20 (16.67%); 1999 de 63:48 (23.81%); 2000 de 82:47 (42.69%); 2001 de 71:40 (43.67%); 2002 de 84:39 (53.58%) e em 2003 de 102:38 (62.75%).

2.22. DIAGNÓSTICO

Não há sinais clínicos patognomônicos de infecção com BVDV em bovinos (Sandvik, 1999). Existem várias técnicas de diagnóstico úteis na detecção da enfermidade que podem ser divididas em dois grandes grupos: o método direto e o

método indireto. O primeiro se baseia na detecção do antígeno viral e o segundo determina a resposta imune do tipo humoral do hospedeiro frente a ação do agente etiológico (Reinhardt *et al.*, 2001).

Em rebanhos leiteiros não vacinados, o uso de testes sorológicos a partir de amostras de leite é um método conveniente para estimar a prevalência do BVDV. Ao mesmo tempo, testes sorológicos de animais jovens podem indicar se o BVDV está presente no rebanho. Em rebanhos positivos, animais persistentemente infectados (PI) com BVDV podem ser identificados pelo uso combinado de testes sorológicos e virológicos a partir de amostras de sangue (Sandvik, 1999).

Atualmente, os testes de ELISA têm sido usados para a detecção rápida de anticorpos e antígenos do BVDV no sangue, mas preferencialmente sejam auxiliados por outros métodos tais como os testes de soroneutralização, isolamento do vírus em culturas de células ou amplificação do ácido nucléico viral. O conhecimento da execução dos testes diagnósticos em uso, bem como da epidemiologia do BVDV é essencial para a identificação de animais virêmicos em rebanhos afetados (Sandvik, 1999).

As análises de amostras de soro sangüíneo para a pesquisa de anticorpos contra o vírus da BVD são comumente utilizadas como meio de diagnóstico da infecção, mas amostras de leite também podem ser apropriadas para detecção de animais reagentes (Niskanen *et al.*, 1989).

O desenvolvimento do teste de ELISA para pesquisar anticorpos contra o vírus da BVD em leite de conjunto do tanque de expansão facilitou o diagnóstico de situação da enfermidade nos rebanhos, pois a análise sorológica de um número representativo de animais pode mostrar se o rebanho teve contato com o vírus ou não, porém na maior parte das vezes torna-se onerosa para o criador, principalmente quando se refere a grandes rebanhos (Niskanen, 1993).

2.23. CONTROLE E PREVENÇÃO

O controle da infecção pelo BVDV deve ser direcionado para detecção e eliminação dos animais PI, além da vacinação sistemática de fêmeas soronegativas para prevenir a infecção fetal (Dubovi, 1992, Van Oirschot *et al.*, 1999).

Programas de controle e erradicação da infecção pelo BVDV sem uso de vacinas têm sido implementados em alguns países europeus. Esses programas baseiam-se na identificação de rebanhos infectados e certificação de rebanhos livres, seguidos do descarte dos animais PI das propriedades positivas (Lindberg & Alenius, 1999). Rebanhos que possuem animais PI podem ser identificados por sorologia, já que a presença do vírus resulta na ausência de anticorpos nos PI e altos níveis de anticorpos nos animais que foram infectados (Houe, 1995).

A prevenção da infecção pré-natal e nascimentos de animais PI constituem a base do controle da doença o qual implica em um restrito controle de vacas mães e filhos. Bovinos que nascem PI representam um fator de perpetuidade do vírus no rebanho, conseqüentemente é importante a sua detecção e remoção do plantel. Uma eficiente estratégia para o controle da doença depende do conhecimento epidemiológico da doença, do estado imunológico do rebanho, principalmente para o feto ou terneiro, e de um diagnóstico confiável (Brownlie, 1990; Moerman *et al.*, 1993; Sandvik, 1999).

Segundo Brock (2003), o vírus da Diarréia Viral Bovina é único capaz de causar infecções persistentes em fetos expostos nos primeiros 150 dias de gestação. Prevenindo as infecções fetais, podemos ter um melhor controle da doença. Esta habilidade única do BVDV em causar as infecções persistentes permite ao vírus realizar mutações contínuas e variações antigênicas dentro das populações bovinas. Por essa razão, o BVDV difundiu-se rapidamente trazendo prejuízos econômicos devido a doenças respiratórias, reprodutivas e entéricas.

As vacinações fornecem alguma proteção para a forma aguda porém, programas de vacinação não podem, por si, controlar ou eliminar BVDV (Brock, 2003). Tanto vacinas vivas atenuadas como vacinas inativadas estão disponíveis (Brownlie *et al.*, 1995, Cortese *et al.*, 1998). O alvo primário das vacinações é a prevenção das infecções congênicas, mas somente poucas vacinas têm mostrado este nível de proteção (Van Oirschot *et al.*, 1999). As vacinas vivas quando usadas de forma inadequada, têm sido associadas com lesões de ovário (Grooms *et al.*, 1998), supressão imune e doença das mucosas (Bolin, 1995). Também tem sido discutido que vacinações inapropriadas promovem a propagação do vírus, o que ocorre predominantemente em países que usam vacinas vivas. Embora vacinas inativadas não tragam este problema, elas induzem uma resposta imune mais breve. Um dos

maiores prejuízos com as vacinações é a necessidade de aplicações repetidas das vacinas, e, isto muitas vezes não é feito (Carruthers & Petrie, 1996).

O trabalho realizado por Flores et al. (2000b) caracterizando as cepas virais com AcMs, mostrou diferenças estruturais existentes nas proteínas do vírus. A ausência de homologia entre estas cepas leva a crer que as vacinas possam não estar funcionando, por serem produzidas com cepas padrões ou isolados de outros países. Isso é muito importante não só na vacinação como também na interpretação do diagnóstico. Animais vacinados não estariam devidamente protegidos e o uso de cepas padrões no diagnóstico pode estar mascarando a verdadeira situação da doença nos rebanhos. Portanto, vacinas elaboradas com cepas padrões não protegem suficientemente, por diferirem antígenicamente das cepas isoladas regionalmente. Estes resultados demonstram que testes de soroneutralização utilizando vírus de apenas um genótipo podem resultar em um número significativo de falsos negativos, indicando a necessidade da formulação de vacinas com amostras locais do BVDV e/ou contendo vírus dos dois genótipos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. AMOSTRAS DE SORO

Foram testadas 1.734 amostras de soro sangüíneo, pertencentes a 85 propriedades localizadas nas regiões de Santa Vitória do Palmar e Chuí, do Estado do Rio Grande do Sul. As amostras eram provenientes de bovinos de corte ou leite, machos ou fêmeas, de diferentes faixas etárias, apresentando ou não sinais clínicos de infecção por BHV-1, BHV-5 e BVDV. Nas propriedades estudadas, 12% (212) dos animais foram vacinados contra o BVDV e 14% (245) vacinados contra o BHV. As amostras de soro foram provenientes de propriedades sem histórico de vacinação anterior para BHV e BVD. O número de amostras coletadas foi variável conforme a propriedade. Foram preenchidos questionários com os dados das propriedades e dos animais coletados, para a análise dos fatores de risco associados à infecção pelo BHV e BVDV. O principal objetivo do questionário foi encontrar possíveis explicações para os resultados encontrados pela sorologia.

As coletas foram realizadas nos meses de janeiro e fevereiro de 2003. O sangue foi coletado através de punção da veia jugular, com agulhas descartáveis e sistema de vácuo, em tubos esterilizados, os quais foram deixados na posição inclinada até a retração do coágulo e liberação do soro. No Laboratório de Virologia e Imunologia da Universidade Federal de Pelotas, o soro foi separado do sangue total por centrifugação a 1.500 rpm, durante 15 minutos. Em seguida, as amostras foram inativadas à 56°C, em banho-maria por 30 minutos, acondicionadas em ampolas

Eppendorf e estocadas a -20°C até o momento de uso. Para a realização do exame sorológico, os soros foram transferidos para caixas especiais contendo 96 cavidades, com capacidade para 2,2 ml, já diluídos a 1:2 com Meio Mínimo Essencial de Eagle (MEM-E) e congelados a -20°C até o momento do uso.

3.2. CÉLULAS

Para a produção das suspensões virais, titulação do vírus e testes de soroneutralização (SN), foram utilizadas células da linhagem “Madin Darby Bovine Kidney” (MDBK). As células foram multiplicadas e mantidas em garrafas de Roux de 170 cm^2 com 100 ml de meio de crescimento, cultivadas em Meio Essencial Mínimo de Earle (MEM-E) (CULTILAB, Brasil), acrescentado de 2000 UI/ml de penicilina, 2000 mg/ml de estreptomicina, 10mg/l de enrofloxacin e 25mg/l de anfotericina B e 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado (CULTILAB e LABORCLIN, Brasil). O repique das células foi feito a cada 3-4 dias, quando apresentavam a monocamada confluenta, usualmente na proporção 1:3. Para individualização das células foi utilizada uma solução de Salina - Tripsina – Versene (INLAB). Os cultivos de células foram mantidos em estufa, a uma temperatura de 37°C .

3.3. VÍRUS

Para a realização dos testes sorológicos foram utilizadas as cepas padrões Los Angeles (BHV 1, ATCC) para BHV-1 e Oregon C24V (BVDVc, ATCC) para BVDV. Procurou-se utilizar os antígenos disponíveis e que apresentassem o melhor título.

O título infeccioso do vírus cepa Oregon C 24V obtido foi de $10^{3,50}$ DI₅₀/ml (doses infectantes para 50% dos cultivos celulares/ml) e da cepa Los Angeles foi de $10^{6,50}$ DI₅₀/ml, calculados segundo o método de Behrens & Karber (Mayr *et al.*, 1982).

3.4. PREPARAÇÃO DOS VÍRUS

Os vírus foram inoculados em garrafas de 170 cm² contendo monocamadas de células MDBK. Estas garrafas foram observadas diariamente até o aparecimento de efeito citopático, que consistiu no arredondamento das células, agrupamento de células e destruição do tapete celular. No momento que o efeito citopático atingiu 80-90% do cultivo celular, o sobrenadante foi coletado, distribuído em ampolas para congelamento, e armazenado em nitrogênio líquido até o momento do uso.

3.5. TITULAÇÃO DOS VÍRUS

Foram distribuídos em microplacas (TPP, BIOGEN, Europe) de fundo chato, 25µl de meio de crescimento, 25 µl do vírus, diluídos na base logarítmica 10 (04 repetições por diluição) e 50µl de suspensão de células MDBK, na concentração aproximada de 30 mil células/cavidade. As placas foram incubadas à 37°C em estufa com 5% de CO₂ e a leitura final foi feita 72 horas após a incubação. O título viral foi calculado pelo método de Behrens & Kärber (Mayr *et al.*, 1982). Em todas as titulações foi incluído um controle de células da linhagem MDBK.

3.6. SORONEUTRALIZAÇÃO (SN)

O teste foi realizado em microplacas de poliestireno, fundo chato, de 96 cavidades (TPP). Cada soro testado foi diluído em base logarítmica 2, a partir de 1:4 até 1:32, partindo-se de 25µl de soro em 25µl de meio Eagle com 7% de SFB. A seguir, foi distribuída em cada cavidade com soro já diluído, 25µl de suspensão de vírus contendo 100 DI₅₀/25µl (doses infectantes para 50% dos cultivos celulares/cavidade). Após incubação da mistura soro-vírus por uma hora a 37°C, 50µl de suspensão de células MDBK, cerca de 30 mil células, foi adicionada em cada cavidade, seguida de incubação em ambiente com 5% de CO₂ à 37°C. Foi reservada, no final de cada partida de microplacas, uma fileira de cavidades para controle de células, contendo 50µl de meio Eagle com 7% de SFB e 50µl de suspensão de células.

A leitura dos testes foi realizada em microscópio invertido, no momento em que houve manifestação das 100 DI₅₀/25µl, o que ocorreu aproximadamente em 72 h de incubação, através do monitoramento do efeito citopático (ECP). Nos testes qualitativos, a ausência de ECP indicou a neutralização viral na diluição utilizada, e sua presença, a ausência de anticorpos neutralizantes. Nos testes quantitativos, foram considerados títulos de anticorpos neutralizantes as recíprocas das maiores diluições do soro capazes de inibir a replicação viral e a conseqüente produção de ECP. Em cada teste realizado foi incluído, além do controle de células, uma retrotitulação das 100 DI₅₀/25µl, como controle do título da suspensão viral utilizada no teste.

3.7. ISOLAMENTO VIRAL

SECREÇÕES: Para o isolamento de BHV-1, secreções nasais, oculares e vaginais foram coletadas com suabes estéreis, de 4 vacas pertencentes a uma propriedade localizada no município de Rio Grande, RS, localidade de Santa Isabel, onde 80% das vacas apresentavam sinais clínicos de rinotraqueíte, conjuntivite e vulvovaginite, como mostra as FIGURAS 2 e 3.



FIGURA 1: Secreção nasal em um bovino infectado pelo BHV.



FIGURA 2: Secreção ocular em um bovino infectado pelo BHV.

Após a coleta, os suabes foram imediatamente imersos em 2ml de MEM-E, suplementado com 10% de SFB e adicionado de antibióticos/ antimicótico (2000 UI/ml de penicilina, 2000 mg/ml de estreptomicina, 10mg/l de enrofloxacin e 25mg/l de anfotericina B). Os suabes imersos em MEM-E foram mantidos a temperatura ambiente por 1 hora para ação dos antibióticos. Os tubos de ensaio contendo os suabes foram centrifugados à 2000 rpm por 20 minutos, o sobrenadante foi coletado e, então, inoculado em culturas de células MDBK, em monocamadas com 24 horas de cultivo apresentando 90% de confluência, cultivadas em MEM-E suplementado com SFB e antibióticos/antimicótico. As células inoculadas foram mantidas à 37°C para observação do ECP, juntamente com cultivos controle, não inoculados. As culturas celulares eram examinadas diariamente e, após 3 dias, submetidas a um ciclo de congelamento e descongelamento, para mais 3 passagens em células. A última passagem (4ª passagem) foi feita em tubos de Leighton. Após 3 dias de incubação à 37°C, as lamínulas com células MDBK foram retiradas dos tubos de Leighton, lavadas com uma solução salina tamponada com fosfato (PBS), fixadas em Bouin e coradas pela técnica de hematoxilina-eosina (HE) para observação das inclusões intranucleares.

CÉREBRO: O cérebro de um terneiro de 1 ano de idade com sintomas nervosos, que morreu em uma propriedade no município de Santa Vitória do Palmar, RS, de um grupo de 11 terneiros, deu entrada no Laboratório Regional de Diagnóstico da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL). Este cérebro foi encaminhado então ao Laboratório de Virologia e Imunologia da UFPEL para isolamento de herpesvírus bovino.

O diagnóstico virológico foi realizado como segue: fragmentos do cérebro foram macerados na proporção de 10%, ou seja, 1g de cérebro para 10 ml de MEM-E com dez vezes a quantidade normal de antibiótico e distribuídos em tubos de ensaio. O restante do cérebro foi congelado. A amostra processada foi mantida à 4°C por 24 horas para ação dos antibióticos. Em seguida, a suspensão viral foi centrifugada à 2000 rpm durante 20 minutos e o sobrenadante foi coletado e inoculado no volume de 3 ml em garrafas de 25 cm² contendo células da linhagem MDBK e, submetido a 5 passagens com 5 dias de intervalo entre cada uma. Ao final de cada passagem, as células eram congeladas (-70°C) e descongeladas e, o sobrenadante reinoculado em cultivo celular. A replicação do vírus foi monitorada pela observação de ECP. Após 5

passagens, esta suspensão viral foi estocada em nitrogênio líquido a uma temperatura de -196°C .

3.8. FATORES DE RISCO

Os fatores de risco analisados nas propriedades foram: tipo de exploração, tipo de criação, tipo de ordenha, inseminação artificial, aborto, presença de ovinos/caprinos, compra e venda de reprodutores, aluguel de pasto, pasto em comum, piquete de parto/pós-parto, assistência veterinária, sexo e idade.

3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram analisados através do programa EPI-INFO, versão 6.04. O teste estatístico usado foi o teste do qui quadrado (χ^2). No estudo proposto, para cada extrato da população, foi estimada uma frequência esperada de animais positivos, com 10% de erro aceitável e 95% o intervalo de confiança.

4. RESULTADOS

4.1. RESULTADOS SOROLÓGICOS

Os dados de prevalência das infecções com o BHV e o BVDV nos municípios de Santa Vitória do Palmar e Chuí, obtidos através do presente inquérito sorológico estão demonstrados na Tabela 1. Os resultados obtidos mostram que das 1734 amostras analisadas, 540 (31,14%) foram soropositivas para o BHV e 1.150 (66,32%) para o BVDV.

