



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

GISELE DA SILVA PORTO

**VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA E HERPESVÍRUS
LINFOTRÓPICO SUÍNO EM JAVALIS DE VIDA LIVRE (SUS
SCROFA LINNAEUS, 1758) PROVENIENTES DE
FRAGMENTOS DE MATA ATLÂNTICA**

Londrina
2021

GISELE DA SILVA PORTO

**VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA E HERPESVÍRUS
LINFOTRÓPICO SUÍNO EM JAVALIS DE VIDA LIVRE (SUS
SCROFA LINNAEUS, 1758) PROVENIENTES DE
FRAGMENTOS DE MATA ATLÂNTICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Ciência Animal (Área de Concentração: Sanidade
Animal) da Universidade Estadual de Londrina como
requisito parcial para obtenção do título de Doutora
em Ciência Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Alice Fernandes Alfieri

Coorientador: Prof. Dr. Amauri Alcindo Alfieri

Londrina
2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

G532 Porto, Gisele da Silva.
Vírus da diarreia viral bovina e herpesvírus linfotrópico suíno em javalis de vida livre (*Sus scrofa* Linnaeus, 1758) provenientes de fragmentos de Mata Atlântica / Gisele da Silva Porto. - Londrina, 2021.
116 f. : il.

Orientador: Alice Fernandes Alfieri.
Coorientador: Amauri Alcindo Alfieri.
Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2021.
Inclui bibliografia.

1. suíno asselvajado - Tese. 2. pestivírus - Tese. 3. gammaherpesvirus - Tese. 4. saúde animal - Tese. I. Alfieri, Alice Fernandes. II. Alfieri, Amauri Alcindo. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. IV. Título.

CDU 63

GISELE DA SILVA PORTO

**VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA E HERPESVÍRUS
LINFOTRÓPICO SUÍNO EM JAVALIS DE VIDA LIVRE (SUS
SCROFA LINNAEUS, 1758) PROVENIENTES DE
FRAGMENTOS DE MATA ATLÂNTICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Ciência Animal (Área de Concentração: Sanidade
Animal) da Universidade Estadual de Londrina como
requisito parcial para obtenção do título de Doutora
em Ciência Animal.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Alice Fernandes Alfieri
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Virgínia Santiago Silva
Embrapa Suínos e Aves

Profa. Dra. Elis Lorenzetti
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Mário Luís Orsi
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Éverson Zotti
Pontifícia Universidade Católica do Paraná -
PUCPR

Profa. Dra. Raquel Arruda Leme
Dechra Brasil Produtos Veterinários

Profa. Dra. Alais Maria Dall Agnol
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 01 de outubro de 2021.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Virologia Animal e Laboratório Multiusuário em Saúde Animal – Unidade de Biologia Molecular, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de doutora em Ciência Animal pelo Programa de Pós-graduação em Ciência Animal (Área de Concentração: Sanidade Animal), sob a orientação da Profa. Dra. Alice Fernandes Alfieri.

Os recursos financeiros para o desenvolvimento do projeto foram obtidos junto às agências e órgãos de fomento à pesquisa, abaixo relacionados:

1. **CNPq:** Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/MCT
2. **CAPES:** Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/MEC
3. **FAP/PR:** Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná/SETI
4. **FINEP:** Financiadora de Estudos e Projetos/MCT
5. **INCT-Leite:** Instituto Nacional da Ciência e Tecnologia para a Cadeia Produtiva de Leite - UEL

Dedico este trabalho a **Geni da Silva Porto** (*in memoriam*). Mãe, amiga, protetora e o maior apoio que já recebi em minha vida acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Ao Comitê de orientação, Profa. Dra. **Alice Fernandes Alfieri** e Prof. Dr. **Amauri Alcindo Alfieri**, pela oportunidade de realizar esse curso e pelas orientações para o desenvolvimento dessa tese. Foi nítido o carinho que tiveram para com a minha formação.

Ao professor e pesquisador Dr. **Mário Luís Orsi** pelos seus importantes ensinamentos e orientações sobre invasão biológica e ter me apoiado nessa jornada de busca de conhecimento sobre a invasão de javalis.

Às pesquisadoras, Dra. **Raquel de Arruda Leme** e Dra. **Alais Maria Dall Agnol** pelos ensinamentos e disposição em ajudar com os trabalhos desenvolvidos no Laboratório de Virologia Animal (UEL). Sinto imensa gratidão pelo que fizeram por mim.

Aos professores do curso e anterior a ele, que contribuíram para que eu chegasse até aqui.

Aos amigos e técnicos do Laboratório de Virologia Animal, pela amizade, conselhos e momentos de distração, vocês foram essenciais na minha jornada. Obrigada **Juliana Fritzen, Marcos Vinícius e Renilda** por tudo.

Aos amigos do Programa de Pós-Graduação Ciência Animal, em especial, **Nelson Rodrigues** pela companhia nos trabalhos de campo. Jamais esquecerei dessa colaboração. Aos que não citei o nome, saibam que eu sou grata pela amizade e companheirismo. Jamais esquecerei de vocês.

À **UEL** e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal por dar suporte para realização desta Pós-Graduação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**) pela concessão da bolsa de formação durante o curso de doutorado.

À Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal – UEL.

À secretária do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal – UEL, **Helenice Kieski**, por facilitar nossa vida acadêmica.

Aos **controladores de javalis** que contribuíram para o desenvolvimento dessa pesquisa, meus sinceros agradecimentos por se comprometerem em fazer o treinamento e coletarem as amostras biológicas e informações sobre os javalis.

À minha família pela força e carinho que sempre precisei e preciso.

Às minhas amigas, **Vanessa, Wérica, Tatiane, Angélica, Lídia e Daiana** pelo apoio que me deram, independentemente de onde estivessem.

Ao meu Irmão **Jairo Aparecido da Silva Porto** e ao amigo **Bruno do Carmo Santos** por me acompanharem nas coletas de materiais e investigações de campo que fiz nas fazendas Camargo de Anchieta e Esperança, respectivamente. Vocês fizeram parte da minha segurança em campo.

Agradeço a todos que me ajudaram direta e indiretamente a completar esse estudo, incluindo os proprietários das fazendas que permitiram que eu pudesse realizar a pesquisa. Tenham certeza que sem a contribuição de cada um seria quase impossível concretizá-lo.

Agradeço aos professores presentes na minha apresentação do projeto em busca de um orientador, a cada um de vocês minha gratidão. Mas meu maior agradecimento vai para a professora **Alice** por ter aberto as portas do Laboratório de Virologia Animal para mim e me conduzido nessa jornada maravilhosa que foi o meu doutoramento.

Ao Laboratório de Ecologia de Peixes e Invasão Biológica por todo apoio, principalmente ao técnico **Aparecido de Souza** (Cidão) por ter me auxiliado na jornada de encontrar propriedades rurais parceiras da pesquisa.

Tatiana Carolina Gomes Dutra de Souza, minha companheira de luta! Fazer o doutorado com você foi uma honra e um presente. Você, com sua garra e contatos maravilhosos me ajudou com materiais que sozinha seria muito mais difícil conseguir. Gratidão.

Minha mais sincera gratidão a todos. Sem vocês meus dias de doutoramento seriam muito mais difíceis.

Eu sou parte de uma equipe. Então, quando venço, não sou eu apenas quem vence. De certa forma termino o trabalho de um grupo enorme de pessoas!