Para a titulação de anticorpos neutralizantes, as amostras de soro testadas para o BHV foram distribuídas em quatro grupos segundo o título obtido, como pode ser observado na Tabela 1. Do total das amostras avaliadas, 221 (12,75%) apresentaram títulos 1:4, 166 amostras (9,57%) com títulos 1:8, 87 (5,02%) com títulos 1:16 e finalmente 66 amostras (3,81%) apresentaram títulos \geq 1:32. Na mesma tabela, estão apresentados os resultados do BVDV. Nela observa-se que as amostras também foram divididas em quatro grupos de acordo com o título obtido, mostrando os seguintes resultados: 207 amostras (11,94%) apresentaram títulos 1:4, 242 (13,96%) títulos 1:8, 267 (15,40%) com títulos 1:16 e 434 amostras (25,03%) apresentaram títulos \geq 1:32.

TABELA 1: Prevalência de herpesvírus bovino (BHV) e vírus da diarreia viral bovina (BVDV) no rebanho bovino de Santa Vitória do Palmar e Chuí.

	BHV N° (%)	BVDV N° (%)
Total de amostras	1.734 (100)	1.734 (100)
Negativas	1.194 (68,86)	584 (33,68)
Positivas	540 (31,14)	1.150 (66,32)
4	221 (12,75)	207(11,94)
8	166 (9,57)	242 (13,96)
16	87 (5,02)	267 (15,40)
≥ 32	66 (3,81)	434 (25,03)

Nota-se, claramente, que a distribuição dos títulos dos anticorpos dos rebanhos infectados com BHV ocorre com uma frequência maior nos títulos mais baixos, enquanto que com o BVDV, a frequência maior ocorre com os títulos mais altos. Isto pode ser melhor visualizado na Figura 1.

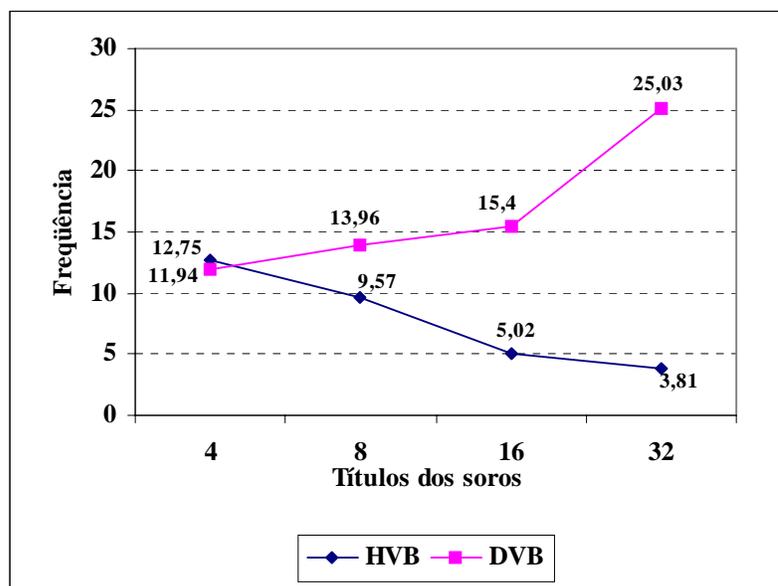


FIGURA 3: Distribuição dos títulos dos anticorpos nos rebanhos infectados com herpesvírus bovino (BHV) e vírus da diarreia viral bovina (BVDV).

Do total de 85 propriedades testadas contra o BHV, em 72 propriedades foram encontrados animais reagentes. No caso do BVDV, foram 70 propriedades com animais reagentes. A variação no índice de positividade para BHV foi de 4% à 75% e para BVDV foi de 14,29% à 100%. A média de amostras positivas para o BHV foi de 44,74% e para o BVDV foi de 67,76%. O percentual positivo de propriedades para o BHV foi de 84,70% e para o BVDV, foi de 82,35%, sobre o total de 85 examinadas. Foram consideradas propriedades positivas aquelas que possuíam pelo menos um animal soropositivo ao BHV e ao BVDV. Estes resultados podem ser vistos na Tabela 2.

TABELA 2: Prevalência das infecções de BHV e BVDV nas propriedades.

Nº de Propriedades	Positivas para BHV Nº (%)	Positivas para BVDV Nº (%)
85	72 (84,70%)	70 (82,35%)

Como mostra as Tabelas 3 e 4, a maior frequência de positivos para BHV e BVDV em relação ao sexo foi encontrada entre os machos, 31,95% e 71,60% respectivamente e, em relação à faixa etária, foi encontrada uma frequência de 40,00% de positivos para BHV em animais com idade superior a 24 meses e, 78,26% de positivos para BVDV em animais com idade entre 7 e 12 meses. Verificou-se uma tendência de aumento na frequência de positivos, entre os machos, para BHV, com o aumento da idade.

TABELA 3: Distribuição das amostras positivas para o BHV em relação à faixa etária e sexo.

Sexo	Idade	Até 6 meses Nº (%)	7-12 meses Nº (%)	13-24 meses Nº (%)	>24 meses Nº (%)	Total Nº (%)
Machos	Nº (%)	16 (30,77)	11 (23,91)	7 (33,33)	20 (40,00)	54 (31,95)
Total machos	(Nº)	52	46	21	50	169
Fêmeas	Nº (%)	13 (32,50)	52 (33,12)	88 (28,30)	333 (31,50)	486 (31,05)
Total fêmeas	(Nº)	40	157	311	1057	1565
Total	Nº (%)	92 (5,31)	203 (11,71)	332 (19,15)	1.107 (63,84)	1.734

TABELA 4: Distribuição das amostras positivas para o BVDV em relação a faixa etária e sexo.

Sexo	Idade	Até 6 meses	7-12 meses	13-24 meses	>24 meses	Total
		Nº (%)	Nº (%)	Nº (%)	Nº (%)	Nº (%)
Machos Nº (%)		39 (75,00)	36 (78,26)	12 (57,14)	34 (68,00)	121 (71,60)
Total machos (Nº)		52	46	21	50	169
Fêmeas Nº (%)		27 (67,50)	113 (71,97)	207 (66,56)	682 (64,52)	1029 (65,75)
Total fêmeas (Nº)		40	157	311	1057	1565
Total Nº (%)		92 (5,31)	203 (11,71)	332 (19,15)	1.107 (63,84)	1.734

As variáveis analisadas nas propriedades, que podem ser possíveis fatores de risco para a infecção pelo BHV e o BVDV, podem ser vistas nas Tabelas 5 e 6, respectivamente.

Das 85 propriedades estudadas, levando em conta o tipo de exploração, 57 (67,06%) propriedades criavam rebanhos de corte, 12 (14,12%) rebanhos de leite, 16 (18,82%) eram de exploração mista. Quanto ao tipo de criação, a maioria foi de criação extensiva (99,20%) com menor índice em criação semi-confinada (0,8%). Com relação ao tipo de ordenha, em 31 (36,50%) propriedades era realizada ordenha manual, em 4 (4,70%) ordenha mecânica ao pé, em 3 (3,52%) ordenha mecânica em sala de ordenha, em 41 (48,23%) não ordenhavam. Quanto ao uso de inseminação artificial (IA), 62 (72,94%) propriedades não usavam IA, 11 (12,94%) a utilizavam paralela com touro, 3 (3,53%) utilizavam somente IA. Em 19 (22,35%) propriedades foi relatada a ocorrência de aborto. Com relação à raça, em 29 (34,12%) propriedades eram criados europeus de leite, em 20 (23,53%) europeus de corte, em 19 (22,35%) eram animais mestiços, em 4 (4,71%) eram criados animais da raça zebú, em 5 (5,88%) outras raças.

Quanto a presença de ovinos e caprinos, em 36 (42,35%) propriedades foi relatada a presença desta espécie.

A compra de reprodutores era realizada em 41 (48,24%) propriedades, seja em leilões (28,24%), exposições (8,24%), de comerciantes (2,35%) ou diretamente de fazendas (9,41%). A venda de reprodutores foi mencionada em 30 (35,29%) propriedades.

Das 85 propriedades, 27 (31,76%) alugavam o pasto. Com relação ao pastejo comum, 19 (22,35%) não tinham pasto em comum com outra propriedade. A presença de piquetes separados para fêmeas na fase de parto e/ou pós-parto foi relatada em 35 (41,18%) propriedades. Trinta e uma (36,47%) propriedades recebiam assistência veterinária, sendo 27 (31,76%) com assistência veterinária particular e, 4 (4,71%) assistência da cooperativa.

TABELA 5: Fator de risco para a infecção pelo BHV nas propriedades dos municípios de Santa Vitória do Palmar e Chuí.

Variáveis	Positivo	Total	%	p	Odds ratio (IC*95%)
Inseminação Artificial					
Usa só inseminação	29	71	40,84	0,042	1,66 (0,98<OR<2,79)
Somente touro	318	1081	29,42		
Usa inseminação + touro	148	438	33,79		

TABELA 6: Fatores de risco para a infecção pelo BVDV nas propriedades dos municípios de Santa Vitória do Palmar e Chuí.

Variáveis	Positivo	Total	%	p	Odds ratio (IC*95%)
Tipo de exploração					
Mista	241	312	77,24	<0,005	2,82 (1,92<OR<4,16)
Leite	131	240	54,58		
Corte	720	1104	65,22	<0,005	1,81(1,33<OR<2,46)
Tipo de criação					
Semi-confinado	3	13	23,08		
Extensivo	1074	1619	66,34	<0,005	6,57 (1,65<OR<30,52)**
Tipo de Ordenha***					
Manual	193	320	60,31		
Mecânica ao pé	50	86	58,14		
Mecânica em sala de ordenha	130	160	81,25	<0,005	2,04 (1,43<OR<2,90)
Não ordenha	777	1168	66,52		
Inseminação Artificial***					
Somente touro	632	983	64,29	0,03	1,31 (1,01<OR<1,71)
Usa inseminação + touro	267	380	70,26	0,003	2,47 (1,28<OR<4,75)
Usa só inseminação	23	47	48,94	0,03	1,88 (1,01<OR<3,51)
Aborto					
Sim	24	39	61,54	0,550	0,82 (0,40<OR<1,68)
Não	425	642	66,20		
Presença de ovinos/caprinos					
Sim	704	1005	70,05	<0,005	1,48 (1,21<OR<1,83)
Não	446	729	61,18		
Compra de reprodutores					
Sim	589	961	61,29	<0,005	0,72 (0,57<OR<0,91)
Não	369	537	68,72		
Venda de reprodutores					
Sim	381	540	70,56	<0,005	1,59 (1,26<OR<2,01)
Não	579	964	60,06		
Aluguel de pasto					
Sim	383	646	59,29	<0,005	0,77 (0,62<OR<0,96)
Não	506	774	65,37		
Pasto em comum					
Sim	198	324	61,11	0,250	0,86 (0,66<OR<1,12)
Não	762	1180	64,58		
Piquete de parto/pós parto					
Sim	414	613	67,54	<0,005	1,49 (1,17<OR<1,90)
Não	355	609	58,30		
Assistência Veterinária					
Sim	386	710	54,37		
Não	558	774	72,09	<0,005	2,17 (1,73<OR<2,71)
Sexo					
Macho	121	169	71,60	0,126	1,31 (0,91<OR<1,90)
Fêmea	1029	1565	65,75		

* IC – Intervalo de confiança

** Este valor pode ser impreciso

*** Somente vacas com mais de 12 meses

4.2. RESULTADOS DOS ISOLAMENTOS

O isolamento do vírus foi obtido a partir de 1 amostra de cérebro e das 4 amostras de secreções. O efeito citopático característico de Herpesvírus nas células MDBK foi observado 48 horas após a inoculação, ilustrado na FIGURA 4. Também foram observadas, pela coloração HE, inclusões nucleares típicas de Herpesvírus (FIGURA 5).

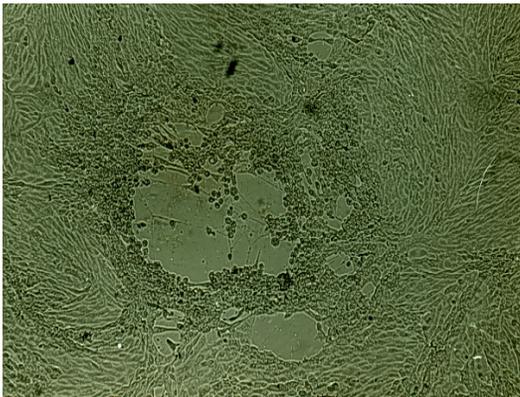


FIGURA 4: Cultivo celular com efeito citopático em células MDBK.

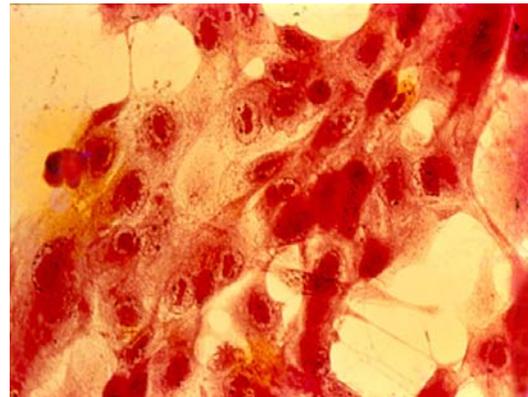


FIGURA 5: Inclusões nucleares causadas pelo BHV em células MDBK.

5. DISCUSSÃO

As doenças causadas pelos BHV ocorrem de forma esporádica em rebanhos suscetíveis, devido à capacidade desse vírus permanecer no organismo em estado latente, com períodos de reativação e excreção intermitentes (Ackermann *et al.*, 1982). O BVDV tem sido associado a uma grande variedade de manifestações clínicas, que variam desde infecções inaparentes até enfermidades fatais, como a Doença das Mucosas, onde os animais tornam-se persistentemente infectados (PI). Além disso, animais infectados no início da gestação podem nascer PI, disseminando o vírus (Van Oirschot, 1983; Baker, 1987). Considerando essas características, os surtos são imprevisíveis, deixando veterinários e produtores inseguros quanto às medidas a serem adotadas para o controle dessas viroses (Fenner *et al.*, 1993a). No Brasil, testes laboratoriais têm demonstrado a presença da infecção pelo BHV e pelo BVDV em rebanhos bovinos de diversos estados brasileiros. No caso do BHV, os percentuais de animais soropositivos variam de 27,1% a 85,7% (Rocha *et al.*, 2001), enquanto que com o BVDV, a prevalência fica entre 14,64% e 84% (Guimarães *et al.*, 2000). Com estes índices observados, a avaliação sorológica é importante para a identificação de animais que possam estar eliminando o vírus no meio ambiente, sendo o primeiro passo nos programas de controle e erradicação, nos quais bovinos infectados devem ser detectados e removidos do rebanho (Van Oirschot, 1998).

Desde a primeira identificação de BHV no Brasil, diversos isolamentos têm sido realizados, a partir de várias manifestações clínicas (Muller *et al.*, 1979; Galvão, 1985; Nogueira *et al.*, 1986; Weiblen *et al.*, 1991; Hübner *et al.*, 1994). O efeito

citopático característico dos herpesvírus em células MDBK e a presença de corpúsculos de inclusão intranucleares observados no presente trabalho, corroboram com Weiblen *et al.*, 1996b; Hübner *et al.*, 1994; Salvador *et al.*, 1998; Elias *et al.*, 2004. Este aspecto ficou comprovado pela prevalência de anticorpos verificada no presente trabalho e principalmente pelo grande número de propriedades positivas.