Ayrton Senna

PORTO, Gisele da Silva. **Vírus da diarreia viral bovina e herpesvírus linfotrópico suíno em javalis de vida livre (*Sus scrofa* Linnaeus, 1758) provenientes de fragmentos de Mata Atlântica**. 2021. 116 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

RESUMO

Espécies não nativas invasoras têm se tornado um problema ambiental de interesse público. Quando somadas as suas distribuições exóticas e nativas o javali (*Sus scrofa*) é o suídeo com a maior distribuição geográfica do mundo. Os suínos asselvajados têm motivado estudos ambientais, sociais e sanitários, inclusive no Brasil, envolvendo principalmente o potencial de atuação desses animais como reservatório de doenças passíveis de serem transmitidas a animais silvestres, domésticos e humanos. A preocupação com o status sanitário das populações brasileiras de javalis de vida livre tem origem na característica continental e ambiental do país, que tem proporcionado a rápida dispersão desse invasor e, principalmente, pelo fato de javalis serem hospedeiros de doenças com alto impacto na saúde humana e animal. Considerando a capacidade de dispersão de javalis no ambiente natural e a possibilidade de contato com espécies domésticas de animais de produção, este estudo investigou a presença de pestivírus (vírus da diarreia viral bovina – BVDV) e gammaherpesvírus suíno (Herpesvírus linfotrópico suíno – PLHV) em javalis de vida livre provenientes das regiões Norte e dos Campos Gerais, no estado do Paraná, Brasil. Amostras de pulmões e soros de javalis abatidos por controladores colhidas entre 2017 e 2019 foram utilizadas para a investigação da presença de RNA de BVDV, de anticorpos anti-BVDV e de DNA de PLHV. Adicionalmente, pulmões e baços de seis fetos provenientes de uma fêmea abatida foram investigados quanto à presença de PLHV. No primeiro estudo, para investigação de BVDV, 49 amostras de pulmão foram avaliadas por RT-PCR para amplificação de um fragmento de 288 pb da região genômica 5'UTR e 42 amostras de soros pela técnica de vírusneutralização. Nenhuma das amostras de soro avaliadas apresentou anticorpos anti-BVDV. Porém, em três (6,12%) amostras de pulmão foi possível obter um fragmento do tamanho esperado para BVDV. Por meio de sequenciamento, uma cepa de BVDV foi classificada como subgenotipo 1a e duas cepas como subgenotipo 1d. No segundo estudo, 50 amostras de pulmões foram utilizadas para investigação da presença de DNA de PLHV a partir da amplificação do gene da DNA polimerase. Primeiramente, foram realizadas reações de PCR com primers consensuais (pan-herpesvírus) e, para classificação das espécies de PLHV-1, PLHV-2 e PLHV-3, novas reações de PCR foram feitas com primers específicos para amplificação de 393pb, 334pb e 148pb, respectivamente. DNA de PLHV foi amplificado em 48 (96%) das 50 amostras de pulmões analisadas, das quais, 33 (68,75%) amostras foram positivas para pelo menos duas espécies de PLHV. Apesar de serem provenientes de uma fêmea PLHV-positiva, as amostras de órgãos dos seis fetos analisadas foram negativas. O estudo permitiu concluir que i) ocorre circulação de BVDV em javalis de vida livre na região estudada; ii) as infecções por PLHV são endêmicas nessas populações; iii) e não há evidências de transmissão vertical de PLHV na fêmea avaliada. Esses resultados alertam sobre o potencial de javalis de vida livre atuarem como reservatórios e transmissores de doenças para animais de produção e evidenciam a importância do constante monitoramento sanitário desses animais.

Palavras-chave: suíno asselvajado; pestivírus; gammaherpesvírus; invasão biológica; saúde animal.

PORTO, Gisele da Silva. **Bovine viral diarrhea virus and porcine lymphotropic herpesvirus in free-living wild boars (*Sus scrofa* Linnaeus, 1758) from fragments of the Atlantic Forest.** 2021. 116 p. Thesis (Doctorate in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

ABSTRACT

Invasive alien species have become an environmental problem of public concern. When exotic and native distributions are added to each other, the wild boar (*Sus scrofa*) is the most geographically distributed pig in the world. Wild pigs have motivated environmental, social and sanitary studies, including in Brazil, mainly involving the potential of these animals to act as reservoirs of diseases that can be transmitted to wild, domestic and human animals. The concern with the sanitary state of the Brazilian wild boar populations originates from the continental and environmental characteristics of the country, which have allowed the rapid dispersion of this invader and, mainly, because wild boars are hosts of diseases with a high impact on human health and animal. Considering the wild boars ability to disperse in the natural environment and the possibility of contact with domestic species of farm animals, this study investigated the presence of pestiviruses (bovine viral diarrhea virus - BVDV) and porcine gammaherpesviruses (porcine lymphotropic herpesvirus - PLHV) in wild boars from the North and Campos Gerais regions, in the state of Paraná, Brazil. Lung and sérum samples from wild boar slaughtered by controllers collected between 2017 and 2019 were used to investigate the presence of BVDV RNA, anti-BVDV antibodies and PLHV DNA. In addition, the lungs and spleen of six fetuses from a battered woman were investigated for the presence of PLHV. In the first study, for the investigation of BVDV, 49 lung samples were evaluated by RT-PCR for amplification of a 288 bp fragment of the 5'UTR genomic region and 42 serum samples by the virus neutralization technique. None of the serum samples evaluated showed anti-BVDV antibodies. However, in three (6.12%) lung samples it was possible to obtain a fragment of the expected size for BVDV. Through sequencing, one BVDV strain was classified as subgenotype 1^a and two strains as subgenotype 1d. In the second study, 50 lung samples were used to investigate the presence of PLHV DNA in DNA polymerase gene amplification. First, PCR reactions were performed with consensus primers (pan-herpesvirus) and, to classify the species of PLHV-1, PLHV-2 and PLHV-3, new PCR reactions were performed with specific primers for amplification of 393bp, 334bp and 148bp, respectively. PLHV DNA was amplified in 48 (96%) of the 50 lung samples analyzed, of which 33 (68.75%) samples were positive for at least two species of PLHV. Despite coming from a female positive for PLHV, the organ samples from the six fetuses analyzed were negative. The study allowed us to conclude that i) there is circulation of BVDV in free-living wild boar in the studied region; ii) PLHV infections are endemic in these populations; iii) and there is no evidence of vertical transmission of PLHV in the individual evaluated. These results alert to the potential of free-living wild boar to act as reservoirs and transmitters of diseases for farm animals and highlight the importance of constant sanitary monitoring of these animals.

Key words: feral pig; pestivirus; gammaherpesvirus; biological invasion; animal health.

LISTA DE FIGURAS

REFERENCIAL TEÓRICO

- Figura 1** – Javali macho com características selvagens evidentes, como pelagem escura e presas salientes em fragmento de Floresta Estacional Semidecidual no norte do Paraná23
- Figura 2** – Esquema do genoma de Pestivirus. Adaptado de International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV, 2020b)32
- Figura 3** – Representação esquemática das ORFs do genoma de herpesvírus equino tipo 8 Fonte: Garvey e colaboradores (2018)40

ARTIGO A

- Figure 1** – Molecular phylogenetic analysis by maximum Likelihood method. Phylogenetic tree based on 252-bp length of the 5'UTR genomic region of three BVDV strains described in this study and 47 BVDV strains representatives of the different subgenotypes. The tree was constructed using maximum likelihood method and the Kimura two-parameter model using the Akaike information criterion (AIC). Bootstrap values were determined in 1000 replicates. Values of Bootstrap >50 are indicated at the internal nodes. The GenBank accession numbers of the strains are provided in parentheses, and the Brazilian BVDV strains identified in wild boars are marked with filled circles. Out-group: HoBi-like strain Th/04_KhonKaen (FJ040215) sequences..... 69
- Figure 2** – Molecular phylogenetic analysis by maximum likelihood method. Phylogenetic tree based on 209 bp of the 5'UTR of the three BVDV strains described in this study and representative strains of South America. 28 BVDV-1a strains from Brazil: UEL6-BR/11 (KJ188146), UEL7-BR/11 (KJ188147), UEL3-BR/07 (JQ513588), BR275 (U94915), EVI006 (KP715114), LV/Itabajara/12 (KP715118), LV/MDBK200/14 (KP715124), LV60-53/13 (KM007116), LV85-59/13 (KM007117), LV17-09/13 (KM007108), BRA_SV663/00 (KP715131) LV/LF43/12 (KP715121), SV239/05 (KP715130), LV11-65/13 (KM007106), LV/N614/13 (KP715125), R1935/72 (U94916), LV/LF79/12 (KP715123); from Chile: CH888 (AY671977), CHL1091 (JF759922), CHL921

(JF759941), CHL1068 (JF759942), CHLP28 (JF759943), and from Argentina: 318 (AF244958), 66.5 (AF244961), 14,109 (JX848363), 71,267 (JX848354), 8/346 (JX679699), 66.3 (AF244967). Four BVDV-1d strains from Brazil: UEL2-BR/07 (JQ513586), UEL11-BR/ 11 (KM982443), UEL6-BR/11 (KC562901), swine SUI_1 (MK334041). The strains representatives of BVDV1a were Singer_Arg (DQ088995), NADL (AJ133738), Oregon (Z79780), and BVDV-1d was F (AF298065). The tree was constructed using maximum likelihood method and the Tamura 3-parameter model with gamma correction (G+ I) was the best-fit model using the Akaike information criterion (AIC). Bootstrap values were determined in 1000 replicates. Values of Bootstrap >50 are indicated at the internal nodes. The GenBank accession numbers of the strains are provided in parentheses, and the Brazilian BVDV strains identified in wild boars are marked with filled circles. Out-group: HoBi- like strain Th/04_KhonKaen (FJ040215)..... 70