Com este trabalho procurou-se determinar a prevalência das infecções pelo BHV e BVDV no Rio Grande do Sul, mais especificamente nos municípios de Santa Vitória do Palmar e Chuí, e analisar os possíveis fatores de risco associados a essas viroses. A frequência de bovinos soropositivos para BHV foi de 31,14% (540/1734) e para a BVD foi de 66,32% (1150/1734). Estes resultados indicam que a infecção pelos vírus, principalmente pelo BVDV, ocorrem em frequências importantes nestes rebanhos bovinos. O percentual de animais soropositivos ao BHV, é semelhante aos descritos por Wizigmann *et al.* (1972), que encontraram 33% de amostras positivas e Vidor *et al.* (1995), que detectaram 31,9% de amostras positivas no Rio Grande do Sul. Uma diferença pequena também ficou evidenciada no estudo realizado por Barros Filho *et al.* (1997), os quais demonstraram uma prevalência de 27,1%. Outros autores encontraram índices maiores ou menores dos que os aqui descritos (Ravazollo *et al.*, 1989; Pituco *et al.*, 1993; Calderón *et al.*, 2003; Lovato *et al.*, 1995a; Rocha *et al.*, 2001). Os dados de prevalência aqui obtidos estão de acordo também com Fenner *et al.* (1993a) que citam uma taxa de 10 à 35% para os rebanhos bovinos dos Estados Unidos. Com relação ao BVDV, a prevalência de 66,32% observada entre os animais, aproximou-se dos dados de Canal *et al.* (1998), no Estado do Rio Grande do Sul, onde foi constatado anticorpos em 56% dos 430 soros testados para o agente. Ainda no Rio Grande do Sul, Vilela *et al.* (2004) encontraram uma prevalência de 70,18% das 218 amostras testadas contra o BVDV. No Brasil, Richtzenhain (1997), analisando 2.448 amostras provenientes de 56 propriedades em diversos Estados, encontrou uma prevalência de 65% em Minas Gerais, 84% no Mato Grosso do Sul, 67% no Paraná, 71% no Rio de Janeiro, 73% no Rio Grande do Sul e 78% em São Paulo, sendo que em todas as propriedades havia pelo menos um animal soropositivo. Confrontando os resultados encontrados no presente estudo com os descritos para as outras regiões do país, observamos uma pequena diferença entre as prevalências. Essa diferença pode estar relacionada à metodologia empregada, ao tipo de população bovina utilizada, ao uso de diferentes técnicas de amostragem, à origem e ao manejo dos animais testados

e por diferenças regionais (Lovato *et al.*, 1995a; Pítuco e Del Fava, 1998; Guimarães *et al.*, 2000).

Analisando a distribuição dos títulos dos anticorpos neutralizantes dos rebanhos infectados com BHV, observou-se uma freqüência maior nos títulos mais baixos, conforme mostra a Figura 1. Estes resultados corroboram com Cerqueira *et al.* (2000) e Calderon *et al.* (2003). Com o BVDV a distribuição destes títulos de anticorpos ocorreu ao contrário, ou seja, a freqüência maior aparece com os títulos mais altos. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Noronha *et al.*, 2003.

Das 85 propriedades estudadas, 72 (84,70%) apresentaram pelo menos um animal soropositivo ao BHV, o que também foi constatado em outros países (Boelart *et al.*, 2000; Calderón *et al.*, 2003; Poletto *et al.*, 2004). No Brasil, o percentual encontrado no presente trabalho é confirmado por outros autores (Ravazzolo *et al.*, 1989; Lovato *et al.*, 1995a; Rocha *et al.*, 2001; Vieira *et al.*, 2003) demonstrando que a prevalência da infecção vem se espalhando nos rebanhos bovinos do estado e do país. No caso da BVD, a prevalência de 82,35% encontrada nas propriedades estudadas foi semelhante ao encontrado em outros países (Riedemann *et al.*, 1996; Luzzago *et al.*, 1999; Mockeliuniene *et al.*, 2004). Em relação ao Brasil, o percentual encontrado no presente estudo concorda com Guimarães *et al.* (2000) e Dias e Samara (2003) para outros Estados e Krahl *et al.* (1997) e Poletto *et al.* (2004) no Rio Grande do Sul. Os resultados do presente estudo mostram que a infecção está amplamente disseminada na região estudada.

Os testes de soroneutralização (SN) e ensaio imuno-enzimático (EIE) realizados por diferentes autores atestam que estes apresentam sensibilidade e especificidade semelhantes (Perrin *et al.*, 1993; Médici *et al.*, 2000; Kunrath *et al.*, 2004). No presente estudo, os soros foram analisados somente pela SN com um período de incubação vírus-soro de uma hora. O aumento do tempo de incubação aumenta a sensibilidade do teste, podendo-se obter um número maior de resultados positivos. Trabalho realizado por Vieira *et al.*, 2003 demonstraram que amostras de soro que apresentaram resultados discrepantes no EIE e SN foram analisadas utilizando-se duas, quatro e vinte e quatro horas de incubação vírus-soro e permitiram observar um aumento na sensibilidade do teste com o aumento do período de incubação, mostrando assim, a utilização de maior período de incubação para o diagnóstico sorológico.

Os resultados referentes à faixa etária indica que estatisticamente a idade não foi fator de risco para as infecções, embora biologicamente possa ser explicado. É razoável supor que quanto maior a idade do animal, maiores são as chances de ele se expor ao agente. Como mostram as Tabelas 3 e 4, existe uma frequência mais alta (mesmo mínima) de animais soropositivos nos mais jovens e, à medida que vão adquirindo mais idade, vão convivendo com outros animais que podem estar infectados e então, vão naturalmente se infectando e assim adquirindo as doenças. Embora a frequência de animais soropositivos esteja nos mais jovens, é de se esperar que animais adultos apresentem também uma frequência de soropositividade, pois animais mais velhos têm maiores chances de se expor ao agente, principalmente quando estes entram na idade reprodutiva.

A soropositividade para BHV em fêmeas que abortaram (28,20%) foi semelhante à de fêmeas que não abortaram (29,28%). Da mesma forma, fêmeas que abortaram (61,53%) tiveram soropositividade para BVDV semelhante a de fêmeas que não abortaram (66,19%), mostrando que o aborto não representa um fator de risco. Talvez isto possa ser explicado pelo pequeno número de ocorrências de aborto (39) dentro de um grupo grande de animais susceptíveis (1734), de um total de 675 (5,78%) fêmeas aptas a parir não condizendo com a realidade do Estado.

Com relação ao tipo de ordenha que se utiliza nas propriedades, esta não foi considerada como fator de risco para BHV, mas apontou esta variável associada à soropositividade para BVD. O uso de ordenha mecânica em sala de ordenha resulta em um risco 2,04 vezes maior de apresentar a doença do que se for usado a ordenha manual ou mecânica ao pé. Embora não tenha sido citado na literatura como fator de risco para a infecção por BVDV, esta pode ser considerada, já que poderia propiciar o aglomeramento de animais, aumentando assim a probabilidade de transmissão dos vírus.

Propriedades que utilizavam somente o touro como forma de reprodução tiveram o touro como fator de risco para BVD, o que corrobora com Fray *et al.* (2000). Isto significou uma chance 1,31 vezes maior de ter a doença comparado ao uso associado à inseminação artificial (IA). Touros infectados que fazem cobertura natural, são um fator de risco, dependente da eliminação do vírus ou não no sêmen, no momento da monta, e do número de fêmeas cobertas. Em propriedades que utilizavam somente IA, esta mostrou ser um fator de risco para BHV, o que concorda com Thibier *et al.* (2000). Isto pode ter ocorrido pelo fato de que a maioria das propriedades,

independente de utilizar ou não a IA, mostrou coeficientes elevados de positividade, demonstrando que o sêmen utilizado na IA pode estar contaminado. Contudo, a utilização de IA com sêmen sabidamente livre de vírus, pode ser considerada um fator de controle destas infecções.

O contato de bovinos com ovinos, mostrou ser um fator de risco para BVD; propriedades que criam ovinos têm um risco 1,48 vezes maior de apresentar a doença do que propriedades que não criam ovinos. Os ovinos são susceptíveis à infecção, tanto natural como experimental, com o BVDV. É possível que os ovinos tenham um importante papel na epidemiologia das infecções pelo BVDV (Celedón *et al.*, 2001; Vogel *et al.*, 2001; Pescador *et al.*, 2004).

No presente estudo, a ausência de “assistência veterinária” foi considerada como fator de risco para BVDV, mas não o foi para BHV. Propriedades que não tiveram assistência veterinária, apresentam um risco 2,17 vezes maior de apresentar o BVDV do que propriedades que tiveram assistência veterinária; embora veterinários possam ser capazes de transmitir o BHV e o BVDV entre os animais, através de fluídos nasais e genitais contaminados, os quais podem ficar impregnados nas roupas e calçados (Wentink *et al.*, 1993).

Os resultados referentes à utilização de piquetes separados para fêmeas nas fases de parto e/ou pós-parto mostraram que, a separação de fêmeas aumenta o risco 1,49 vezes de infecção com BVDV. O esperado era que a separação dos animais fosse um fator de proteção para a infecção, já que nesta fase poderiam reativar e excretar o vírus, devido ao estresse. A separação, neste caso, impediria a disseminação para o restante do rebanho.

Em relação ao aluguel de pasto, este não foi considerado fator de risco para as infecções pelo BVDV e BHV. Tal fato pode ser justificado já que, alugando o pasto, propicia-se uma melhor distribuição dos animais, diminuindo a concentração dos mesmos e assim reduzindo a probabilidade de transmissão dos vírus.

É importante ressaltar que a pesquisa sorológica demonstrou a prevalência atual das infecções pelo BHV e pelo BVDV nos rebanhos bovinos da região, mostrando que estas estão disseminadas, conforme os índices observados. E, diferentemente de infecções que cursam de forma aguda, o BHV por ser um vírus de infecção latente e o BVDV caracterizar-se principalmente pela presença de animais persistentemente infectados (PI) no rebanho, a soropositividade para o BHV e para o BVDV representa a presença do animal portador e potenciais disseminadores dos vírus

no rebanho por toda a vida. Portanto, no geral, o estudo realizado mostrou que o BHV e o BVDV consistem em mais um problema sanitário com o qual os produtores têm de conviver.

Em consequência da latência do BHV, da presença de animais PI pelo BVDV no rebanho e desta alta prevalência, torna-se importante alertar sobre mecanismos para o controle destas doenças. Se a prevenção de novas infecções for combinada com a remoção gradual de animais infectados, a utilização de vacinas marcadas, que permitem a diferenciação entre animais vacinados e infectados, parecem ser as mais indicadas, principalmente para uso em touros de centrais de inseminação artificial e em programas de erradicação do BHV (Rocha *et al.*, 2001). É importante que continuem sendo utilizadas algumas medidas já adotadas, como a utilização de sêmen livre de BHV e BVDV, realização de quarentena ao ingresso de bovinos na propriedade e, exames sorológicos anuais, buscando impedir a reintrodução destas doenças no rebanho (Mettenleiter, 1996; Roehle *et al.*, 1998).

Os dados de prevalência aqui obtidos são preocupantes, já que a maioria das propriedades estudadas não adotam a vacinação em seu manejo sanitário e, portanto, os anticorpos encontrados, não são de origem vacinal. Os resultados obtidos demonstram que pela avaliação sorológica dos níveis de anticorpos existentes nos animais, poderá não garantir a eles o “status” imunológico de proteção e que a imunidade do rebanho obtida pela infecção poderia ser reforçada pela vacinação. Considerando que o “status” imunológico dos rebanhos é muito heterogêneo em termos de presença de anticorpos é muito importante pensar no tipo de vacina que será utilizada, considerando que esses rebanhos são sorologicamente positivos. Vacinas com antígenos expostos serão prejudicadas pela presença de anticorpos, portanto as vacinas oleosas seriam as mais adequadas já que os anticorpos pré-existentes não vão interferir com a resposta imunológica pois o óleo está protegendo o vírus.

Por fim, os altos índices de prevalência encontrados indicam que devem ser implementadas medidas para controle e prevenção das doenças ocasionadas pelo BHV e BVDV.

6. CONCLUSÕES

1. A prevalência das infecções pelo Herpesvírus Bovino Tipo-1 (BHV-1), Herpesvírus Bovino Tipo-5 (BHV-5) e o vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV) nas 85 propriedades dos municípios de Santa Vitória do Palmar e Chuí no Estado do Rio Grande do Sul foram elevadas.
2. O BHV e o BVDV estavam presentes em mais da metade das propriedades testadas neste experimento, 84,70% e 82,35% respectivamente.
3. Pela distribuição dos anticorpos contra BHV e BVDV nos municípios e propriedades, pode-se afirmar que os vírus estão disseminados no rebanho bovino do Estado do Rio Grande do Sul.
4. A maior frequência de positivos para BHV e BVDV em relação ao sexo foi encontrada entre os machos, 31,95% e 71,60% respectivamente e, em relação à faixa etária, foi encontrada uma frequência de 40,00% de positivos para BHV em animais com idade superior a 24 meses e, 78,26% de positivos para BVDV em animais com idade entre 7 e 12 meses.
5. Baseando-se nestes dados de prevalência e, sabendo, da latência do BHV e da presença de animais PI no rebanho bovino do Rio Grande do Sul, recomenda-se que sejam tomadas medidas de prevenção e controle contra as infecções pelo BHV e BVDV.

7. ANEXO

FÓRMULA DE SOLUÇÕES E MEIOS DE CULTIVO

PBS SEGUNDO DULBECCO

H ₂ O desmineralizada	1000ml
NaCl	8g
KCl	0,2g
Na ₂ HPO ₄ 7H ₂ O	1,15g
KH ₂ PO ₄	0,2g

TRIPSINA VERSENE

Tripsina	0,7g
NaCl	8g
KCl	0,4g
EDTA-Versene	0,2g
NaHCO ₃	0,35g
Glicose	1g
Vermelho de Fenol 1%	1,2ml
H ₂ O desmineralizada	1000ml
pH final 7,6-7,8	

TAMPÃO TRIS (para MEM-E)

TRIS (Trishidroximetilaminometano)	24,4g
H ₂ O desmineralizada	1000ml
pH final 7,2 a 7,4	

MEM-E (Meio Mínimo Essencial de EAGLE) (Modificado)

MEM (CULTILAB)	9,77g
Tampão Tris	50ml
H ₂ O desmineralizada	950ml
pH final 7,2 a 7,3	

ANTIBIÓTICOS PARA MEM-E**PENICILINA (Frasco c/ 1.000,000U.I.)**

- Reconstituir com 5 ml de água desmineralizada estéril.
- Utilizar 1 ml por litro de meio.

ESTREPTOMICINA (Frasco c/ 1.000,000 mg)

- Reconstituir com 5 ml de água desmineralizada estéril.
- Utilizar 1 ml por litro de meio.

FUNGIZONA (Frasco com 50 mg)

- Suspender com 20 ml de água desmineralizada estéril.
- Utilizar 1 ml por litro de meio.

ENROFLOXACINA (Baytril)

- Reconstituir com 100 ml de água desmineralizada estéril.
- Utilizar 0,1 ml (5mg) por litro de meio antes da filtração.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. ; POBER, J. S. **Imunologia Celular e Molecular**. Livraria e Editora Revinter Ltda, 1994. 439p.
- ACKERMANN, M.; PETERHANS, E.; WYLER, R. DNA of bovine herpesvirus type 1 in the trigeminal ganglia during latently infected calves. **American Journal. Veterinary Research**, v.43, n. 1, p.36-43, 1982.
- ACKERMANN, M.; WYLER, R. The DNA of an IPV strain of bovid herpesvirus 1 in sacral ganglia during latency after intravaginal infection. **Veterinary Microbiology**, v. 9, p.53–63, 1984.
- ACKERMANN, M.; BELAK, S.; BITSCH, V.; EDWARDS, S.; MOUSSA, A.; ROCKBORN, G.; THIRY, E. Round table on infectious rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis virus infection diagnosis and control. **Veterinary Microbiology**, v. 23, p. 361-370, 1990.
- ALFIERI, A.A. Rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR): Epidemiologia, imunologia e imunoprofilaxia. **Atualização Técnica**, n.46, 1999.
- ALICE, J. F. Isolamento do vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), no Brasil. **Revista Brasileira de Biologia**, v.38, n.4, p.919–920, 1978.
- ALVES, D.; TREMBLAY, R.; GODKIN, A.; ANDERSON, N.; CARMAN, S.; McEWEN, B.; HAZLETT, M. Update on bovine virus diarrhea in Ontario. **Canadian Veterinary Journal**, v. 37, p.177, 1996.
- ANDRADE, M.A.; FERNANDEZ, C.L.; LORA, O.C.A. Investigación de anticuerpos contra rinotraqueitis infecciosa de los bovinos en el ganado nativo del Peru. **Revista del Centro Nacional de Patología Animal**, v.7, n.11, p.51-56, 1967.
- ANDREWES, S. C.; PEREIRA, H. G.; WILDY, P. **Viruses of vertebrates**. Fourth edition, London, Ballière Tindal. 1978a. Cap. 15, p. 312-330.