ARTIGO B

Figure 1 – Molecular phylogenetic analysis by Maximum Likelihood method. The phylogenetic tree with 37 strains of gammaherpesviruses was based on a 104 bp fragment of the DNA polymerase gene of each strain. Three PLHV strains are from Brazilian wild boar sampled in this study and are highlighted with a black-filled circle in the tree (PLHV-1/BRA-UEL/PR-WB53/2018, GenBank accession number MW19277); (PLHV-2/BRA-UEL/PR-WB6/2017, GenBank accession number MW19277); (PLHV-3/BRA-UEL/PR-WBA53/2018). The tree was constructed using the Maximum Likelihood method and Hasegawa-Kishino-Yano model with gamma correction (I) using the Akaike information criterion (AIC). Bootstrap values were determined for 1,000 replicates. Bootstrap values >40 are indicated at the internal nodes 94

Figure 2 – SDT matrix of pairwise identity scores generated by alignment of a 104 bp fragment of the DNA polymerase gene of 37 gammaherpesvirus strains. In this color-coded distance matrix, the colored cell represents the identity between two nucleotide sequences. Sequences were aligned by the CLUSTAL W program with Sequence Demarcation Tool version 1.2..... 96

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|----------|---|
| AC-ELISA | Ensaio imunoenzimático para a captura de antígeno (Antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay) |
| BVDV | Vírus da diarreia viral bovina (Bovine viral diarrhea virus) |
| CP | Citopático |
| CSFV | Vírus da peste suína clássica (Classical swine fever virus) |
| DM | Doença das mucosas |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico (Deoxyribonucleic acid) |
| DPI | Dia pós infecção |
| EBV | Vírus Epstein-Barr (Epstein-Barr virus) |
| EEEV | Vírus da encefalite equina oriental (East equine encephalitis virus) |
| HEV | Vírus da hepatite E (Hepatitis E virus) |
| HSV-1 | Herpesvírus simplex tipo 1 (Herpes simplex virus 1) |
| IAV | Vírus influenza A (Influenza A virus) |
| IFA | Teste de imunofluorescência (immunofluorescence assay) |
| IH | Teste de inibição da hemaglutinação (inhibition of haemagglutination) |
| MAT | Teste de aglutinação microscópica (Microscopic agglutination test) |
| MCF | Febre catarral maligna (Malignant catarrhal fever) |
| NCP | Não citopático |
| NCRs | Regiões não codificadoras (non-coding regions) |
| NSP | Proteína não estrutural (non structural protein) |
| OIE | Organização Mundial da Saúde Animal (World Organisation for Animal Health) |
| ORF | Sequência aberta de leitura (open reading frame) |
| PCR | Reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction) |
| PCV2 | Circovírus suíno 2 (Porcine circovirus 2) |
| PI | Persistentemente infectado |
| PLHV | Herpesvírus linfotrópico suíno (Porcine lymphotropic herpesvirus) |
| PRV | Vírus da pseudorraiva (Pseudorabies virus) |
| qPCR | PCR quantitativa (Quantitative PCR) |
| RNA | Ácido ribonucleico (Ribonucleic acid) |
| RT-PCR | Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (Reverse transcription-polymerase chain reaction) |

| | |
|------|--|
| SC | Santa Catarina |
| SP | São Paulo |
| WEEV | Vírus da encefalite equina ocidental (Western equine encephalitis virus) |
| UEL | Universidade Estadual de Londrina |
| VEEV | Vírus da encefalite equina do oeste (Venezuelan equine encephalitis virus) |
| VZV | Vírus varicella-zoster (varicella-zoster virus) |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|--|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 18 |
| 2 | REFERENCIAL TEÓRICO | 20 |
| 2.1 | PROCESSO DE INVASÃO BIOLÓGICA E SUAS CONSEQUÊNCIAS | 20 |
| 2.2 | JAVALI..... | 22 |
| 2.2.1 | O Papel do Javali Brasileiro na Saúde Animal e Humana: Estado da Arte | 26 |
| 2.3 | INFECÇÕES VIRAIS EM SUÍDEOS | 28 |
| 2.3.1 | Família Flaviviridae | 28 |
| 2.3.1.1 | Gênero pestivirus..... | 30 |
| 2.3.1.2 | Vírus da diarreia viral bovina..... | 34 |
| 2.3.1.3 | BVDV em suídeos..... | 37 |
| 2.3.2 | Família Herpesviridae | 39 |
| 2.3.2.1 | Gênero macavirus..... | 42 |
| 2.3.2.2 | Herpesvírus linfotrópico suíno | 42 |
| 3 | REFERÊNCIAS | 46 |
| 4 | HIPÓTESE | 64 |
| 5 | OBJETIVOS | 65 |
| 5.1 | OBJETIVO GERAL | 65 |
| 5.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 65 |
| 6 | ARTIGO A – DETECTION OF PESTIVIRUS A (BOVINE VIRAL DIARRHEA VIRUS 1) IN FREE-LIVING WILD BOARS IN BRAZIL.... | 66 |
| 7 | ARTIGO B – PORCINE LYMPHOTROPIC HERPESVIRUS DNA (GAMMAHERPESVIRINAE) IN FREE-LIVING WILD BOARS (SUS SCROFA LINNAEUS, 1758) IN BRAZIL..... | 73 |
| 8 | CONCLUSÕES | 97 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 9 | CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 80 |
| 10 | PERSPECTIVAS..... | 81 |
| | APÊNDICES..... | 82 |
| | APÊNDICE A – Sequências genômicas: BVDV e PLHV..... | 83 |
| | ANEXOS | 84 |
| | ANEXO A – Aprovação no Comitê de ética | 85 |
| | ANEXO B – Protocolo de técnicas | 86 |
| | ANEXO C – Softwares | 99 |

1 1 INTRODUÇÃO

2 Espécies que são transportadas para fora de suas áreas de
3 distribuição original e se comportam como invasoras, têm se tornado um problema
4 ambiental de interesse público (FUKANO; SOGA, 2019). As introduções acidentais
5 e/ou deliberadas são causadas pela sociedade e podem resultar em efeitos negativos
6 (MCGEOCH *et al.*, 2010; VITULE *et al.*, 2009), sendo considerada uma das principais
7 causas da perda de biodiversidade (MCGEOCH *et al.*, 2010), extinção local de
8 espécies (MANTOANI *et al.*, 2013) e comprometimento das funções do ecossistema
9 (GROSHOLZ, 2005). Dentre os fatores importantes do processo de invasão biológica
10 está o impacto de espécies invasoras na propagação de doenças (CROWL *et al.*,
11 2008), principalmente com a possibilidade da movimentação de espécies não nativas
12 como forma de disseminação de parasitas e microrganismos (BELLAY *et al.*, 2016;
13 HEDRICK, 1998).

14 O javali, *Sus scrofa* Linnaeus, 1758, é considerado um animal exótico
15 no Brasil, isto é, não pertence a fauna nativa (DEBERDT; SCHERER, 2007). Capaz
16 de se reproduzir a partir de cruzamentos com o suíno doméstico, *Sus scrofa domestica*
17 (Linnaeus, 1758), originando descendentes férteis (MIRANDA; LUI, 2003), é
18 considerado o mamífero invasor mais bem sucedido do mundo (DESBIEZ *et al.*, 2009),
19 principalmente pelo impacto econômico negativo devido a ataques a lavouras
20 (PEDROSA *et al.*, 2015). Esses animais podem atuar como reservatórios de doenças
21 humanas e de outras espécies animais (GORTÁZAR *et al.*, 2007; MENG; LINDSAY,
22 2009) representando potencial ameaça à fauna nativa (TRCKA *et al.*, 2006),
23 doméstica (JANSEN *et al.*, 2006) e à saúde pública (OKADERA *et al.*, 2013).
24 Adicionalmente, a capacidade de fácil adaptação a diferentes ambientes, a habilidade
25 de colonizar novos *habitat*, as altas taxas reprodutivas e a sua capacidade de
26 recuperar o declínio populacional são fatores que favorecem a disseminação de
27 microrganismo, como os patógenos virais (RUIZ-FONS *et al.*, 2008).

28 Tem sido demonstrado que javalis atuam como reservatórios e
29 disseminadores eficientes de patógenos virais para os suínos domésticos e
30 ruminantes domésticos e silvestres (MENG; LINDSAY, 2009; ZHANG *et al.*, 2019).
31 Agentes infecciosos de importância na área de produção animal, como é o caso do
32 vírus da peste suína clássica (*Classical swine fever virus* - CSFV), vírus da doença de
33 aujeszky (MENG; LINDSAY, 2009), vírus da febre aftosa (SMITH *et al.*, 2014), vírus

34 da diarreia viral bovina (*bovine viral diarrhoea virus* - BVDV) (KIRKLAND *et al.*, 2019) e
35 herpesvírus linfotrópico suíno (Porcine lymphotropic herpesviruses - PLHV)
36 (CHMIELEWICZ *et al.*, 2003), entre outros, podem ser encontrados em javalis de vida
37 livre, em locais onde a doença é endêmica. Considerando o rápido e crescente
38 aumento populacional de javalis no Brasil, estudos epidemiológicos envolvendo a
39 avaliação do potencial destes animais de atuarem como reservatórios e
40 disseminadores de patógenos são importantes para a tomada de decisões no controle
41 e erradicação tanto de javalis quanto de doenças de importância para a saúde animal
42 e para a saúde pública.

43 2 REFERENCIAL TEÓRICO

44 2.1 PROCESSO DE INVASÃO BIOLÓGICA E SUAS CONSEQUÊNCIAS

45 O termo “espécie invasora” descreve uma espécie não nativa, isto é,
46 incomum a um determinado ambiente que, claramente, exerce algum impacto
47 negativo (DAVIS *et al.*, 2018). O conceito sólido de invasão biológica data de poucas
48 décadas, o que nos leva a pensar ser um problema apenas nos dias de hoje. Porém,
49 evidências demonstram que os seres humanos, já há 40-50 mil anos, percorriam
50 distâncias de centenas de quilômetros (BALTER, 2007). Consequentemente, os
51 movimentos resultaram na introdução de organismos animais e vegetais que foram
52 transportados, como por exemplo, roedores, suínos e répteis (MCGEOCH *et al.*,
53 2010). No entanto, a taxa de introdução moderna não se compara a outros eventos
54 históricos ou naturais (VITULE; PRODOCIMO, 2012).

55 Atualmente, fenômenos como a globalização, o aumento da
56 população e o livre comércio têm propiciado as invasões biológicas via agricultura,
57 aquicultura, controle biológico, plantas ornamentais, *pets*, incrustação e água de lastro
58 (MANCHESTER; BULLOCK, 2000), bem como espécies transportadas para
59 interesses cinegéticos (NOGUEIRA-FILHO *et al.*, 2009) de forma não mensurável.
60 Uma grande parte das espécies não nativas, que se espalharam rapidamente, está
61 produzindo impacto negativo considerável, seja econômico, ecológico ou na saúde
62 (DAVIS, 2009).

63 Quanto à terminologia, uma espécie não nativa, também chamada de
64 não indígena, pode ser classificada de duas principais maneiras: quando tem origem
65 em outro país, popularmente chamada de exótica, ou quando é alóctone a uma
66 determinada região dentro do território nacional (BLACKBURN *et al.*, 2011). Essas
67 terminologias são importantes para a aplicação de medidas em caráter de
68 abrangência nacional para proteção da fauna silvestre nativa, isto é, o táxon nativo e
69 restrito a uma determinada área geográfica (BLACKBURN *et al.*, 2011; KOLAR;
70 LODGE, 2001).

71 Para o processo de invasão biológica ser considerado completo, a
72 espécie introduzida deve passar por diferentes transições como transporte,
73 introdução, estabelecimento e propagação (KOLAR; LODGE, 2001; LOCKWOOD *et al.*,
74 2007). O processo é considerado finalizado se a espécie com potencial invasor

75 introduzida em um novo ambiente consegue se estabelecer e manter populações
76 viáveis (SIMBERLOFF, 2009) com posterior expansão (BLACKBURN *et al.*, 2011).

77 De acordo com os princípios ecológicos, uma espécie não será capaz
78 de invadir ambientes com condições consideradas fora de seu nível de tolerância
79 fisiológica ou ocupar o mesmo nicho de espécies nativas, a menos que este nicho
80 esteja suficientemente disponível (DERIVERA *et al.*, 2005; LOCKWOOD; SOMERO,
81 2011; AZZURRO *et al.*, 2014). No entanto, estudos sobre espécies não nativas
82 invasoras vegetais e animais destacam a alteração na composição de espécies
83 nativas, interferindo tanto na riqueza quanto na sua abundância (GROSHOLZ, 2005;
84 MANTOANI *et al.*, 2013; STANDISH, 2002), de forma que a estrutura da comunidade
85 é modificada (VITULE; PRODOCIMO, 2012).

86 A invasão biológica conduz a dinâmica ecológica em múltiplas
87 escalas espaciais e níveis de organização por meio de extinções locais e regionais de
88 espécies nativas (BLACKBURN *et al.*, 2014; MACK *et al.*, 2000). Essas alterações
89 ambientais observadas evidenciam o quanto uma espécie invasora favorece o
90 estabelecimento de outras e aumenta a taxa de novas introduções (GROSHOLZ,
91 2005; VITULE; PRODOCIMO, 2012).

92 Espécies invasoras são altamente eficientes na competição por
93 recursos e têm alta capacidade reprodutiva e de dispersão (VITULE; PRODOCIMO,
94 2012). Devido a essas características, passam a dominar o ambiente e causar danos
95 às espécies nativas e ao ecossistema, levando a uma condição ecologicamente
96 inferior a original, com perda de diversidade de espécies e de processos ecológicos
97 (MANTOANI *et al.*, 2013; MCGEOCH *et al.*, 2010; VITULE *et al.*, 2009), resultando na
98 homogeneização biológica global, isto é, diminuição do endemismo nos biomas
99 (MACK *et al.*, 2000).

100 Outro aspecto importante é o impacto de espécies invasoras na
101 propagação de doenças (CROWL *et al.*, 2008). A transmissão de doenças às espécies
102 nativas é uma das causas da substituição ou extinção local dessas espécies
103 (MARTIN-ALBARRACIN *et al.*, 2015). Como exemplo, estudos relatam que o declínio
104 da espécie *Sciurus vulgaris* Linnaeus, 1758, ou esquilo vermelho, na Grã-Bretanha
105 está associado à propagação da doença causada por poxvírus de esquilo, (squirrel
106 poxvirus - SQPV) derivada dos esquilos cinzentos (*Sciurus carolinensis* Gmelin,
107 1788), espécie invasora que se encontra em expansão em detrimento da espécie
108 nativa (GURNELL *et al.*, 2006; RUSHTON *et al.*, 2006).

109 Nos últimos anos, o aumento nas taxas de doenças em populações
110 humanas (JONES *et al.*, 2008) e animais, incluindo zoonoses, tornou-se uma área
111 cada vez mais importante para a pesquisa (COSTA *et al.*, 2017). A partir dessas
112 observações, algumas hipóteses surgiram, como a possibilidade da movimentação de
113 espécies não nativas como forma de disseminação de parasitas e microrganismos
114 (BELLAY *et al.*, 2016; HEDRICK, 1998). Outras preocupações incluem a possibilidade
115 da transmissão interespécies desses agentes, assim como a circulação de agentes
116 patogênicos mais virulentos em novos hospedeiros, que devido à falta de imunidade
117 inata em comparação com o hospedeiro original são mais suscetíveis às doenças
118 (MURRAY; PEELER, 2005; PEELER *et al.*, 2011; RICCIARDI *et al.*, 2017).