- ANDREWES, S. C.; PEREIRA, H. G.; WILDY, P. **Viruses of vertebrates**. Fourth edition, London, Ballière Tindal. 1978b. Cap. 4, p. 67-118: Togaviridae
- ANÔNIMO. ELISA competición fase sólida. **Centro Panamericano de Febre Aftosa y Zoonosis**. Rio de Janeiro, p. 15, 1998.
- BABIUK, L.A.; VAN DRUNEN LITTEL-VAN DER HURK, S.; TIKOO, S.K. Immunology of bovine herpesvirus 1 infection. **Veterinary Microbiology**. v.53, p.31-42, 1996.
- BAGUST, T. J.; CLARK, L. Pathogenesis of meningoencephalitis produced in calves by infectious bovine rhinotracheitis herpesvirus. **Journal of Comparative Pathology**, London, v. 82, p.375-383, 1972.
- BAKER, J.C. Bovine Viral Diarrhoea Virus: A Review. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 190, n.11, p. 1449-1457, 1987.
- BANCHEREAU, J.; BRIERE, F.; CAUX, C.; DAVOUST, J.; LEBECQUE, S.; LIU, Y.J.; PULENDRAN, B. & PALUCKA, K. Immunobiology of dendritic cells. **Annu. Rev. Immunol.**, v.18, p.767-811, 2000.
- BARENFUS, M.; DELLI QUADRI, C. A.; McINTIRE, R. W.; SCHROEDER, R. J. Isolation of infectious bovine rhinotracheitis virus from calves with meningoencephalitis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 143, p. 725-728, 1963.
- BARLOW, R.M.; NETTLETON, P.F.; GARDINER, A.C.; GREIG, A.; CAMPBELL, J.R. & BONN, J.M. Persistent bovine virus diarrhoea virus infection in a bull. **Veterinary Record**, v. 118, p.321-324, 1986.
- BARROS FILHO, I.R.; KRÜGER, E.R.; SOUZA, J.F.; RICKLI JÚNIOR, W. Incidência de bovinos soropositivos para o vírus da rinotraqueíte bovina no município de Palotina-PR. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 25, 1997, Gramado. **Anais...** Gramado, RS: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 1997. INF 062, p. 171.
- BELKNAP, E. B.; COLLINS, J. K.; AYERS, V. K.; SCHULTHEISS, P. C. Experimental infection of neonatal calves with neurovirulent bovine herpesvirus type 1.3. **Veterinary Pathology**, v. 31, p. 358-365, 1994.
- BLACK, J.W. Use of the microtiter serum neutralization test for the diagnosis of IBR, BVD, and other bovine and porcine viral diseases. In: ANNUAL MEETING US LIVESTOCK SANITARY ASSOCIATION, 74th, 1970. **Proceedings...** Livestock Sanitary Association, 1970. p. 515-521.
- BLOOD, D.C.; HENDERSON, J.A.; RADOSTITS, O.M. Infections bovine rhinotracheitis. In. **Veterinary Medicine**. Fifth edition, London, Baillière Tindall, 1979. p.666.

- BOELAERT, F.; BIRONT, P.; SOUMARE, B.; DISPAS, M.; VANOPDENBOSCH, E.; VERMEERSCH, J.P.; RASKIN, A.; DUFÉY, J.; BERKVENS, D.; KERKHOFS, P. Prevalence of bovine herpesvirus-1 in the Belgian cattle population. **Preventive Veterinary Medicine**, v.45, n. 3-4, p. 285-295, 2000.
- BOLIN, S.R.; McCLURKIN, A.W.; CUTLIP, R.C. & CORIA, M.F. Severe clinical disease induced in cattle persistently infected with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus by superinfection with cytopathic bovine viral diarrhoea virus. **American Journal Veterinary Research**, v.46, p. 573-578, 1985a.
- BOLIN, S.R.; McCLURKIN, A.W.; CUTLIP, R.C. & CORIA, M.F. Response of cattle persistently infected with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus to vaccination for bovine viral diarrhoea and to subsequent challenge exposure with cytopathic bovine viral diarrhoea virus. **American Journal Veterinary Research**, v.46, n.12, p. 2467-2470, 1985b
- BOLIN, S.R.; McCLURKIN, A.W. & CORIA, M.F. Frequency of persistent bovine viral diarrhoea virus infection in selected cattle herds. **American Journal Veterinary Research**, v.46, n.11, p. 2385-2387, 1985c.
- BOLIN, S.R.; McCLURKIN, A.W. & CORIA, M.F. Effects of bovine viral diarrhoea virus on percentages and absolute numbers of circulating B and T lymphocytes in cattle herds. **American Journal Veterinary Research**, v.46, p. 884-886, 1985d.
- BOLIN, S.R. & RIDPATH, J.F. Specificity of neutralizing and precipitating antibodies induced in healthy calves by monovalent modified-live bovine viral diarrhoea virus vaccines. **American Journal Veterinary Research**, v.50, n.6, 1989.
- BOLIN, S.R. & RIDPATH, J.F. Range of viral neutralizing activity and molecular specificity of antibodies induced in cattle by inactivated bovine viral diarrhoea virus vaccines. **American Journal Veterinary Research**, v.51, n.5, 1990.
- BOLIN, S.R. & RIDPATH, J.F. Differences in virulence between two noncytopathic bovine viral diarrhoea viruses in calves. **American Journal Veterinary Research**, v.53, n.11, p. 2157-2163, 1992.
- BOLIN, S.R. Control of bovine viral diarrhoea infection by use of vaccination. In: Backer, J.C.; Houe, H. (Eds.), *Bovine Viral Diarrhoea Virus*. Vet. Clin. North Am.: Food Anim. Pract. 11pp. 615-627, 1995.
- BOOTH, P.J.; STEVENS, D.A., COLLINS, M.E.; BROWNLIE, J. Detection of bovine viral diarrhoea virus antigen and RNA in oviduct and granulosa cells of persistently infected cattle. **J. Reprod. Fertil.**, v. 105, p. 17-24, 1995.
- BOTTON, S.A.; GIL, L.H.V.G.; SILVA, A.M.; FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; PITUCO, E.M.; ROEHE, P.M.; MOOJEN, V.; WENDELSTEIN, A.C. Caracterização preliminar de amostras do vírus da diarréia viral bovina (BVDV) isoladas no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 18, p. 84-92, 1998a.

- BOTTON, S.A.; SILVA, A.M.; BRUM, M.C.S.; WEIBLEN, R.; FLORES, E.F. Antigenic characterization of Brazilian isolates of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) with monoclonal antibodies and by cross-neutralization. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 31, p. 1429-1438, 1998b.
- BOULANGER, D.; WAXWEILER, S.; KARELLE, L.; LONCAR, M.; MIGNON, B.; DUBUISSON, J.; THIRY, E. & PASTORET, P. Characterization of monoclonal antibodies to bovine viral diarrhoea virus: evidence of a neutralizing activity against gp48 in the presence of goat anti-mouse immunoglobulin serum. **Journal of General Virology**, v.72, p. 1195-1198, 1991.
- BRACKENBURY, L.S.; CARR, B.V.; CHARLESTON, B. Aspects of the innate and adaptative immune responses to acute infections with BVDV. **Veterinary Microbiology**, v.96, p.337-344, 2003.
- BRITO, W.M.E.D.; SOUZA, W.J.; VIEIRA, S.; LINHARES, D.C.L.; BARBOSA, A.C.V.C.; ALFAIA, B.T. Serological study on bovine viral diarrhoea in non vaccinated dairy herds with reproductive disorders from Goiás. **Journal of the Brazilian Society for Virology**, v.7, n.1, p.144, 2002. In: ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA, XIII, 2002, Águas de Lindóia. **Resumos...** Águas de Lindóia, SP: Sociedade Brasileira de Virologia, 2002. p. 144.
- BROCK, K.V. The persistence of bovine viral diarrhoea virus. **Biologicals**, v. 31, p.133-135, 2003.
- BROWN, T.T.; deLAHUNTA, A.; SCOTT, F.W.; KAHRS, R.F.; McENTEE, K. & GILLESPIE, J.H. Virus induced congenital anomalies of the bovine fetus. II. Histopathology of cerebellar degeneration (hypoplasia) induced by the virus of bovine viral diarrhoea-mucosal disease. **Cornell Veterinary**, v.63, p. 561-578, 1973.
- BROWN, T.T.; SCHULTZ, R.D.; DUCAN, J.R. & BISTNER, S.I. Serological response of the bovine fetus to bovine viral diarrhoea virus. **Infec. And Imun.**, v.25, n.1, p. 93-97, 1979.
- BROWNLIE, J.; CLARK, M.C. & HOWARD, C.J. Experimental production of fatal mucosal disease in cattle. **Veterinary Record**, v.114, p. 535-536, 1984.
- BROWNLIE, J. Clinical aspects of bovine viral diarrhoea/mucosal disease complex in cattle. **In Practice**, v.7, p.159-202, 1985.
- BROWNLIE, J.; CLARK, M.C. & POCOCCO, D.H. Pathogenesis and Epidemiology of Bovine Viral Diarrhoea Virus Infection of Cattle. **Ann. Rech. Vet.**, v.18, p.157-166, 1987.
- BROWNLIE, J.; CLARK, M.C. & HOWARD, C.J. Experimental infection of cattle in early pregnancy with a cytopathic strain of bovine virus diarrhoea virus. **Research Veterinary Science**, v.46, n.3, p. 307-311, 1989.
- BROWNLIE, J. The pathogenesis of bovine viral diarrhoea virus infections. **Rev. Sci. Tech.**, Office International des Epizooties, v.9, p.43-59, 1990.

- BROWNLIE, J.; CLARKE, M.C, HOOPER, L.B.; BELL, G.D. Protection of the bovine foetus from bovine viral diarrhoea virus by means of a new inactivated vaccine. **Veterinary Science**, v. 137, p. 58-62, 1995.
- BRUSCHKE, C. J. M.; WEERDMEESTER, K.; VAN OIRSCHOT, J. T. & VAN RIJN, P. A. Distribution of bovine virus diarrhoea virus in tissues and white blood cells of cattle during acute infection. **Veterinary Microbiology**, v.64, p.23-32, 1998.
- BUTEL, J. S. **Microbiología Médica de Jawetz**. Editorial El Manual Moderno. S.A. de C.V. México, D.F. 1992. cap. 35, p. 346-364.
- CALDERON, S.J.J.; CORREA, S.V.M.; CORREA, S.J.C.; ISLAS, A.A. Seroprevalence of and risk factors for infectious bovine rhinotracheitis in beef cattle herds of Yucatan, Mexico. **Preventive Veterinary Medicine**, v.57, p. 199-208, 2003.
- CANABARRO, T. F.; MORAES, M. P.; REBELATTO, M.C.; CANCIAN, M.D.; WEIBLEN, R. Vulvovaginitis due to bovine herpesvirus. In: **Virologica 93**, Porto Alegre- RS. **Programas e Resumos**. p. 248. 1993.
- CANAL, C.W.; STRASSER, M.; HERTIG, C.; MASUDA, A.; PETERHANS, E. Detection of antibodies to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and characterization of genomes of BVDV from Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 63, n. 2-4, p. 85-97, 1998.
- CARMAN, S.; VAN DREUMEL, T.; RIDPATH, J.; HAZLETT, M.; ALVES, D.; DUBOVI, E.J.; TREMBLAY, R.; BOLIN, S.R; GODKIN. A.; ANDERSON, N. Severe acute bovine viral diarrhoea (BVD) in Ontario, 1993-1995. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 10, p. 27-35, 1998.
- CARRILLO, B. J.; AMBROGÍ, A.; SCHUDEL A. A.; VASQUEZ, M.; DAHME, E.; POSPISCHIL, A. Meningoencephalitis caused by IBR virus in calves in Argentina. **Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B.**, v. 30, p. 327-332, 1983.
- CARRUTHERS, T.D.; PETRIE, L. A survey of vaccination practices against bovine viral diarrhoea (BVD) virus in Saskatchewan dairy herds. **Canadian Veterinary Journal**, v. 37, p. 621-622, 1996.
- CASARO, A.P.E.; KENDRICK, J.W. & KENNEDY, P.C. Response of the bovine fetus to bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus. **American Journal Veterinary Research**, v.32, p.1543-1562, 1971.
- CASCIO, K.E.; BELKNAP, E.B.; SCHULTHESIS, P.C.; AMES, A.D.; COLLINS, J.K. Encephalitis induced by bovine herpesvirus 5 and protection prior vaccination on infection with bovine herpesvirus 1. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 11, p. 134-139. 1999.

- CASTRO, R.S.; RABEL, S.S.A.; NASCIMENTO, S.A.; FRUTUOSO, E.M.; SILVA, F.A.G HVB-1 e VDBV/EM em surtos de broncopneumonia na microregião de Garanhuns em Pernambuco. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, XXIII, 1994, Olinda. **Resumos...** Olinda, PE: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 1994. p. 251.
- CAVIRANI, S.; LUINI, M.; ALLEGRI, G. A 10-year serological survey for Bovine Herpesvirus 1 (BHV-1), Bovine Diarrhea Virus (BVDV) and Bovine Herpesvirus 4 (BHV-4) in dairy herds with reproductive disorders. **Selezione Veterinaria**. v. 33, n. 5, p. 459-467, 1992. Resumo publicado em *Veterinary Bulletin*, v. 62, n. 10, p.1068, 1992.
- CELEDÓN, M.O. Nuevos antecedentes en el comportamiento del virus de la diarrea viral bovina. Situación en Chile. **Avances en Ciencias Veterinarias**, v.8, n.1, p.11-17, 1993.
- CELEDÓN, M.O.; VARGAS, C.; PALACIOS, L.; IBARRA, L.; ROCO, L.; CARBONELL, J.; SANTIBANEZ, M.; PIZARRO, J.; BERRIOS, P. Virus Diarrea Viral Bovina. Prospección en bovinos de la región metropolitana, Chile. In: PANVET, XV, 1996, Campo Grande. **Resumos...** Campo Grande, MT: Panamerican Association of Veterinary Sciences, 1996. n. 168, p. 294.
- CELEDÓN, M.; SANDOVAL, A.; DROGUETT, J.; CALFIO, R.; PIZARRO, J.; NAVARRO, C. Pesquisa de anticuerpos seroneutralizantes para pestivirus y herpesvirus en ovinos, caprinos y camélidos sudamericanos de Chile. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v.33, n.2, p. 0-0, 2001.
- CELLA, M.; SALIO, M.Y.; SAKAKIBARA, H.; LANGEN, I.; JULKUNEN, I.; LANZAVECCHIA, A. Maturation, activation and protection of dendritic cells induced by double-stranded RNA. **Journal of Experimental Medicine**, v.189, p.821-829, 1999.
- CERQUEIRA, R.B.; CARMINATI, R.; SILVA, J.M.; SOARES, G.C.; MEYER, R.; SARDI, S. Serological survey for bovine herpesvirus 1 in cattle from different regions in the state of Bahia, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 37, n.6, p.1-8, 2000.
- CHARLESTON, B.; FRAY, M.D.; BAIGENT, S.; CARR, B.V.; MORRISON, W.I. Establishment of persistent infection with non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus in cattle is associated with a failure to induce type I interferon. **Journal of General Virology**, v.82, p.1893-1897, 2001.
- CHARLESTON, B.; BRACKENBURY, L.S.; CARR, B.V.; FRAY, M.D.; HOPE, J.C.; HOWARD, C.J.; MORRISON, W.I. Alpha/beta and gamma interferons are induced by infection with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus in vivo. **Journal of Virology**, v.76, p.923-927, 2002.

- CHO, H.J.; BOHAC, J.G. Sensitivity and specificity of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of infectious bovine rhinotracheitis viral antibody in cattle. **Canadian Journal of the Comparative Medicine**, v. 49, p. 189-194, 1985.
- COLLEN, T.; MORRISON, W.I. CD4+ T-cell responses to bovine viral diarrhea virus in cattle. **Virus Research**, v.67, p.67-80, 2000.
- COLLETT, M.S.; LARSON, R.; BELZER, S.K. & RETZEL, E. Proteins encoded by bovine viral diarrhea virus: the genome organization of a pestivirus. **Virology**, v.165, p.200-208, 1988.
- COLLETT, M.S.; WISKERCHEN, M.; WELNIAK, E. & BELZER, S.K. Bovine Viral Diarrhea virus genomic organization. **Archives of Virology**, [suppl.3], p. 19-27, 1991.
- COLLINS, J. K.; BULLA, G. A.; RIEGEL, C.A.; BUTCHER, A. C. A single dilution enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative detection of antibodies to bovine herpesvirus type 1. **Veterinary Microbiology**, v.10, p. 133-147, 1985.
- COLODEL, E.M.; NAKAZATO, L.; WEIBLEN, R.; MELLO, R.M.; SILVA, R.R.P.; SOUZA, M.A.; FILHO, J.A.O.; CARON, L. Meningoencefalite necrosante em bovinos causada por herpesvírus bovino no Estado de Mato Grosso, Brasil. **Ciência Rural**, v.32, n.2, p. 293-298, 2002.
- CORAPI, W.V.; DONIS, R.O. & DUBOVI, E.J. Monoclonal Antibody Analyses of Cytopathic and Noncytopathic Viruses from Fatal Bovine Viral Diarrhea Virus Infections. **Journal of Virology**, v.62, n.8, p. 2823-2827, 1988.
- CORAPI, W.V.; FRENCH, T.W. & DUBOVI, E.J. Severe Thrombocytopenia in Young Calves Experimentally Infected with Noncytopathic Bovine Viral Diarrhea Virus. **Journal of Virology**, v.63, n.9, p. 3934-3943, 1989.
- CORAPI, W.V.; ELLIOTT, R.D.; FRENCH, T.W.; ARTHUR, D.G.; BEZEK, D.M. & DUBOVI, E.J. Thrombocytopenia and hemorrhages in veal calves infected with bovine viral diarrhea virus. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.196, n.4, p. 590-596, 1990a.
- 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 diarrhea virus. **American Journal of Veterinary Research**, v.51, p. 1388-1394, 1990b.
- CORIA, M.F. & McCLURKIN, A.W. Specific immune tolerance in an apparently healthy bull persistently infected with BVD virus. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.172, p. 449-451, 1978.
- CORREA, W.M.; NETO, L.Z.; BARROS, H.M. & GOTTSCHALK, A.F. Nota clínico-patológica de uma enfermidade das mucosas em São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.35, n.4, p. 141-151, 1968.