119 Dessa forma, compreender a espécie invasora como potencial
120 dispersor de patógenos resulta na prevenção do surgimento de doenças que afetam
121 não só a saúde humana, animal e o seu bem-estar, mas também as funções do
122 ecossistema (CROWL *et al.*, 2008). Estudos de espécies não nativas são relevantes
123 para a compreensão de questões e gestão a longo prazo (KOLAR; LODGE, 2001).
124 Deve-se considerar o potencial invasor de cada espécie não nativa, juntamente com
125 mudanças ambientais ou climáticas (ZHAO; FENG, 2015), já que as condições
126 abióticas associadas à plasticidade espécie-específica facilitam o processo de
127 colonização, onde as espécies invasoras podem se adaptar a diferentes *habitat*
128 (VILELA; DEL-CLARO, 2011; VILELA; DE FARIA, 2004).

129 2.2 JAVALI

130 *Sus scrofa* pertence a ordem Cetartiodactyla e família Suidae, com
131 distribuição original na Europa, Ásia e Norte do continente Africano (BARRIOS-
132 GARCIA; BALLARI, 2012; DEBERDT; SCHERER, 2007). Uma das primeiras espécies
133 a ser domesticada no mundo, o javali é conhecido também como suíno do velho
134 mundo e porco selvagem eurasiático, ou, ainda, como suíno selvagem, porco feral
135 (KEITER; MAYER; BEASLEY, 2016), javali, suíno asselvajado e javaporco
136 (SALVADOR, 2017), na dependência das áreas de introdução desta espécie animal.
137 *S. scrofa* foi disseminado pelo homem para todos os continentes, principalmente na
138 forma doméstica, com exceção da Antártica por sua incapacidade de suportar
139 invernos rigorosos em climas polares (WEHR, 2020).

140 O processo de domesticação do javali possibilitou a perda de
141 características defensivas, como a diminuição do tamanho dos dentes caninos, a

142 substituição de padrões de pelos escuros por padrões mais claros e o aumento da
 143 taxa reprodutiva (WEHR, 2020). No entanto, o processo conhecido como feralização
 144 vem ocorrendo com a espécie, onde suínos domésticos são liberados na natureza de
 145 forma acidental devido a fugas de populações domesticadas ou de forma intencional
 146 quando animais são soltos para fins de caça (BARRIOS-GARCIA; BALLARI, 2012;
 147 WEHR, 2020). Esses suínos, ao tornarem-se asselvajados exibem o retorno das
 148 características morfológicas selvagens (WEHR, 2020) (Figura 1) e mantêm a
 149 capacidade de cruzamento com as populações mais antigas (GARCÍA et al., 2011;
 150 LARSON et al., 2005a; LARSON et al., 2005b).



151 **Figura 1:** Javali macho com características selvagens evidentes, como pelagem
 152 escura e presas salientes em fragmento de Floresta Estacional Semidecidual no
 153 norte do estado do Paraná. Fonte: o próprio autor.

154 A diferenciação fenotípica e genética entre os javalis (puros; nativos)
 155 e suínos domésticos levou alguns autores a separá-los em espécie e subespécie,
 156 respectivamente. O cariótipo de *Sus scrofa* é $2n:36$ cromossomos (DARRÉ et al.,
 157 1992), enquanto que o cariótipo de *Sus scrofa domestica* é $2n:38$. O desempenho
 158 reprodutivo de *S. scrofa* depende mais da sua massa corporal do que de sua idade
 159 (DESBIEZ et al., 2009), isto é, pode atingir maturidade sexual entre seis meses e um
 160 ano de idade (OLIVEIRA-SANTOS et al., 2011) e sua prole pode variar entre três a

161 cinco filhotes para animais puros (FONSECA *et al.*, 2011), enquanto que os suínos
162 domésticos são mais prolíferos que seus ancestrais.

163 O cruzamento entre espécie e subespécie origina animais híbridos,
164 denominados javaporcos, com $2n:37$ ou 38 cromossomos (MIRANDA; LUI, 2003).
165 Considerando que os animais híbridos podem apresentar ninhadas maiores, com
166 média de oito filhotes, e possibilidades superiores a 10 filhotes, duas vezes a cada 14
167 meses (SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE, 2013), a hibridização entre eles pode
168 aumentar o impacto da invasão desses ungulados.

169 No Brasil, hibridizações entre javalis puros e suínos domésticos foram
170 realizadas em criadouros especializados com intuito de aumentar a produtividade
171 (SILVA, 2007). Porém, como resultado, a qualidade da carne dos híbridos tornou-se
172 menor que a dos puros e o grau de pureza dos animais dos criadouros se tornou
173 duvidoso (LUI, 2000), já que a importação de animais puros foi proibida pelo Instituto
174 Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA (IBAMA,
175 1998). No entanto, essa ideia de melhoramento da carcaça persiste até hoje entre
176 criadores de suínos de subsistência que capturam javalis selvagens para cruzamento
177 ou permitem que fêmeas de suínos cruzem com javalis de vida livre, atraídos pelo cio,
178 para a obtenção de plantel híbrido (SALVADOR; FERNANDEZ, 2014; SALVADOR,
179 2017; Comunicação pessoal), mesmo que essa prática contrarie as normas do IBAMA
180 (IBAMA, 2013, IBAMA, 2019).

181 Em ambiente natural, a hibridização desses suídeos ocorre de forma
182 descontrolada, tanto pelo escape de animais puros e híbridos de criadouros
183 (DEBERDT; SCHERER, 2007; GROSSI *et al.*, 2006), quanto pelo escape de suínos
184 provenientes de criação de subsistência.

185 No território brasileiro os animais possuem porte avantajado em
186 relação aos similares asselvajados da Austrália, Nova Zelândia, Havaí e da maioria
187 das ilhas oceânicas, podendo pesar até 250 kg (DEBERT; SCHERER, 2007). O
188 fenótipo dos animais de uma mesma população varia desde o silvestre, isto é,
189 pelagem escura com presença de crinas e pelos longos, cauda reta e altura dos
190 membros torácicos ligeiramente maior que os pélvicos (MIRANDA; LUI, 2003), a
191 fenótipo intermediário e fenótipo de suínos domésticos, tais como, cauda enrolada,
192 membros pélvicos ligeiramente maiores que os torácicos, pelos mais baixos e
193 coloração mais clara (SALVADOR; FERNANDEZ, 2014; SALVADOR, 2017).

194 A presença de leitões com listras bem definidas sugere uma

195 introdução recente de um fenótipo puro, como por exemplo, a invasão de javalis na
196 floresta de Araucária (Sul do Brasil) que data aproximadamente de três décadas,
197 representando claramente uma invasão recente de javalis da Eurásia, já que em
198 populações recentes a frequência desse fenótipo é baixa (SALVADOR; FERNANDEZ,
199 2014). No entanto, vale lembrar que mesmo conhecendo as características fenotípicas
200 de javalis de vida livre, as características genéticas e grau de pureza desses animais
201 continuam sendo desconhecidos, sendo necessária análise genética e de diversidade
202 para tal resposta (MIRANDA; LUI, 2003; SAGUA *et al.*, 2018; WEHR; HESS; LITTON,
203 2018).

204 No Brasil, a introdução de javalis ocorreu por exemplares que
205 atravessaram ou foram transportados com o propósito de criação ou cinegéticos do
206 Uruguai e Argentina para a região Sul do país e também por exemplares transportados
207 para fins de criação comercial e que ganharam a liberdade (DEBERDT; SCHERER,
208 2007; ROSA *et al.*, 2017). Importações de javalis puros originários da Europa e do
209 Canadá foram realizadas entre os anos de 1996 e 1997, destinados para criadouros
210 nos estados de São Paulo e Rio Grande do Sul (DEBERDT; SCHERER, 2007).
211 Indivíduos puros que ganharam a liberdade tornaram-se foco de introdução nas
212 regiões Sul, Sudeste e Nordeste (Bahia) do país (SALVADOR, 2017). Porém, casos
213 como solturas intencionais de javalis de criatórios (comunicação pessoal), tentativas
214 de cruzamentos entre puros e domésticos em criadouros precários e/ou não oficiais,
215 assim como o transporte de javalis puros e javaporcos para áreas onde a espécie não
216 é encontrada estão entre as fontes de introdução da espécie, acelerando o processo
217 de dispersão do javali por quase todo o território nacional (PEDROSA *et al.*, 2015;
218 SALVADOR, 2012, 2017; SALVADOR; FERNANDEZ, 2017).

219 O primeiro relato de introdução de javali no estado do Paraná na data
220 a década de 60 (1960), no município de Palmeira (MOURA-BRITTO; PATROCÍNIO,
221 2006); porém, a presença da espécie já foi documentada na maioria dos municípios
222 paranaenses (INSTITUTO HÓRUS DE DESENVOLVIMENTO E CONSERVAÇÃO
223 AMBIENTAL., 2020; PEDROSA *et al.*, 2015).

224 A dificuldade de contenção da espécie em criadouros mal construídos
225 e/ou administrados fez com que o estado do Paraná, juntamente com alguns outros
226 estados brasileiros, proibisse a criação de javalis, por meio da Portaria IBAMA nº 102,
227 de 15 de julho de 1998 (IBAMA, 1998). Após várias tentativas de implementar do
228 controle dos javalis por meio da caça (DEBERDT; SCHERER, 2007), em 2013 uma

229 Instrução Normativa (IN) criada pelo IBAMA decretou a nocividade, autorizou e
230 regulamentou o controle dos javalis em todo o território nacional (IBAMA, 2013). Em
231 2019, a IN 03/2013 foi atualizada, regulamentando as declarações de manejo e
232 métodos de controle (IBAMA, 2019).

233 O plano nacional de controle de javalis (SALVADOR, 2017)
234 implementado objetiva i) controlar a expansão de javalis para áreas ainda não
235 invadidas, pois o processo de invasão da espécie no Brasil é umas das mais recentes
236 e rápidas do mundo; ii) promover o controle de javalis em ambiente naturais tanto em
237 propriedades privadas, a partir de controladores previamente autorizados pelo IBAMA,
238 quanto em Unidades de Conservação (UC), com métodos de controle específicos para
239 as áreas protegidas.

240 Os impactos que justificam o monitoramento populacional, controle
241 e, quando possível, a erradicação de javalis incluem danos aos ecossistemas
242 aquáticos e terrestres, perdas econômicas devido a danos em culturas agrícolas, e
243 ataques a animais domésticos, com impactos sociais e sanitários envolvendo tanto a
244 saúde animal quanto a saúde humana (GORTÁZAR *et al.*, 2007; MENG; LINDSAY,
245 2009; OKADERA *et al.*, 2013; PEDROSA *et al.*, 2015). A suinocultura pode ser
246 considerada a área da produção animal mais ameaçada pela circulação livre de
247 javalis, já que esses animais são hospedeiros naturais ou esporádicos de vários
248 agentes etiológicos que ameaçam a sanidade de rebanhos suínos, somada à
249 capacidade de deslocamento por grandes áreas (MARTINS *et al.*, 2019).

250 2.2.1 O papel do javali brasileiro na saúde animal e humana: estado da arte.

251 As populações de javalis de vida livre têm sido alvo de estudos para
252 monitoramento populacional em várias regiões geográficas do Brasil (ARASAKI *et al.*,
253 2021; MORAIS *et al.*, 2019; PEDROSA *et al.*, 2015; SALVADOR; FERNANDEZ,
254 2014). Associado a esses estudos, o impacto sanitário também tem sido investigado,
255 já que uma gama de agentes etiológicos, principalmente na última década, vem sendo
256 pesquisada nesses animais. Na sequência é apresentada uma relação de agentes
257 etiológicos de interesse para a saúde animal e humana identificados em javalis de
258 vida livre já monitorados no Brasil (Quadro 1).

259
260

Quadro 1: Relação da presença de anticorpos e de agentes etiológicos identificados em javalis de vida livre no Brasil de acordo com a região geográfica e técnica de diagnóstico utilizada.

| Patógeno | Região geográfica | Técnica/Método de detecção | Referência |
|---|-----------------------------|----------------------------|------------------------------|
| Vírus | | | |
| Circovírus suíno 2, vírus da hepatite E, vírus influenza A | Sul | Sorologia | SEVERO <i>et al.</i> , 2020 |
| Vírus da pseudoraiça | Centro-Oeste | Sorologia | KMETIUK <i>et al.</i> , 2020 |
| Vírus da encefalite equina oriental | Centro-Oeste | Sorologia | KMETIUK <i>et al.</i> , 2020 |
| Vírus da diarreia viral bovina | Sul | RT-PCR | PORTO <i>et al.</i> , 2021 |
| Bactérias | | | |
| <i>Mycoplasma suis</i> | Sudeste | qPCR | DIAS <i>et al.</i> , 2019 |
| <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>M. colombiense</i> , <i>M. avium</i> , <i>M. parmense</i> , <i>M. mantenii</i> | Sul | PCR | LOPES <i>et al.</i> , 2021 |
| <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> , <i>Leptospira</i> spp. | Sul | Sorologia | SEVERO <i>et al.</i> , 2020 |
| <i>Leptospira</i> spp. | Sul e Centro-Oeste | MAT | MACHADO <i>et al.</i> , 2021 |
| <i>Rickettsia</i> spp. | Sul e Centro-Oeste | IFA | KMETIUK <i>et al.</i> , 2019 |
| Protozoários | | | |
| <i>Toxoplasma gondii</i> | Sul, Sudeste e Centro-Oeste | PCR, IH | BRANDÃO <i>et al.</i> , 2019 |
| <i>Toxoplasma gondii</i> | Sudeste | PCR, IFA | MACHADO <i>et al.</i> , 2021 |
| Nematóide | | | |
| <i>Metastrongylus</i> spp. | Sul | Necropsia | SEVERO <i>et al.</i> , 2020 |

261
262

Técnicas: PCR: Reação em cadeia da polimerase; qPCR: PCR quantitativa; MAT: Teste de aglutinação microscópica; IFA: Teste de imunofluorescência; IH: Teste de inibição da hemaglutinação.

263 Estudos envolvendo *Neospora caninum* (KMETIUK *et al.*, 2021),
264 vírus da encefalite equina do oeste (*Western equine encephalitis virus* - WEEV), vírus
265 da encefalite equina venezuelana (*Venezuelan equine encephalitis virus* - VEEV)
266 (KMETIUK *et al.*, 2020), CSFV e *Brucella* spp. (GALVANI *et al.*, 2019) foram realizados
267 e, até o momento, estes agentes etiológicos não foram detectados em populações de
268 javalis de vida livre. No entanto, o monitoramento destes e outros patógenos deve ser
269 contínuo em função da possibilidade de sua entrada em populações suscetíveis, e
270 principalmente com intuito de auxiliar em tomadas de decisões envolvendo o
271 gerenciamento e a destinação de carcaças de javalis de vida livre abatidos no Brasil.

272 2.3 INFECÇÕES VIRAIS EM SUÍDEOS

273 Uma variedade de agentes etiológicos virais pode infectar os
274 suídeos, tanto de forma comum quanto esporádica. Um levantamento dos principais
275 vírus que infectam suínos compilou aproximadamente 90 espécies virais distribuídas
276 em seis ordens, 23 famílias e 48 gêneros (ZHANG *et al.*, 2019). Os vírus, incluindo os
277 que acometem suínos domésticos e javalis, podem ser categorizados como vírus
278 “bate e corre” do inglês “*hit and run*”, e viroses que produzem infecções permanentes,
279 conhecidas como “infecta e persiste” (SCHWEIZER; PETERHANS, 2014). Os
280 mecanismos envolvidos no estabelecimento de infecções virais permanentes são os
281 mais variados, envolvendo desde formas de evasão do sistema imune, como ocorre
282 em algumas espécies de vírus da família *Flaviviridae*, gênero *Pestivirus*
283 (PETERHANS; SCHWEIZER, 2010), até formas de estabelecimento de estado de
284 latência, em que a expressão do gene viral é restrita e serve apenas para manter o
285 estado latente sem produção de vírus infeccioso, como nos herpesvírus
286 (METTENLEITER *et al.* 2019).

287 2.3.1 Família *Flaviviridae*

288 *Flaviviridae* é uma família que compreende vírus com genoma RNA
289 de fita simples, de polaridade positiva e, com tamanho de genoma que varia de 9.0-
290 13 kb (NEUFELDT *et al.*, 2018; SIMMONDS *et al.*, 2017). Esses pequenos vírus
291 envelopados, tipicamente esféricos, possuem entre 40 a 60 nm de diâmetro e infectam
292 principalmente mamíferos (incluindo humanos) e aves (SIMMONDS *et al.*, 2017). São
293 vírus responsáveis por causar doenças graves e mortalidade em hospedeiros

294 acometidos (MUKHOPADHYAY *et al.*, 2005). A família está subdividida em quatro
295 gêneros: *Flavivirus*, *Hepacivirus*, *Pegivirus* e *Pestivirus*, totalizando 89 espécies
296 (ICTV, 2020a).