- CORTESE, V.S.; WHITTAKER, R.; ELLIS, J.; RIDPATH, J.F.; BOLIN, S.R. Specificity and duration of neutralizing antibodies induced in healthy cattle after administration of a modified-live virus vaccine against bovine viral diarrhea. **American Journal Veterinary Research**, v. 59, p. 848-850, 1998.
- CORTEZ, A.; HEINEMANN, M.B.; ALFIERI, A.A.; MÉDICI, K.C.; ALFIERI, A.F.; OLIVEIRA, D.B.; MEYER, A.D.; SOARES, R.M.; SAKAMOTO, S.M.; AMARAL, R.; BARUSELLI, P.S.; FUJII, T.; RICHTZENHAIN, L.J. Comparação das técnicas de ELISA indireto e de soroneutralização na detecção de anticorpos contra o BHV-1 em amostras de soro bubalino (*Bubalus bubalis*). **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v.38, n.3, p. 146-148, 2001.
- CRANDELL, R. A.; CHEATHAM, W. J.; MAURER, F. D. Infectious bovine rhinotracheitis - the occurrence of intranuclear inclusion bodies in experimentally infected animals. **American Journal Veterinary Research**, v. 20, p. 505-509, 1959.
- DAWSON, P. S.; DARBYSHIRE, J. H.; LOOSMORE, R. M.; PATERSON, A.B.; FAULL, W.B. Infectious bovine rhinotracheitis (IBR). A clinical condition of cattle occurring in the United Kingdom. **Veterinary Record**, v.74, p. 1379-1383, 1962.
- DEREGT, D.; CHO, H. J.; KOSUB, C.A. A comparative evaluation of two sensitive serum neutralization tests for bovine herpesvirus 1 antibodies. **Canadian Journal Veterinary Research**, v. 57, p. 56-59, 1993.
- DEREGT, D.; VAN RIJN, P.A.; WIENS, T.Y.; VAN DEN HURK, J. Monoclonal antibodies to the E2 protein of a new genotype (type 2) of bovine viral diarrhea virus define three antigenic domains involved in neutralization. **Virus Research**, v. 57, p. 171-181, 1998.
- DE STEFANO, E.; PASSOS, E.C.; MAURIDIS, S.C.; KANETO, C.N. & PITUCO, E.M. Pesquisa de anticorpos para rinotraqueíte infecciosa bovina/vulvovaginite pustular infecciosa (IBR/IPV) em rebanhos leiteiros da região de Marília-SP. **Virológica 93**, 1993, Porto Alegre, p. 256 (Resumo).
- DEVIREDDY, L.R.; JONES, C. Alternative splicing of the latency-related transcript of bovine herpesvirus 1 yields was containing unique open reading frames. **Journal of Virology**, v.72, p.7294-7301, 1998.
- DIAS, F.C.; SAMARA, S.I. Detecção de anticorpos contra o vírus da diarréia viral bovina no soro sanguíneo, no leite individual e no leite de conjunto em tanque de expansão de rebanhos não vacinados. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.40, p.161-168, 2003.
- DIDERHOLM, H.; DINTER, Z. Interference between strains of bovine viral diarrhea virus and their capacity to suppress interferon of a heterologous virus. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v.121, p.976-980, 1966.

- D'OFFAY, J.M.; MOCK, R.E.; FULTON, R.W. Isolation and characterization of encephalitic bovine herpesvirus type 1 isolates from cattle in North America. **American Journal Veterinary Research**, v. 54, p. 534-538, 1993.
- DONE, J.T.; TERLECKI, S.; RICHARDSON, C.; HARKNESS, J.W.; SANDS, J.J.; PATTERSON, D.S.P.; SWEASEY, D.; SHAW, I.G.; WINKLER, C.E. & DUFFEL, S.J. Bovine virus diarrhea-mucosal disease virus: Pathogenicity for the fetal calf following maternal infection. **Veterinary Record**, v. 106, p.473-479, 1980.
- DONIS, R.O.; DUBOVI, E.J. Molecular specificity of the antibody responses of cattle naturally and experimentally infected with cytopathic and noncytopathic of bovine biotypes of bovine virus diarrhea-mucosal disease virus. **Virology**, v.158, p.168-173, 1987.
- DONIS, R.O.; CORAPI, W.V. & DUBOVI, E.J. Neutralizing monoclonal antibodies to bovine viral diarrhoea virus bind to the 56K to 58K glycoprotein. **Journal of General Virology**, v.69, p.77-86, 1988.
- DONIS, R.O. Molecular biology of bovine viral diarrhea virus and its interactions with the host. In: Baker, J.C., Houe, H. (Eds.), *Bovine Viral Diarrhea Virus*. Vet. Clin. North Am.: Food Anim. Pract. 11pp. p.393-424, 1995.
- DONIS, R.O. Biologia molecular del virus de Diarrea Virica Bovina. In: ENCONTRO INTERNACIONAL DE VIROLOGIA MOLECULAR VETERINÁRIA, 1996, Santa Maria. **Resumos...** Santa Maria, RS: Universidade Federal de Santa Maria, 1996. p.111-148.
- DONKERSGOED, J. V.; BABIUK, L. A. Diagnosis and managing the respiratory form of infectious bovine rhinotracheitis. **Veterinary Medicine**, v. 86, n. 1, p. 86-94, 1991.
- DUBOVI, E.J. Genetic Diversity & BVD virus. **Comp. Immun. Microb. Infec. Dis.**, v.15, n.3, p.155-162, 1992.
- DULBECO, R.; GINSBERG, H. S. **Microbiologia de Davis**. Harper & Row do Brasil. 1980. cap. 53, p. 1477-1486.
- DUHRAN, J.K.; HASSARD, L. E. Prevalence of antibodies to infectious bovine rhinotracheitis, parainfluenza 3, bovine respiratory syncytial, and bovine diarrhea viruses in cattle in Saskatchewan and Alberta. **Canadian Veterinary Journal Research**, v. 31, p. 815-820, 1991.
- EDWARDS, S.; WOOD, L.; HEWITT-TAYLOR, C.; DREW, T.W. Evidence for an immunocompromising effect of bovine pestivirus on bovid herpesvirus 1 vaccination. **Vet. Res. Commun.**, v.10, p.297-302, 1986.
- EDWARDS, S.; DREW, T.W. & BUSHNELL, S.E. Prevalence of bovine virus diarrhoea virus viraemia. **Veterinary Record**, v.57, n.17, p. 71, 1987a.

- EDWARDS, S.; GITAO, G.C. Highly sensitive antigen detection procedures for the diagnosis of infectious bovine rhinotracheitis: amplified ELISA and reverse passive haemagglutination. **Veterinary Microbiology**, v. 13, p. 135-141, 1987b.
- ELIAS, F.; SCHILD, A.L.; RIET-CORREA, F. Meningoencefalite e encefalomalácia por Herpesvírus Bovino-5: distribuição das lesões no sistema nervoso central de bovinos naturalmente infectados. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.24, n.3, p. 123-131, 2004.
- FELDENS, O. **Avaliação do efeito paraimune de extratos vegetais (*Nicotiana glauca* e *Chrysanthemum vulgare*) em bovinos vacinados contra o herpesvírus bovino tipo 5 (HVB-5)**. Pelotas, 2000. 49f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Veterinária, UFPel, 2000.
- FENNER, F. J.; GIBBS, E. P. J.; MURPHY, F. A.; ROTT, R.; STUDERT, M. J.; WHITE, D. O. **Veterinary Virology**, 2ª ed. San Diego: Academic Press, 1993a. 666p.
- FENNER, F. J.; GIBBS, E. P. J.; MURPHY, F. A.; ROTT, R.; STUDERT, M. J.; WHITE, D. O. **Veterinary Virology**, 2ª ed. San Diego: Academic Press, 1993b. Cap.1, p.3-17. cap 25, 441-456p.: Flaviviridae.
- FIGUEIREDO, H.C.P.; VIEIRA, P.R.; LAGE, A.P.; LEITE, R.C. Prevalência de Anticorpos contra o vírus da Diarréia Bovina a vírus em Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 21, n.4, p.11-15, 1997.
- FLORES, E. F. Herpesvírus bovino tipo 1 (HVB-1). In: ENCONTRO INTERNACIONAL DE VIROLOGIA MOLECULAR VETERINÁRIA, 1996, Santa Maria, RS: **Programa Organizado**, 1996. p. 149-156.
- FLORES, E. F.; SILVA, A. M.; WEIBLEN, R. Neuropatogenicidade do herpesvírus bovino tipo 5 (HVB-5). In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE HERPESVÍRUS BOVINO (TIPO 1 E 5) E VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA (BVDV), 1998, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria, RS, 1998. p. 127-136.
- FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; SCHERES, C.F.C.; GIL, L.H.V.G.; PILATI, C.; DRIEMEIER, D.; MOOJEN, V.; WENDELSTEIN, A.C. Identificação do vírus da Diarréia Viral Bovina tipo 2 (BVDV-2) no sul do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, n. 2, p.85-89, 2000a.
- FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; GIL, L.H.V.G.; TOBIAS, F.L.; LIMA, M.; GARCEZ, D.C.; BOTTON, S.A. Diversidade antigênica de amostras do vírus da diarréia viral bovina isoladas no Brasil: implicações para o diagnóstico e estratégias de imunização. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.52, n.1, p. 11-17, 2000b.

- FONDEVILA, N.A.; LAGER, A.; SADIR, A.M.; CARRILLO, B.J.; VILLAR, J.; ZURBRIGEN, M.; GONZALEZ, D.; IVANCOVICH, J.; SCHUDEL, A.A. Rinotraqueítis infecciosa bovina (HVB-1). III- Prevalência de anticuerpos en rodeos bovinos del país. **Revista de Investigacion Agropecuaria – INTA**, v. 16, p. 285-289, 1981.
- FORT, M.C.; IBARGUREN, C.; Busetti, M.R.; Esain, F; Perez, L.R. Prevalência de anticorpos contra el herpesvirus bovino-1 (BHV-1) en la población bovina de los departamentos de la provincia de La Pampa-Argentina, In: PANVET, XV, 1996, Campo Grande. **Resumos...** Campo Grande, MT: Panamerican Association of Veterinary Sciences, 1996. p.278.
- FRANCKI, R.I.B.; FAUQUET, C.M.; KNUDSON, D.L. & BROWN, F. Classification and Nomenclature of Viruses, Fifth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses. **Archives of Virology**, [suppl.2], p.228-229, 1991.
- FRAY, M.D.; PATON, D.J.; ALENIUS, S. The effects of bovine viral diarrhoea virus on cattle reproduction in relation to disease control. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p.615-627, 2000.
- FREY, H.R.; DEPNER, K.R.; GELFERT, C.C. & LIESS, B. BVD virus isolation techniques for routine use in cattle herds with or without previous BVD history. **Archives of Virology**, [suppl.3], p.257-260, 1991.
- GALARZA, J.M.; PERIOLO, O.H. Rinotraqueítis infecciosa bovina – prevalência en la provincia de Formosa mediante la prueba de inmunofluorescência indirecta. **Gaceta Veterinaria**, v.45, p. 1296-1300, 1983.
- GALVÃO, C.L.; DORIA, J.D., ALICE, F.J. Anticorpos neutralizantes para o vírus rinotraqueíte infecciosa dos bovinos, em bovinos do Brasil. **Boletim do Instituto Biológico da Bahia**, v.6, n.1, p. 15-25, 1962/1963.
- GALVÃO, C. L. Diagnóstico da infecção genital do herpesvírus bovino (HVB-1) pelos métodos de isolamento e IF Direta. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.38, p.92-94, 1985.
- GARDINER, M.R.; NAIRN, M.E. Meningoencephalitis of calves in Western Australia. **Australian Veterinary Journal**, v. 40, p.225-228, 1964.
- GEORGE, L. W. Understanding the encephalitis form of the infectious bovine rhinotracheitis. **Food Animal Practice**, p. 335-337, 1991.
- GIBBS, E. P.; RWEYEMAMU, M. M. Bovine herpesviruses. Part 1. Bovine herpesvirus 1. **Veterinary Bulletin**, v. 47, n. 5, p. 317-343, 1977.
- GIL, L.H.V.G. **Sequenciamento, análise filogenética e caracterização de polipeptídeos não- estruturais de amostras do vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV)**. Santa Maria, 1998. 69f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Veterinária, UFSM, 1998.

- GILLESPIE, J.H.; BAKER, J.A. & McENTEE, K. A cytopathogenic strains of virus diarrhea virus. **Cornell Veterinary**, v.50, p.73-79, 1960.
- GLEW, E.J.; CARR, B.V.; BRACKENBURY, L.S.; HOPE, J.C.; CHARLESTON, B.; HOWARD, C.J. Differential effects of bovine viral diarrhea virus on monocytes and dendritic cells. **Journal of General Virology**, v.84, p.1771-1780, 2003.
- GOMES, L.I.; ROCHA, M.A.; COSTA, E.A.; LOBATO, Z.I.P.; MENDES, L.C.N.; BORGES, A.S.; LEITE, R.C.; BARBOSA-STANCIOLI, E.F. Detecção de herpesvírus bovino 5 (BoHV-5) em bovinos do Sudeste Brasileiro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.54, n.2, p.1-5, 2002.
- GRAHAM, D.A.; MAWHINNEY, K.A.; McSHANE, J.; CONNOR, T.J.; ADAIR, B.M.; MERZA, M. Standardization of enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) for quantitative estimation of antibodies specific for infectious bovine rhinotracheitis virus, respiratory syncytial virus, parainfluenza-3 virus, and bovine viral diarrhea virus. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v.9, p. 24-31, 1997.
- GRAHN, T.C.; FAHNING, M.L. & ZEMJANIS, R. Nature of early reproductive failure caused by bovine viral diarrhea virus. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.185, n.4, p.429-432, 1984.
- GROOMS, D.L., BROCK, K.V., WARD, L.A. Detection of bovine viral diarrhea virus in the ovaries of cattle following immunization with a modified live bovine viral diarrhea virus vaccine. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 10, p. 130-134, 1998.
- GUIMARÃES, P.L.S.N.; CHAVES, N.S.T.; SILVA, L.A.F.; ACYPRESTE, C.S. Frequência de anticorpos contra o vírus da diarréia viral bovina em bovinos do entorno de Goiânia, em regime de criação semi-extensivo. **Ciência Animal Brasileira**, v.1, n.2, p. 137-142, 2000.
- GUY, S. J.; POTGIETER, L. N. D. Bovine herpesvirus-1 infection of cattle: Kinetics of antibody formation after intranasal exposure and abortion induced by the virus. **American Journal Veterinary Research**, v. 46, n. 4, p. 893-898, 1985.
- GUSTAFSON, D. P. Herpesvirus disease of mammals and birds: comparative aspects and diagnosis. In: **Comparative Diagnosis of Viral Disease**, Eds. Kurstak, E.; Kurstak, C.. New York, Academic Press. 1981.
- GRIFFITH, I.B.; GALLEGO, M.I.; VILLAMIL, L.C. Factores de infertilidad y pérdidas económicas en ganado de leche en Colômbia. **Informe ICA-ANALC**, Doc. 002-2-1924-27, 1982.
- HALFEN, D. C.; FERRARI, M. F. Infecções por herpesvírus bovino-1 em bovinos no Rio Grande do Sul. **Boletim do Laboratório Regional de Diagnóstico**, Pelotas-RS. Convênio Embrapa- UFPel. n. 14, p. 31-37, 1994.