297 O RNA genômico dos vírus da família *Flaviviridae* contém uma
298 única estrutura de sequência aberta de leitura - ORF (*open reading frame*) ladeada
299 por regiões não codificantes (*non-coding regions* - NCRs) nas extremidades 5' UTR e
300 3' UTR que formam estruturas secundárias específicas necessárias para a replicação
301 e tradução do genoma viral (ICTV, 2020a; SIMMONDS *et al.*, 2017). A ORF é dividida
302 em regiões que codificam proteínas estruturais (C, prM e E), localizadas na porção N-
303 proximal; e proteínas não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5),
304 na porção seguinte do genoma. Os vírions desta família possuem uma única proteína
305 do capsídeo (C) e duas (gêneros *Flavivirus*, *Hepacivirus* e *Pegivirus*) ou três (gênero
306 *Pestivirus*) proteínas de envelope (SIMMONDS *et al.*, 2017); não apresentam relação
307 antigênica entre os gêneros, no entanto, reatividade sorológica cruzada pode ser
308 observada entre os membros de cada gênero (ICTV, 2020a).

309 Somente o gênero *Flavivirus*, até o momento, possui 53 espécies
310 virais reconhecidas, das quais a maioria é transmitida por vetores artrópodes
311 hematófagos, como mosquitos e carrapatos (MUKHOPADHYAY *et al.*, 2005). Dentre
312 os vírus desse gênero, vírus da febre amarela (YFV), vírus da dengue (DENV) e vírus
313 da zika (ZIKV) são exemplos que acometem humanos; enquanto que vírus da
314 encefalite japonesa (JEV) acomete, além de humanos, equinos e suínos (BEST, 2016;
315 WILLIAMS *et al.*, 2019). Infecções por *Flavivirus* são agudas e autolimitantes e podem
316 variar de assintomáticas a sintomáticas com febre hemorrágica grave ou fatal, ou
317 doença neurológica como encefalites e meningites (NEUFELDT *et al.*, 2018).

318 Outras espécies da família *Flaviviridae* estão incluídas nos gêneros
319 *Pestivirus* (11 espécies; *Pestivirus A-K*); *Hepacivirus* (14 espécies; *Hepacivirus A-N*)
320 e *Pegivirus* (11 espécies; *Pegivirus A-K*). Esses vírus apresentam importância tanto
321 para a saúde animal, como as pestiviroses que infectam suínos e ruminantes,
322 incluindo bovinos, ovinos, caprinos e ruminantes selvagens, quanto para a saúde
323 humana, como as doenças causadas por *Hepacivirus B* e *C*, que causam doença
324 hepática progressiva (SIMMONDS *et al.*, 2017).

325 2.3.1.1 Gênero *Pestivirus*

326 Pesticírus são vírus com forma aproximadamente esférica, com
327 diâmetro de 40-60 nm, e possuem na superfície do envelope do vírion, subunidades
328 em forma de anel de 10-12 nm (ICTV, 2020b). Como característica de um vírus
329 envelopado, os pesticírus são muito sensíveis a detergentes e solventes lipídicos, são
330 relativamente sensíveis a temperaturas superiores a 60 °C e/ou aos efeitos de pH
331 básico. No entanto, a inativação viral pode ser diferente entre as espécies do gênero
332 (KIRKLAND *et al.*, 2019), e tende a ser mais resistente ao pH ácido do que outros
333 gêneros dessa família (TAUTZ; TEWS; MEYERS, 2015).

334 Doze genes precursores de proteínas, codificam uma única
335 poliproteína e estão arranjados na seguinte ordem: 5'UTR - N^{pro} / C / E^{ms} / E1 / E2 /
336 p7 / NS2 / NS3 / NS4A / NS4B / NS5A / NS5B - 3' UTR (Figura 2). Os genes N^{pro} e
337 E^{ms} são exclusivos do gênero *Pestivirus* (ICTV, 2020b; MEYERS; THIEL, 1996). A
338 ORF é precedida por uma região não traduzida altamente conservada (5'UTR) de 361
339 a 386 bases (WOLFMEYER *et al.*, 1997). Esta região do genoma, juntamente com
340 outros genes, N^{pro} e E2 são usados para identificação genética dos pesticírus,
341 enquanto que para BVDV, sequências parciais de 5'UTR têm sido usadas com mais
342 frequência para análises filogenéticas e genotipagem de isolados (WANG *et al.*, 2020).

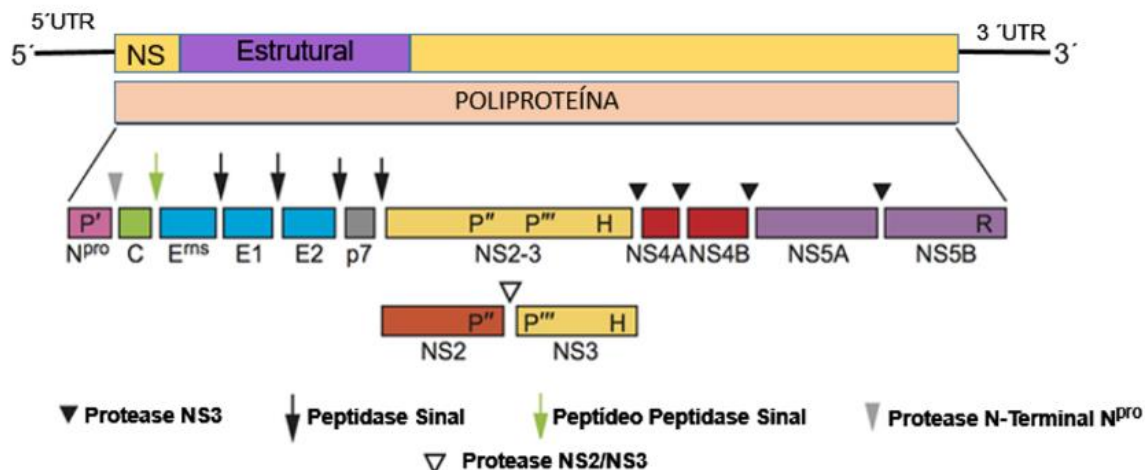
343 A primeira proteína codificada, N^{pro}, protease N-terminal, é uma
344 proteína não estrutural (NS) que se desprende por auto-proteólise a partir da
345 poliproteína nascente por clivagem no local N^{pro} / C gerando, assim, a extremidade
346 amino terminal da proteína C (TAUTZ *et al.*, 2015). Estudos sugerem que a proteína
347 N^{pro} funciona para bloquear a produção de interferon, direcionando a degradação
348 proteossômica de IRF-3, um importante indutor da produção de interferon em células
349 infectadas por vírus (NEILL, 2013).

350 As quatro proteínas seguintes do genoma (C / E^{ms} / E1 / E2) são
351 estruturais e possuem funções como revestimento do RNA viral e controle de entrada
352 e saída das partículas virais das células infectadas (ICTV, 2020b; KREY *et al.*, 2012;
353 TAUTZ *et al.*, 2015). As proteínas estruturais são incorporadas em diferentes locais
354 da partícula viral e possuem funções específicas, sendo elas, a proteína C, ou proteína
355 do capsídeo que encapsula, ou reveste, o RNA genômico para protegê-lo dentro da
356 partícula viral e as restantes, as glicoproteínas do envelope que são exibidas no
357 exterior da partícula do vírus (NEILL, 2013). As proteínas E1 e E2 são inseridas na

358 membrana por meio de trechos de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, enquanto
359 que a proteína E^{ms} não é inserida diretamente na membrana, ao invés disso, ela tem
360 um domínio C-terminal único que interage com a membrana externa fornecendo uma
361 ligação fraca, ou pode ser secretada na matriz extracelular (NEILL, 2013; TAUTZ *et*
362 *al.*, 2015).

363 As proteínas não estruturais N^{pro}, p7 e NS5B apresentam funções
364 relacionadas à replicação viral (ICTV, 2020b; KIRKLAND *et al.*, 2019; KREY *et al.*,
365 2012; TAUTZ *et al.*, 2015). A proteína p7 parece ser necessária para a produção de
366 vírus infecciosos, mas não para replicação de RNase, além disso, se cliva
367 ineficientemente de E2 por uma peptidase de sinal celular, de modo que é encontrada
368 nas células infectadas como p7 livre ou como E2-p7 mas não é encontrada associada
369 ao vírus livre, ao contrário, permanece associada à célula (NEILL, 2013).