- HALL, W. T. K.; SIMMONS, G. C.; FRENCH, E. L.; SNOWDON, W. A.; ASDELL, M. The pathogenesis of encephalitis caused by the infectious bovine rhinotracheitis virus. **Australian Veterinary Journal**, n. 42, p. 229-237, 1966.
- HAMERS, C.; DEHAN, P.; COUVREUR, B.; LETELLIER, C.; KERHOFS, P. PASTORET, P.P. Diversity among bovine pestiviruses. **The Veterinary Journal**, v. 161, p. 112-122, 2000.
- HAMERS, C.; DI VALENTIN, E. LECOMTE, C.; LAMBOT, M.; JORIS, E.; GENICOT, B.; PASTORET, P. P. Virus Neutralising Antibodies Against 22 Bovine Viral Diarrhoea Virus Isolates in Vaccinated Calves. **The Veterinary Journal**, v. 163, p. 61-67, 2002.
- HARKNESS, J.W.; SANDS, J.J. & RICHARDS, M.S. Serological studies of mucosal disease virus in England and Wales. **Research Veterinary Science**, v.24, p. 98-103, 1978.
- HARKNESS, J.W. & DUFFEL, S.J. Bovine Virus Diarrhoea-Mucosal Disease Infection in Cattle. **Veterinary Record**, n.17, p. 240-245, 1985.
- HEDGER, R. S.; HAMBLIN, C. Neutralizing antibodies to bovid herpesvirus 1 (Infectious Bovine Rhinotracheitis/Infectious Pustular Vulvo-Vaginitis) in African wildlife with special reference to the cape Buffalo (*Syncerus caffer*). **Journal of Comparative Pathology**, v. 88, p. 211-218, 1978.
- HEILEIN, A.; METZLER, A.E.; WEIBLEN, R.; BERRIOS, P.; SCHUDEL, A.A.; RODRIGUEZ, M. Molecular characterization of south american bovine herpesvirus-1 isolates with monoclonal antibodies and SDS-PAGE. **Journal of Veterinary Medicine B**, v. 40, p.125-130, 1993.
- HEINZ, F.X.; AUER, G.; STIASNY, K.; HOLZMANN, H.; MANDL, C.; GUIRAKHO, F. & KUNZ, C. The interactions of the flavivirus envelope proteins: implications for virus entry and release. **Archives of Virology**, [suppl.9], p.339-348, 1994.
- HIGGINS, R.J.; EDWARDS, S. Systemic neonatal infectious bovine rhinotracheitis virus infection. In Suceler Calves. **Veterinary Record**, v.119, n.8, p. 117-178, 1986.
- HILL, B. D.; HILL, M. W. M.; CHUNG, Y. S.; WHITTLE, R. J. Meningoencephalitis in calves due to bovine herpesvirus type 1 infection. **Australian Veterinary Journal**, n. 61, p. 242-243, 1984.
- HOCHSTEIN-MINTZEL, V.; REINHARDT, G.; RIEDEMANN, S.; NIEDDA, M. Serologia de rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR) em 21 predios de la Decima Region de Chile. **Archives of Medicine Veterinary Valdivia**, v. 18, p.53-56, 1986.

- HOFFMANN, V. L. **Avaliação da sensibilidade das técnicas de Soroneutralização e ELISA na detecção de anticorpos contra a rinotraqueíte infecciosa dos bovinos**. Pelotas- 1989. 93p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária - Sanidade Animal) - Faculdade de Veterinária, UFPel, 1989.
- HORZINEK, M.C. Non-arthropod-borne togaviruses. **Academic Press**, London, 1981.
- HOUE, H.; PEDERSEN, K.M. & MEYLING, A. The effect of bovine virus diarrhoea virus infection on conception rate. **Preventive Veterinary Medicine**, v.15, p. 117-123, 1993.
- HOUE, H. Epidemiology of bovine viral diarrhoea virus. **Vet. Clin. North America**, v. 11, p. 521-548, 1995.
- HOUSE, J.A.; BAKER, J.A. Bovine herpesvirus IBR-IPV. The antibody virus neutralization reaction. **Cornell Veterinary**, v.61, p. 320-335, 1971.
- HOWARD, C.J.; BROWNLIE, J. & THOMAS, L.H. Prevalence of bovine virus diarrhoea virus viraemia in cattle in the U.K. **Veterinary Record**, v.119, n.25/26, p.628-629, 1986.
- HOWARD, C.J.; BROWNLIE, J. & CLARKE, M.C. Comparison by the neutralisation assay of pairs of non-cytopathogenic and cytopathogenic strains of bovine virus diarrhoea virus isolated from cases of mucosal disease. **Veterinary Microbiology**, v.13, p.361-369, 1987.
- HOWARD, C.J.; CLARKE, M.C.; SOPP, P.; BROWNLIE, J. Immunity to bovine virus diarrhoea virus in calves: the role of different T-cell subpopulations analysed by specific depletion in vivo with monoclonal antibodies. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.32, p.303-314, 1992.
- HOWARD, C.J.; BROOKE, G.P.; WERLING, D.; SOPP, P.; HOPE, J.C.; PARSONS, K.R.; COLLINS, R.A. Dendritic cells in cattle: phenotype and function. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.72, p.119-124, 1999.
- HÜBNER, S.O.; MORAES, M.P.; REBELATTO, M.C. *et al.* Herpesvírus bovinos isolados no laboratório de virologia de Santa Maria, RS, Brasil. In: JORNADA INTEGRADA DE PESQUISA EXTENSÃO E ENSINO, 1, 1994, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria: Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa-UFSM, 1994. p.394.
- JESSETT, D.M.; RAMPTON, C.S. The incidence of antibody to infectious bovine rinotracheitis virus in Kenyan cattle. **Research Veterinary Science**, v. 18, p. 225-226, 1975.
- JOHNSTON, L. A. Y.; MCGAVIN, M. D. A viral meningoencephalitis in calves. **Australian Veterinary Journal**, n. 38, p. 207-215, 1962.

- KAHRS, R. F. Infectious bovine rhinotracheitis: a review and update. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.171, n. 12, p. 1055-1064, 1977.
- KENDRICK, J.W. Bovine viral diarrhoea virus induced abortion. **Theriog.**, v.5, p.91-93, 1976.
- KIRKLAND, P.D.; RICHARDS, S.G.; ROTHWELL, J.T. & STANLEY, D.F. Replication of bovine viral diarrhoea virus in the bovine reproductive tract and excretion of virus in semen during acute and chronic infections. **Veterinary Record**, v.128, p.587-590, 1991.
- KRAHL, M.; BRAGA, A.C.; OLIVEIRA, L.G.; NETO, J.A.S.P.; PRADO, J.A.P.; ROSA, J.C.A.; WUNDER JÚNIOR, E. Pesquisa de anticorpos para leptospirose, Rinotraqueíte Infecçiosa Bovina e Diarréia Viral Bovina em soros bovinos de propriedades rurais do Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 25, 1997, Gramado. **Anais...** Gramado, RS: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 1997. INF 075, p. 174.
- KUNRATH, C.F.; VOGEL, F.S.F.; OLDONI, I.; FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; DEZENGRINI, R.; TORRES, F.D.; PAN, K.A. Soroneutralização e imunofluorescência utilizando anticorpos monoclonais no diagnóstico rápido de infecções pelo herpesvírus bovino tipos 1 e 5 (BHV-1 e BHV-5). **Ciência Rural**, v.34, n.6, p.1877-1883, 2004.
- LAMBOT, M.; JORIS, E.; DOUART, A.; LYAKU, J.; LETESSON, J.-J.; PASTORET, P.P. Evidence for biotype-specific effects of bovine viral diarrhoea virus on biological responses in acutely infected calves. **Journal of General Virology**, v.79, p.27-30, 1998.
- LIESS, B.; FREY, H.R.; KITTSTEINER, H.; BAUMANN, F. & NEUMANN, N. Beobachtungen und Untersuchungen über die "Mucosal Disease" des Rindes. **Dt. Tierärztl. Wschr.**, v. 81, p. 477-500, 1974.
- LIESS, B.; ORBAN, S. & FREY, H. Studies on the transmissibility of a bovine virus diarrhoea (BVD) vaccine virus in cattle. **Zentr. Vet. [B]**, v.31, p. 669-681, 1984.
- LINDBERG, A.; ALENIUS, S. Principles for eradication of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections in cattle populations. **Veterinary Microbiology**, v. 64, p. 197-222, 1999.
- LITTLEJOHNS, I. & WALTER, K.H. A etiology and pathogenesis of mucosal disease of cattle, current concepts, observations and speculation. **Australian Veterinary Journal**, v.62, p.101-103, 1985.
- LOVATO, L. T.; WEIBLEN, R.; TOBIAS, F. L.; MORAES, M. P. Herpesvírus bovino tipo 1 (HV-1): inquérito soro-epidemiológico no rebanho leiteiro do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 25, n. 3, p. 425-430, 1995a.

- LOVATO, L. T.; WEIBLEN, R.; RABUSKE, M., et al. Herpesvírus bovino tipo 1: isolamento de casos de vulvovaginite. **Semina**, v. 16, n.1, p. 156-157, 1995 b.
- LOVATO, L. T. BHV-1 E BHV-5, Isolamentos e Sorologia no Rio Grande do Sul. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE HERPESVÍRUS BOVINO (TIPO 1 E 5) E VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA (BVDV), 1998, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria, RS, 1998. p. 97-100.
- LUZZAGO, C.; PICCININI, R.; ZEPPONI, A.; ZECCONI, A. Study on prevalence of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) antibodies in 29 Italian dairy herds with reproductive problems. **Veterinary Microbiology**, v. 64, p. 247-252, 1999.
- MAISONNAVE, J. Situacion de BVDV en Uruguay. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE HERPESVÍRUS BOVINO (TIPO 1 E 5) E VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA (BVDV), 1998, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria, RS, 1998. p. 67-68.
- MAJEWSKA, H.; BACZYNSKI, Z.; ZMUDZINSKI, J. Investigations of infectious pustular vulvovaginitis in bulls under natural conditions. **Bull.Vet. Inst.Pulawy**. v.24, n. 1-4, p.52-58, 1980.
- MALMQUIST, W.A. Bovine viral diarrhea-mucosal disease: etiology, pathogenesis and applied immunity. **Journal American Veterinary Medicine Association**, v.152, p.763-768, 1968.
- McCLURKIN, A.W.; CORIA, M.F.; CUTLIP, M.C. Reproductive performance of apparently healthy cattle persistently infected with BVD virus. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.174, p.1116-1119, 1979.
- McCLURKIN, A.W.; LITLEDIKE, E.T.; CUTLIP, R.C.; FRANK, G.H.; CORIA, M.F. & BOLIN, S.R. Production of Cattle Immunotolerant to Bovine Viral Diarrhea Virus. **Canadian Journal Comparative Medicine**, v.48, p.156-161, 1984.
- McKERCHER, D.G. Studies of the etiologic agents of infectious bovine rhinotracheitis and blaschenaussschlang (coital vesicular exanthema). **American Journal Veterinary Research**, v. 24, p.501-508, 1963.
- MÉDICI, K.C.; ALFIERI, A.A.; ALFIERI, A.F. Ensaio imunoenzimático comercial no diagnóstico sorológico das infecções por herpesvírus bovino 1. **Ciência Rural**, v.30, n.3, p. 343-346, 2000.
- MÉNDEZ, M. C.; RIET-CORRÊA, F.; SCHILD, A. L. Doenças diagnosticadas no ano de 1986. **Laboratório Regional de Diagnósticos**. Ed. da Universidade, Pelotas, p. 30. 1987.
- METTENLEITER, T.C. Conclusions from the symposium. **Veterinary Microbiology**, v. 53, p.207-211, 1996.

- METZLER, A.E.; MATILE, H.; GASSMANN, U.; ENGELS, M.; WYLER, R. European isolates of bovine herpesvirus 1: a comparison of restriction endonuclease sites, polypeptides and reactivity with monoclonal antibodies. **Archives of Virology**, v.85, p.57-69, 1985.
- METZLER, A.E.; SCHUDEL, A.A.; ENGELS, M. Bovine herpesvirus 1: molecular and antigenic characteristics of variant viruses isolated from calves with neurological disease. **Archives of Virology**, v.87, p.205-217, 1986.
- MEYERS, G.; RÜMENAPF, T. & THIEL, H.J. **New Aspects of Positive-Strand RNA Viruses**. Ed. by Margo A. Brinton and Franz X. Heins, 1990. cap. 4, p.25-30: Insertion of Ubiquitin-Coding Sequence Identified in the RNA Genome of a Togavirus.
- MEYERS, G.; TAUTZ, N.; DUBOVI, E.J. & THIEL, H.J. Viral cytopathogenicity correlated with integration of ubiquitin-coding sequences. **Virology**, v.180, p. 602-616, 1991.
- MEYERS, G.; THIEL, H.J. Molecular characterization of pestiviruses. **Advances Virus Research**, v. 47, p. 53-118, 1996.
- MEYERS, A.L.; HANON, E.; GEORLETTE, D.; PASTORET, P.P.; THIRY, E. Bovine herpesvirus type 1 glycoprotein H is essential for penetration and propagation in cell culture. **Journal of General Virology**, v.79, p.1983-1987, 1998.
- MEYLING, A.; RONSHOLT, L.; DALSGAARD, K. & JENSEN, A.M. Experimental exposure of vaccinated and non-vaccinated pregnant cattle to isolates of bovine viral diarrhoea virus (BVDV). **Comm. Eur. Commun. Agric. Pest. Infec. Rumin.**, p.225-232, 1987.
- MILLER, J. M. The effects of IBR virus infection on reproductive function of cattle. **Veterinary Medicine**, v. 86, n. 1, p. 95-98, 1991.
- MINEO, T.W.P.; MONTASSIER, H.J.; BJÖRKMAN, C.; NÄSLUND, K.; UGGLA, A. Seroprevalence of bovine viral diarrhoea virus and bovine herpesvirus type I in two abortion prone dairy herds in the triângulo mineiro region. **Journal of the Brazilian Society for Virology**, v.7, n.1, p.145, 2002. In: ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA, XIII, 2002, Águas de Lindóia. **Resumos...** Águas de Lindóia, SP: Sociedade Brasileira de Virologia, 2002. p. 145.
- MINTZEL, V.H.; RIEDEMANN, S.; REINHARDT, G. Rinotraqueitis infecciosa bovina: relación entre títulos de anticuerpos y dos índices reproductivos en un plantel lechero. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 33, p. 697-703, 1986.
- MISRA, V.; BLUMENTHAL, R.M.; BABIUK, L.A. Protein specified by bovine herpesvirus 1 (Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus). **Journal of Virology**, v.40, p.367-378, 1981.

- MOCKELIUNIENE, V.; SALOMSKAS, A.; MOCKELIUNAS, R.; PETKEVICIUS, S. Prevalence and epidemiological features of bovine viral diarrhoea virus infection in Lithuania. **Veterinary Microbiology**, v. 99, p. 51-57, 2004.
- MOENNIG, V. & PLAGEMANN, P.G.W. The pestiviruses. **Advances Virus Research**, Academic Press, v.41, p.53-98, 1992.
- MOERMAN, A.; STRAVER, P.J.; DE JONG, M.C.M., QUAK, J.; BAANVIRGER, T.H.; VAN OIRSCHOT, J.T. A long term epidemiological study of bovine viral diarrhoea infections in a large herd of dairy cattle. **Veterinary Record**, v. 132, n. 25, p. 622-626, 1993.
- MOHANTY, S. B.; DUTTA, S. K. **Veterinary Virology**, Philadelphia, Lea & Febiger, 1981. p. 107.
- MULLER, S. B. K.; IKUNO, A. A.; CAMPOS, M. T. G. R.; RIBEIRO, L. O. C. Isolamento e identificação do vírus da rinotraqueíte infecciosa dos bovinos de um rim de feto bovino (IBR/IPV). **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo. v. 45, n. 3, p. 187-190, 1978.
- MULLER, S. B. K.; IKUNO, A. A.; CAMPOS, M. T.; *et al.* Ocorrência simultânea de alterações respiratórias e genitais associadas à rinotraqueíte infecciosa dos bovinos/ vulvovaginite pustular infecciosa (IBR/IPV) em um rebanho no Estado de São Paulo. **Arquivo do Instituto Biológico de São Paulo**, v. 45, n. 3-4, p. 55-60, 1979.
- MULLER, S. B. K.; IKUNO, A. A.; CAMPOS, M. T.; MACHADO, J. S.; RIBEIRO, L. O. C Prevalência de anticorpos contra o vírus da rinotraqueíte infecciosa dos bovinos/ vulvovaginite pustular infecciosa (IBR/IPV) em bovinos do estado de São Paulo. **Arquivo do Instituto Biológico de São Paulo**, v. 47, n.2, p. 1192-1196, 1981.
- MUÑOZ, D.P.; LAGER, I.A.; MERSICH, S.; ZÁBAL, O.; ULLOAS, E.; SCHUDEL, A.A.; WEBER, E.L. Foetal infections with bovine viral diarrhoea virus in Argentina. **Br. Vet. J.**, v.152, n.2, p.175-182, 1996.
- NARITA, M.; INUI, S.; NAMBA, K.; SHIMIZU, Y. Recrudescence of infectious bovine rhinotracheitis virus and associated neural changes in calves treated with dexamethasone. **American Journal Veterinary Research**, v.42, n.7, p.1192-1197, 1981.
- NISKANEN, R.; ALENIUS, S.; LARSSON, B.; JUNTTI, N. Evaluation of a enzyme linked immunosorbent assay for detection of antibodies to bovine virus diarrhoea virus in milk. **Journal of Veterinary Medicine Series, B.** v.36, s. n., p. 113-118, 1989.
- NISKANEN, R. Relationship between the levels of antibodies to bovine viral diarrhoea virus in bulk tank milk and the prevalence of cows exposed to the virus. **Veterinary Microbiology**, v. 133, n. 14, p. 341-344, 1993.

- NISKANEN, R.; LINDBERG, A.; TRAVEN, M. Failure to spread bovine virus diarrhoea virus infection from primarily infected calves despite concurrent infection with bovine coronavirus. **Veterinary Journal**, v.163, p.251-259, 2002.
- NOGUEIRA, F. R. C.; CAMARGO, A. J. R.; RESENDE, D. A ocorrência de rinotraqueíte infecciosa bovina/vulvovaginite pustular infecciosa em bovinos no estado do Rio de Janeiro. Pesagro, RJ. **Comunicação Técnica**. 1986.
- NORONHA, R.P.; CAMPOS, G.S.; SARDI, S.I. Pesquisa do vírus da diarreia viral bovina em bovinos jovens. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.40, p.424-430, 2003.
- NUTTALL, P. Growth characteristics of two strains of bovine viral diarrhoea virus. **Archives of Virology**, v.66, p.365-369, 1980.
- ODEON, A.C. Herpesvirus Bovino In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE HERPESVÍRUS BOVINO (TIPO 1 E 5) E VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA (BVDV), 1998, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria, RS, 1998. p. 103-111.
- OLIVEIRA, E.A.S. Caracterização de amostras de pestivirus com anticorpos monoclonais. Tese de mestrado. Faculdade de Veterinária UFRGS.
- OLIVEIRA, L.G.; OLIVEIRA, E.A.S.; SILVA, L.H.T.; VIEIRA, L.A.; HOFFMANN, V.L.; FERNANDES, G.V.; SILVA, T.C.; CALDAS, A.P.F.; ROEHE, P.M. Presença de pestivirus e anticorpos contra pestivirus em soros e cultivos celulares. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.48, n.5, p. 513-521, 1996.
- OSBURN, B.I. Bovine virus diarrhea: molecular studies. **Proc. 11th Int. Symp. Wld. Assn. Vet. Microb.**, Immunol Spec. Inf. Dis., p.253-256, 1989.
- OSORIO, F.; SRIKUMARAN, S.; RHODES, M.; CHRISTENSEN, D.; SRIKUMARAN, P. Detection of bovine herpesvirus-1-specific IgM using a capture enzyme immune assay with isotype-specific monoclonal antibodies. **Veterinary Diagnostic Investigation**, v.1, p. 139-145, 1989.
- OSORIO, F. Latency of bovine herpesvirus-1. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE HERPESVÍRUS BOVINO (TIPO 1 E 5) E VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA (BVDV), 1998, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria, RS, 1998. p. 117-126.
- PARSONSON, I.M.; SNOWDON, W.A. The effect of natural and artificial breeding using bulls infected with or contaminated with, infectious bovine rhinotracheitis virus. **Australian Veterinary Journal**, v. 51, p. 365-369, 1975.
- PASTORET, P. P.; THIRY, E.; BROCHIER, B.; DERBOVEN, G. Bovid herpesvirus 1 infection of cattle: pathogenesis, latency, consequences of latency. **Ann. Rech. Vét.**, v. 13, n. 3, p. 221-235, 1982.

- PATON, D.J.; BROCKMAN, S. & WOOD, L. Insemination of susceptible and preimmunized cattle with bovine viral diarrhoea virus infected semen. **British Veterinary Journal**, v. 146, n.2, p. 171-174, 1990.
- PATON, D.J. Pestivirus diversity. **Journal of Comparative Pathology**, v. 112, p. 215-236, 1995.
- PELLEGRIN, A.O.; SERENO, J.R.B.; LEITE, R.C. Seropositivity to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) in Zebu cows in the Brazilian Pantanal. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.49, n. 3, p. 375-377, 1997
- PELLERIN, C.; HURK, J.V.D.; LECOMTE, J. & TUSSEN, P. Identification of a New Group of Bovine Viral Diarrhea Virus Strains Associated with Severe Outbreaks and High Mortalities. **Virology**, v. 203, p. 260-268, 1994.
- PERRIN, B.; BITSCH, V.; CORDIOLI, P.; EDWARDS, S.; ELOIT, M.; GUÉRIN, B.; LENIHAN, P.; PERRIN, M.; RONSHOLT, L.; VAN OIRSCHOT, J.T.; VANOPDENBOSCH, E.; EWLLEMANS, G.; WIZIGMANN, G.; THIBIER, M.A. European comparative study of serological methods for the diagnosis of infectious bovine rhinotracheitis. **Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties**. v.12, n.3, p. 969-984, 1993.
- PESCADOR, C.A.; CORBELLINI, L.G.; DRIEMEIER, D.; GONÇALVES, R.K.; CRUZ, C.E.F. Neurological disorder associated with pestivirus infection in sheep in Rio Grande do Sul, Brazil. **Ciência Rural**, v. 34, n.3, p. 935-938, 2004.
- PETERHANS, E.; JUNGI, T.W.; SCHWEIZER, M. BVDV and innate immunity. **Biologicals**, v.31, n.2, p.107-112, 2003.
- PETERS, W.; LIESS, B.; FREY, H.R. & TRAUTWEIN, G. In: Pestivirus Infections of Ruminants, 1987. (ed. Harkness, J.W.). Comm. Eur. Commun [Rep.] EUR, 1987, p. 133-145.
- PETZOLD, S.A.; RECKZIEGEL, P.E.; PRADO, J.A.P.; TEIXEIRA, J.C.; WALD, V.B.; ESTEVES, P.A.; SPILKI, F.R.; ROEHE, P.M. Neutralizing antibodies to bovine herpesviruses types 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5) induced by na experimental, oil-adjuvanted, BHV-1 vaccine. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v.38, n.4, p. 184-187, 2001.
- PINTO, G.B.; HAWKES, P.; ZABAL, O. Viral antibodies in bovine fetuses in Argentina. **Research Veterinary Science**, v.55, p. 385-388, 1993.
- PINTO, A.M.V.; ROMIJN, P.C.; SILVA, R.C.F.; MARTINS, L.L.; WEIBLEN, R.; ROEHE, P.M.; KIMURA, L.M.S.; ALFIERI, A.A. & LEITE, J.P.G. Detection of bovine viral diarrhea virus in brain of bovines with clinical symptoms of neurological disorders. **Journal of the Brazilian Society for Virology**, v.6, n.2, p.146, 2001. In: ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA, XII, 2001, Caldas Novas. **Resumos...** Caldas Novas, GO: Sociedade Brasileira de Virologia, 2001. p. 146.

- PITUCO, E.M. **Ocorrência da Rinotraqueíte Infeciosa dos Bovinos/Vulvovaginite Pustular Infeciosa (IBR/IPV) em rebanhos bovinos criados nos Estados de São Paulo, Rio Grande do Sul, Paraná e Minas Gerais. Utilização das reações sorológicas de microssoroneutralização, microhemaglutinação passiva e da Imunofluorescência Indireta para detecção de anticorpos anti-herpesvírus Bovino 1.** São Paulo, 1988. 74f. Dissertação (Mestrado em Patologia Bovina) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP, 1988.
- PITUCO, E. M.; DE STEFANO, E.; PASSOS, E.C.; *et al.* Diagnóstico sorológico da rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) no período de 1988 a 1992. In: REUNIÃO ANUAL DO INSTITUTO BIOLÓGICO, 6, 1993, São Paulo. **Resumos...**, São Paulo: SP: Instituto Biológico, 1993. p. 16.
- PITUCO, E. M.; DEL FAVA, C.; OKUDA, L.H.; DE STEFANO, E.; BILINSKYJ, M.C.V.; SAMARA, S.I. Prevalência da infecção pelo Vírus da Diarréia Bovina à Vírus (BVD) em Búfalos (*Bubalus bubalis*) no Vale do Ribeira, SP, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo**, v. 64, n.1, p. 23-28, 1997.
- PITUCO, E.M. & DEL FAVA, C. Situação do BHV-1 na América do Sul. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE HERPESVÍRUS BOVINO (TIPO 1 E 5) E VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA (BVDV), 1998, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria, RS, 1998. p. 75-81.
- POCOCK, D.H.; HOWARD, C.J.; CLARKE, M.C. & BROWNLIE, J. Variation in the Intracellular Profiles from Different Isolates of Bovine Virus Diarrhoea Virus. **Archives of Virology**, v.94, p.43-53, 1987.
- POLETO, R.; KREUTZ, L.C.; GONZALES, J.C.; BARCELLOS, L.J.G. Prevalência de tuberculose, brucelose e infecções víricas em bovinos leiteiros do município de Passo Fundo, RS. **Ciência Rural**, v.34, n.2, p.595-598, 2004.
- PORTERFIELD, J.S. **Andrews's viruses of vertebrates.** 5 ed. London: Baillière Tindall. 1989.
- POTGIETER, L.N.; Immunology of bovine viral diarrhea virus. **Vet Clin. N.Am. Food Anim. Pract.**, v.11, p.501-520, 1995.
- PRITCHARD, W.R.; TAYLOR, D.B.; MOSES, H.E. & DOYLE, L.P. A transmissible disease affecting the mucosae of cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.128, n.1, p.1-5, 1956.
- PRITCHARD, W.R. The bovine viral diarrhea-mucosal disease complex. **Advances Veterinary Science**, v.8, p.1-47, 1963.
- QI, F.; RIDPATH, J.F.; LEWIS, T.; BOLIN, S.R. & BERRY, E.S. Analyses of the Bovine Viral Diarrhea Virus Genome for Possible Cellular Insertions. **Virology**, v.189, p.285-292, 1992.

- QUINCOZES, C.G.; GOMES, F.R.; FISCHER, G.; OLIVEIRA, L.S.; FERREIRA, L.N.; BARUEL, C.C.; VIDOR, T. Prevalência de HVB em rebanhos com problemas reprodutivos no Sul do Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA e V ENCONTRO DA PÓS-GRADUAÇÃO, XII, 2003, Pelotas. **Resumos...** Pelotas, RS: Universidade Federal de Pelotas, 2003. Versão digitalizada.
- RAVAZZOLO, A. P.; PIZZOL, M. D.; MOOJEN, V. Evidência da presença de anticorpos para o vírus da rinotraqueíte infecciosa dos bovinos em bovinos de alguns municípios do Estado do Rio Grande do Sul. **Arquivo da Faculdade de Veterinária – UFRGS**, v.17, p. 89-95, 1989.
- REBHUN, W.C.; FRENCH, T.W.; PERDRIZET, J.A.; et al. Trombocytopenia associated with acute bovine virus diarrhea infection in cattle. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.3, p.42-46, 1989.
- REDDY, J.R.; XUE, W.; RIVERA, S & MINOCHA, H.C. Antigenic differences between a field isolate and vaccine strains of bovine viral diarrhea virus. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, n.8, p.2159-2161, 1995.
- REED, D.E.; BICKNELL, E.J.; BURY, R.J. Systemic form of infectious bovine rhinotracheitis in young calves. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 163, p.753-755, 1973.
- REINHARDT, G.; RIEDEMANN, S.; FIEDLER, H.; NIEDDA, M.; AGUILAR, M.; CUBILLOS, V. Diarrea viral bovina/enfermedad mucosa. Primer aislamiento del agente causal en Chile. **Archives of Medicine Veterinary**, v.18, p. 157-161, 1986.
- REINHARDT, G. Diarrea viral bovina/enfermedad mucosa: una enfermedad viral compleja. **Monografias Med. Vet.**, v.14, p. 49-55, 1992.
- REINHARDT, G.; CARRASCO, L.; TADICH, N.; RIEDEMANN, S. Comparación entre dos técnicas de diagnóstico para diarrea viral bovina (DVB) en 50 predios de la X región, Chile. Seroneutralization y enzimoimmunoensayo indirecto (ELISA-I). **Archives of Medicine Veterinary**, v.33, n.2, p. 1-15, 2001.
- RENARD, A.; GUIOT, C.; SCHMETS, D.; DAGENAIS, L.; PASTORET, P.P.; DINA, D. & MARTIAL, J.A. Molecular cloning of bovine viral diarrhea virus sequences. **DNA**, v.4, p.429-438, 1985.
- REVELL, S.G.; CHASEY, D.; DREW, T.W. & EDWARDS, S. Some observations on the semen of bulls persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. **Veterinary Record**, v.123, p.122-125, 1988.
- RIBEIRO, M.B.; ALICE, F.J.; BRANCO, M.B.C. Prevalência de anticorpos para a rinotraqueíte infecciosa dos bovinos na Bahia. In CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 18, 1982, Camboriú. **Anais...** Camboriú, SC: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 1982. p. 81.

- RICHTZENHAIN, L.J. Em busca de respostas. **Revista Criadores**, n. 808, p.40, 1997.
- RIDPATH, J.; BOLIN, S.; DUBOVI, E. Segregation of bovine viral diarrhoea virus into genotypes. **Virology**, v. 205, p. 66-74, 1994.
- RIEDEMANN, S.; REINHARDT, G.; TADISCH, N.; AGUILAR, M.; AGUILAR, R.; MONTECINOS, M.I.; MIRANDA, J.C. Seroprevalence of bovine diarrhoea virus (BDV), bovine herpesvirus 1 (BHV-1), parainfluenza virus (PI3) and bovine respiratory syncytial virus (BRSV) in 12 dairy herds in the province of Valdivia in Chile. **Archives of Medicine Veterinary**, v. 28, p. 121-124, 1996.
- RIET-CORREA, F.; VIDOR, T.; SCHILD, A. L.; MÉNDEZ, M. C. Meningoencefalite e necrose do córtex cerebral em bovinos causadas por herpesvírus bovino-1. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 9, n. 1-2, p. 13-16, 1989.
- RIET-CORREA, F. & SCHILD, A.L. Doenças diagnosticadas pelo Laboratório Regional de Diagnóstico no ano de 1994 e comentários sobre algumas doenças. **Boletim nº 15**. Laboratório Regional de Diagnósticos. Editora Universitária, Pelotas, p. 7-9, 1995.
- RIET-CORREA, F.; MOOJEN, V.; ROEHE, P.M.; WEIBLEN, R. Viroses confundíveis com febre aftosa: revisão bibliográfica. **Ciência Rural**, v. 26, p. 323-332, 1996.
- ROBERTS, D.H.; LUCAS, M.H.; WIBBERLEY, G.; et al. Response of cattle persistently infected with bovine virus diarrhoea virus to bovine leucosis virus. **Veterinary Record**, v.122, p.293-296, 1988.
- ROCHA, M.A.; GOUVEIA, A.M.G.; LEITE, R.C. Pesquisa de anticorpos anti IBR em soro de touros de uma central de inseminação. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 1994, Olinda. **Anais...Recife**, PE: Sociedade Pernambucana de Medicina Veterinária, 1994. 656p. p.213.
- ROCHA, M.A.; GOUVEIA, A.M.G.; LOBATO, Z.I.P.; LEITE, R.C. Pesquisa de anticorpos para IBR em amostragem de demanda no Estado de Minas Gerais, 1990-1999. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.53, n.6, p. 645-647, 2001.
- ROCK, D.L. Latent infection with bovine herpesvirus type 1. **Seminars in Virology**. v.5, p.233-240, 1994.
- ROEHE, P. M. **Studies on the comparative Virology of Pestiviruses**. U.K., 1991. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - University of Surrey, Department of Microbiology, 1991.
- ROEHE, P. M. **Diagnóstico de enfermidades víricas de bovinos**. In: I Encontro de Laboratórios de Diagnóstico Veterinário do Conesul. Editora da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul. Campo Grande, MS. p. 73-78, 1996.

- ROEHE, P. M.; SILVA, T. C.; NARDI, N. B.; OLIVEIRA, L. G.; ROSA, J. C. A. Diferenciação entre o vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (BHV-1) e herpesvírus da encefalite bovina (BHV-5) com anticorpos monoclonais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.17, n. 1, p. 41-44, 1997a.
- ROEHE, P.M.; ALMEIDA, R.S.; TEIXEIRA, M.F.B.; ESTEVES, P.A.; OLIVEIRA, E.A.S.; PETZHOLD, S.A.; SILVA, T.C. Atualização no diagnóstico e controle de infecções por herpesvírus bovinos tipos 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5). **Biológico**, São Paulo, v. 59, n.2, p. 27-32, 1997b.
- ROEHE, P. M.; TEIXEIRA, M. B.; ESTEVES, P. A.; MELO, S. V.; ALMEIDA, R. S.; D'ARCE, R. C. F.; SILVA, T. C.; LEMOS, R. A.; OLIVEIRA, L. G. Situação do BHV-1 e BHV-5 no Brasil. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE HERPESVÍRUS BOVINO (TIPO 1 E 5) E VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA (BVDV), 1998, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria, RS, 1998. p. 89-96.
- ROIZMAN, B. **Herpesviridae**. Fields Virology. Chapter 71, p. 2221-2230. 1996.
- ROMENO, C.R.E. Primer brote de la diarrea viral en el partido de Ajacucho y su tratamiento. *Ver. Fac. Vet. De la Plata*, v.24, p. 395-396, 1968.
- ROSA, J.A.; BANGEL, E.; MARTINS, R.M.; OLIVEIRA, L.G.; ROEHE, P.M. Anticorpos contra o vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) em bovinos no Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO ESTADUAL DE MEDICINA VETERINÁRIA, 11^o., 1992. Gramado. **Anais..** Porto Alegre: SOVERGS, 1992. p.86.
- ROSSI, C.R.; KIESEL, G.K. Effect of infectious rhinotracheitis virus immunization on viral shedding in challenge-exposed calves treated with dexamethasone. **American Journal Veterinary Research**, v.43, n.9, p.1576-1579, 1982.
- RWEYEMAMU, M.M.; FERNANDEZ, A.A.; ESPINOSA, A.M.; SCHUDEL, A.A.; LAGER, L.A.; MUELLER, S.B.K. *Revue Scientifique et Technique OIE*, v.9, n.1, p. 207-221, 1990.
- SALVADOR, S.C. **Meningoencefalite em bovinos causada por herpesvírus bovino-5 no Mato Grosso do Sul e São Paulo**. Pelotas, 1997. 64f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Veterinária, UFPel, 1997.
- SALVADOR, S. C.; LEMOS, R. A. A.; RIET-CORRÊA, F.; ROHE, P. M.; OSÓRIO, A. L. A. R. Meningoencefalite em bovinos causada por herpesvírus bovino-5 no Mato Grosso do Sul e São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 18, n.2, p. 75-82, 1998.
- SANDVIK, T. Laboratory diagnostic investigations for bovine viral diarrhoea virus infections in cattle. **Veterinary Microbiology**, v. 64, n. 2-3, p. 123 – 134, 1999.

- SCHILD, A. L.; RIET-CORRÊA, F.; PEREIRA, D. B.; LADEIRA, S.; RAFFI, M. B.; ANDRADE, G. B.; SCHUCH, L. F. Doenças diagnosticadas pelo Laboratório Regional de Diagnóstico no ano de 1993 e comentários sobre algumas doenças. **Boletim do Laboratório Regional de Diagnóstico**, Pelotas, RS. Convênio Embrapa-UFPel, v. 14, p. 20-22, 1994.
- SCHUDEL, A.A.; CARRILLO, B.J.; WYLER, R.; METZLER, A.E. Infections of calves with antigenic variants of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) and neurological diseases. **Journal of Veterinary Medicine**, v.33, n.4, p. 303-310, 1986.
- SCOTT, F.W.; KAHRS, R.F.; deLAHUNTA, A.; BROWN, T.T.; McENTEE, K. & GILLESPIE, J.H. Virus induced congenital anomalies of the bovine fetus. I. Cerebellar degeneration (hypoplasia), ocular lesions and fetal mummification following experimental infections with bovine viral diarrhea-mucosal disease virus. **Cornell Veterinary**, v.63, p.536-560, 1973.
- SCROFERNEKER, M.L. **Notas de Imunologia**. Editora da Universidade/UFRGS, 1996. 165-166p.
- SHEFFY, B.E.; RODMAN, S. Activation of latent infectious bovine rhinotracheitis infection. **J.A.V.M.A.** v.163, n.7, p. 850-854, 1973.
- SHEN, D.T.; BURGER, D.; LI, Z.; GORHAM, J.R. Characterization of monoclonal antibodies to bovine herpesvirus type I, Los Angeles strain. **Veterinary Microbiology**, v. 28, p. 25-37, 1991.
- SHIMIZU, M. & SATOU, K. Frequency of Persistent Infection of Cattle with Bovine Viral Diarrhea-Mucosal Disease in Epidemic Areas. **Jpn. J. Vet. Sci.**, v.49, n.6, p.1045-1051, 1987.
- SILVA, T. C. **Produção e caracterização de anticorpos monoclonais contra o herpesvírus bovino-1 (BHV-1)**. Porto Alegre, 1995. 73f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias - Área de Virologia). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, 1995.
- SILVA, A.M. et al. (Org). Herpesvírus bovino (tipo 1 e 5) e vírus da diarréia viral bovina (BVDV). In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE HERPESVÍRUS BOVINO (TIPO 1 E 5) E VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA (BVDV), 1998, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria, RS, 1998.
- SMITH, G.A.; YOUNG, P.L.; REED, K.C. Emergence of a new bovine herpesvirus 1 strain in Australian feedlots. **Archives of Virology**, v.140, p. 599-603, 1995.
- SMITH, B.P. **Large Animal Internal Medicine**. 2 ed. London. Mosby. 1996.
- SOPP, P.; HOOPER, L.B.; CLARKE, M.C.; HOWARD, C.J.; BROWNLIE, J. Detection of bovine viral diarrhea virus p80 protein in subpopulations of bovine leukocytes. **Journal of General Virology**, v.75, p.1189-1194, 1994.
- SPRECHER, E.; BECKER, Y. Role of Langerhans cells and other cells in viral diseases. **Archives of Virology**, v.132, p.1-28, 1993.

- SSENTONGO, Y.K.; JOHNSON, R.H. & SMITH, J.R. Association of bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus with ovaritis in cattle. **Australian Veterinary Journal**, v.56, p.272-273, 1980.
- STORCH, T.; CAMPOS, F. S.; VILELA, C.O.; DUMMER, L.A.; QUINCOZES, C.G.; CLEFF, M.B.; FISCHER, G. HÜBNER, S.O.; VIDOR, T. Avaliação da redução na eficiência reprodutiva em um rebanho leiteiro com diagnóstico positivo para BVD. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, XIII, 2004, Pelotas. **Resumos...** Pelotas, RS: Universidade Católica de Pelotas, 2004. Versão digitalizada.
- STUDDERT, M.J. Bovine encephalitis herpesvirus. **Veterinary Record**, v. 125, p. 584, 1989.
- TEIXEIRA, M.F.B.; ESTEVES, P.A.; COELHO, C.S.S.; SILVA, T.C.; OLIVEIRA, L.G.; ROEHE, P.M. Diferenças em níveis de anticorpos neutralizantes contra herpesvírus bovinos tipo 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5). **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v.4, p. 61-65, 1998.
- THIBIER, M.; GUERIN, B. Hygienic aspects of storage and use of semen for artificial insemination. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.233-251, 2000.
- VAN OIRSCHOT, J.T. Congenital infections with nonarbo togaviruses. **Veterinary Microbiology**, v.8, p.321-361, 1983.
- VAN OIRSCHOT, J.T. Bovine herpesvirus 1 in semen of bulls and the risk of transmission: a brief review. **Veterinary Quartely**, v.17, p. 29-33, 1995.
- VAN OIRSCHOT, J.T.; KAASHOEK, M.J.; RIJSEWIJK, F.A.M. Advances in the development and evaluation of bovine herpesvirus 1 vaccines. **Veterinary Microbiology**, v. 53, n. 1- 2, p. 43-54, 1996.
- VAN OIRSCHOT, J.T. The BHV-1 Situation in Europe. In SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE HERPESVÍRUS BOVINO (TIPO 1 E 5) E VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA (BVDV), 1998, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria, RS, 1998. p. 69-72.
- VAN OIRSCHOT, J.T.; BRUSCHKE, C.J.; VAN RIJN, P.A. Vaccination of cattle against bovine viral diarrhoea. **Veterinary Microbiology**, v. 64, p. 169-183, 1999.
- VAN WUIJCKHUISE, L.; BOSCH, J.; FRANKEN, P.; ELBERS, A.R. Epidemiological characteristics of bovine herpesvirus 1 infections determined by bulk milk testing of all Dutch dairy herds. **Veterinary Record**, v. 142, p. 181-184, 1998.

- VASCONCELOS, R. O.; VERASCHIN, M. S.; VOUTERS, F.; NOBRE, M.T.; BARTH, A. T. Meningoencefalite bovina por herpesvírus. In: ENCONTRO NACIONAL DE PATOLOGIA VETERINÁRIA, VI, 1993, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria, RS: Colégio Brasileiro de Patologia Animal, 1993. p. 11.
- VIDOR, T. Isolamento e identificação do vírus da Doença das Mucosas no Rio Grande do Sul. **Boletim do Instituto de Pesquisa Veterinária Desidério Finamor**, especial 2, p.51-58, 1974.
- VIDOR, T.; HALFEN, D. C.; LEITE, T. E.; COSWIG, L. T. Hespesvírus bovino tipo 1 (BHV-1): I. Sorologia de rebanhos com problemas reprodutivos. **Ciência Rural**, v. 25, n. 3, p. 421-424, 1995.
- VIEIRA, S.; DIAS Fº, F.C.; QUEIRÓZ, D.A.O.; BRITO, W.M.E.D. Seroepizootiological study on bovine herpesvirus-1 (BHV-1) and bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in cattle from Goiás, Brazil. **Journal of the Brazilian Society for Virology**, v.4, p.58, 1999. In: ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA, X, 1999, Curitiba. **Resumos...** Curitiba, PR: Sociedade Brasileira de Virologia, 1999. p. 58.
- VIEIRA, S.; BRITO, W.M.E.D.; SOUZA, W.J.; ALFAIA, B.T.; LINHARES, D.C.L. Anticorpos para o herpesvírus bovino 1 (BHV-1) em bovinos do Estado de Goiás. **Ciência Animal Brasileira**, v.4, n.2, p. 131-137, 2003.
- VILELA, C.O.; QUINCOZES, C.G.; GOMES, F.R.; FISCHER, G.; BARUEL, C.C.; FERREIRA, L.N.; OLIVEIRA, L.S.; VIDOR, T. Prevalência de BVD em rebanhos com problemas reprodutivos no Sul do Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA e V ENCONTRO DA PÓS-GRADUAÇÃO, XII, 2003, Pelotas. **Resumos...** Pelotas, RS: Universidade Federal de Pelotas, 2003. Versão digitalizada.
- VILELA, C.O.; DUMMER, L.A.; CAMPOS, F.S.; STORCH, T.; QUINCOZES, C.G.; FISCHER, G.; CLEFF, M.B.; HÜBNER, S.O.; VIDOR, T. Incidência do BVDV e do BHV em rebanhos com problemas reprodutivos no Sul do Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, XIII, 2004, Pelotas. **Resumos...** Pelotas, RS: Universidade Católica de Pelotas, 2004. Versão digitalizada.
- VIRAKUL, P.; FAHNING, M.L.; JOO, H.S. & ZEMJANIS, R. Fertility of cows challenged with a cytopathic strain of bovine virus diarrhea virus during na outbreak of spontaneous infection with a noncytopathic strain. **Theriog.**, v.29, p.441-449, 1988.
- VOGEL, F.S.F.; SCHERER, C.F.C.; FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; LIMA, M.; KUNRATH, C.F. Resposta sorológica e avaliação de proteção fetal em ovelhas prenhes vacinadas contra o vírus da diarréia viral bovina (BVDV). **Ciência Rural**, v.31, n.5, p. 831-838, 2001.

- VOGEL, F.S.F.; FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; KUNRATH, C.F. Atividade neutralizante anti-herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5) no soro de bovinos imunizados com vacinas contra o BHV-1. **Ciência Rural**, v.32, n.5, p. 881-883, 2002.
- WATSON, J.; HOPKINS, N.H.; ROBERTS, J.W.; STEITZ, J.A. & WEINER, A.M. **Molecular biology of the gene**. 4ªed. Benjamin/Cummings Publishing Company Menlo Park, California, 1987. cap.24, p.898-959: The Extraordinary Diversity of Eucaryotic Viruses.
- WEIBLEN, R.; BARROS, L.; CANABARRO, C. S.; FLORES, E. F. Bovine meningo-encephalitis from IBR virus. **Veterinary Record**, v. 124, p.666-667, 1989.
- WEIBLEN, R.; KREUTZ, R. C.; CANABARRO, T. F.; FLORES, I. E. Balanoposthitis in bulls due to bovine herpesvirus in South Brasil. **Brasilian Journal of Medicine Biology Research**, v. 24, p. 773-775, 1991.
- WEIBLEN, R. Doenças víricas que interferem na produção leiteira. In: CHARLES, T. P., FURLONG, J. **Doenças dos bovinos de leite adultos**. Coronel Pacheco, Embrapa-CNPGL, p. 45-62, 1992a.
- WEIBLEN, R.; KREUTZ, L. C.; CANABARRO, T. F.; SCHUCH, L.F.; REBELATO, M.C. Isolation of bovine herpesvirus 1 from preputial swabs and semen of bull with balanoposthitis. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.4, p. 341-343, 1992b.
- WEIBLEN, R. Herpesvirus Bovino. In: Curso teórico: enfermidades confundíveis com febre aftosa. UFSM. Santa Maria, RS **Circular Técnico**, p. 45-68, 1996a.
- WEIBLEN, R.; MORAES, M. P.; REBELATTO. Bovine herpesvirus isolates. **Revista de Microbiologia**, v. 27, n.3, p. 87-90, 1996b.
- WELSH, M. D.; ADAIR, B. M.; FOSTER, J. C. Effect of BVD virus infection on alveolar macrophage functions. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.46, p.195-210, 1995.
- WENTINK, G.H.; VAN OIRSCHOT, J.T.; VERHOEFF, J. Risk of infection with bovine herpes virus 1 (BHV-1): A review. **Veterinary Quartely**, v.15, n.1, p. 30-33, 1993.
- WESTAWAY, E.G. Flavivirus replication strategy. **Advances Virus Research**, v.33, p.45-90, 1987.
- WHITMORE, H.L.; GUSTAFSSON, B.K.; HAUARESHTI, P.; DUCHATEAU, A.B.; MATHER, E.C. Inoculation of bulls with bovine virus diarrhea virus: excretion of virus in semen and effects on semen quality. **Theriog.**, v.9, p.153-169, 1978.

- WHITMORE, H.L.; ZEMJANIS, R. & OLSON, J. Effect of bovine viral diarrhea virus on conception in cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.178, p.1065-1067, 1981.
- WILD, P.; SCHRANER, E.M.; PETER, J.; LOEPFE, E.; ENGELS, M. Novel entry pathway of bovine herpesvirus 1 and 5. **Journal of Virology**. v.72, p.9561-9566, 1998.
- WILKIE, N. B. Respiratory tract immune response to microbial pathogens. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 181, n. 10, p. 1074-1079, 1982.
- WIZIGMANN, G.; VIDOR, T.; RICCI, Z.M.T Investigações sorológicas sobre a ocorrência e incidência dos vírus PI-3, IBR e diarreia a vírus - Enfermidade das Mucosas dos bovinos no Estado do Rio Grande do Sul. **Boletim do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor**, Porto Alegre- RS. v. 1, p. 52-58, 1972.
- WOLFMAYER, A., WOLF, G.; BEER, M. Genomic (5'UTR) and serological differences among German BVDV field isolates. **Archives of Virology**, v. 142, p. 2049-2057, 1997.
- WRAY, C.; ROEDER, P.L. Effect of bovine virus diarrhea-mucosal disease virus infection on salmonella infection in calves. **Research Veterinary Science**, v.42, p.213-218, 1987.
- WYLER, R.; ENGELS, M.; SCHWYZER, M. Infectious bovine rhinotracheitis/vulvovaginitis. In: G. Wittmann (Editor), *Herpesvirus Diseases of Cattle, Horses and Pigs*. Kluwer Academic Publishers, Boston, Dordrecht, London. p. 1-72, 1989.
- ZHANG, G.; ALDRIDGE, S.; CLARKE, M.C.; McCAULEY, J. Cell death induced by cytopathogenic bovine viral diarrhea virus is mediated by apoptosis. **Journal of General Virology**, v.77, p. 1677-1681, 1996.
- ZUÑIGA, A.; OSSA, J.; HINCAPIÉ, O. Prevalência de rinotraqueíte infecciosa bovina em reprodutores del Urabá antioqueño para 1977. **Vet. Col. Cienc. Pec.**, v.1, p. 135-148, 1978.