370 As proteínas NS2 e NS3 são encontradas principalmente como NS2 /
371 3 não processada em células infectadas com vírus não citopáticos e principalmente
372 como NS2 e NS3 em células infectadas com vírus citopáticos (PETERHANS *et al.*,
373 2010; NEILL, 2013). A proteína NS2 é medida por uma atividade de protease e
374 contém dois peptídeos de sinal interno que são necessários para a translocação da
375 proteína para o retículo endoplasmático, enquanto que NS3 possui duas atividades
376 enzimáticas, a protease serina (terminal N), que é responsável por muitas clivagens
377 proteolíticas na poliproteína viral e RNA helicase (terminal C) que participa da
378 replicação do RNA, desenrolando o RNA para permitir que a transcrição ocorra
379 (NEILL, 2013; TAUTZ *et al.*, 2015). A proteína NS4a funciona como um cofator para a
380 serina protease NS3, já a NS4b está associada ao complexo de replicação de RNA e
381 está envolvida no rearranjo da membrana celular na célula infectada. As proteínas
382 NS5a e NS5b podem ser encontradas como clivada ou como NS5a-NS5b não clivada,
383 e seus papéis na replicação viral ainda são discutidos, porém NS5b, ou a RNA
384 polimerase dependente de RNA funciona como a principal proteína na replicação do
385 RNA genômico (NEILL, 2013).



UTR – Região não traduzida

386 **Figura 2:** Representação esquemática do genoma do gênero *Pestivirus*. Fonte:
387 Adaptado de *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV, 2020b).

388 Análises detalhadas de alguns pestivírus, de acordo com seu
389 comportamento em cultivo celular, permitiu separá-los em dois biótipos, denominados
390 citopáticos (CP), aqueles que induzem efeito citopático (ECP) e morte celular; e não
391 citopáticos (NCP), aqueles que se replicam nas células hospedeiras sem produzir
392 dano aparente à viabilidade celular ou redução na taxa de crescimento celular (TAUTZ
393 *et al.*, 2015). A virulência não é um fator a ser correlacionado com a citopatogenicidade
394 desses vírus, já que cepas do biotipo NCP são as mais virulentas (PETERHANS;
395 SCHWEIZER, 2010). Tanto a capacidade, quanto a forma de estabelecimento do ECP
396 variam entre as espécies de pestivírus, de modo que cepas CP de campo de CSFV e
397 vírus da doença da fronteira (*Border disease virus* - BDV) são mais raras de serem
398 identificadas quando comparadas com cepas CP de BVDV (PETERHANS *et al.*, 2010;
399 MEYERS; THIEL, 1996). Provavelmente devido a virulência das cepas NCP nesses
400 vírus e a interferência humana na disseminação de CSFV, por exemplo
401 (PETERHANS; SCHWEIZER, 2010).

402 Atualmente, das espécies que compõem o gênero *Pestivirus*, quatro
403 são as que anteriormente eram reconhecidas: *Pestivirus A* (BVDV-1); *Pestivirus B*
404 (BVDV-2); *Pestivirus C* (CSFV) e *Pestivirus D* (BDV) e, sete foram classificadas de
405 acordo com Smith *et al.* (2017), sendo *Pestivirus E* (vírus antílope pronghorn),
406 *Pestivirus F* (pestivírus suíno, vírus Bungowannah), *Pestivirus G* (pestivírus de girafa),
407 *Pestivirus H* (HoBi-like, pestivírus ruminante atípico), *Pestivirus I* (pestivírus

408 semelhante a Aydin, pestivírus de ovelha), *Pestivirus J* (pestivírus de rato) e *Pestivirus*
409 *K* (pestivírus atípico suíno) (ICTV, 2020b). Membros desse gênero estão claramente
410 mais relacionados aos hepacivírus do que aos demais gêneros da família a qual
411 pertencem (SCHWEIZER; PETERHANS, 2014).

412 Os pestivírus são agentes causadores de doenças com impactos
413 financeiros negativos significativos na pecuária de todo o mundo (MEYERS; THIEL,
414 1996), pois afeta rebanhos bovinos de leite e corte (MOENNIG; BECHER, 2018), além
415 de rebanhos suínos (DALL AGNOL *et al.*, 2020; KIRKLAND *et al.*, 2019). Em suínos,
416 CSFV que ocasiona uma doença hemorrágica grave, altamente contagiosa e de
417 notificação obrigatória pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), é o
418 pestivírus mais importante (HARDY *et al.*, 2020; KIRKLAND *et al.*, 2019). Entretanto,
419 pestivírus suíno atípico (*atypical porcine pestivirus* – APPV), que é um vírus associado
420 a tremor congênito em leitões, tem produzido impacto variado ao redor do mundo,
421 principalmente devido às taxas de mortalidade em leitões recém-nascidos (DALL
422 AGNOL *et al.*, 2020; PAN *et al.*, 2019).

423 A circulação de pestivírus em populações de animais selvagens, tem
424 sido motivo de preocupação quando o objetivo é impedir a transmissão e
425 disseminação desses vírus para rebanhos domésticos. Populações de suínos
426 selvagens tem sido relatadas como reservatórios de CSFV, sendo considerados um
427 importante fator para a persistência do vírus e motivo de dificuldade para controle da
428 doença (EDWARDS *et al.*, 2000; KIRKLAND *et al.*, 2019). A mesma preocupação
429 envolve APPV, que mesmo ainda não tendo sido documentada a transmissão entre
430 suínos selvagens e domésticos, essa hipótese não deve ser descartada (DALL
431 AGNOL *et al.*, 2020).

432 Ressalta-se ainda que a transmissão interespécies é conhecida,
433 principalmente envolvendo os pestivírus de ruminantes em suídeos, como por
434 exemplo, suínos infectados com BVDV e BDV, resultando no desenvolvimento de
435 doença, porém sem maiores impactos clínicos (KIRKLAND *et al.*, 2019). Mesmo os
436 pestivírus estando entre os mais difundidos de todos os vírus de animais domésticos
437 (SCHWEIZER; PETERHANS, 2014), evidências da replicação de pestivírus suínos –
438 CSFV- em bovinos não foram encontradas (TAO *et al.*, 2013; TAUTZ *et al.*, 2015).

439 2.3.1.2 Vírus da diarreia viral bovina

440 BVDV abrange dois tipos virais distintos, BVDV-1 (*Pestivirus A*),
441 classificado em 23 subgenotipos (1a – 1w) e BVDV-2 (*Pestivirus B*) em cinco
442 subgenotipos (2a–2e) (YEŞILBAĞ *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2020). BVDV é capaz de
443 infectar bovinos, ovinos (GRAHAM *et al.*, 2001), caprinos (MISHRA *et al.*, 2007),
444 bisões (DEREGT *et al.*, 2005), bubalinos (CRAIG *et al.*, 2008; PAIXÃO *et al.*, 2018),
445 suínos domésticos (MOSENAV *et al.*, 2020) e javalis (PORTO *et al.*, 2021; ŽUPANČIĆ
446 *et al.*, 2002).

447 BVDV está relacionado com problemas respiratórios, reprodutivos,
448 entéricos e imunossupressão em animais infectados provenientes de rebanhos
449 bovinos de corte e leite em todo o mundo (HOUE, 1999; RIDPATH, 2010). Devido à
450 grande diversidade subgenotípica, a infecção por BVDV é responsável por graves
451 perdas econômicas na pecuária mundial (HOUE, 1999; MOENNIG *et al.*, 2005), uma
452 vez que um mesmo rebanho pode ser infectado por vários subgenotipos, mesmo
453 quando regularmente vacinado (LINDBERG, 2003; OTONEL *et al.*, 2014). Perdas
454 diretas por BVDV são causadas principalmente por mortalidade, morbidade,
455 infertilidade, parto prematuro, natimortalidade e, abortamento, sendo comum
456 reinfecções. Esses fatores influenciam consideravelmente os valores das perdas
457 econômicas, que variam de US\$ 0,50 a 687,80 por animal, a depender do país a que
458 se refere (RICHTER *et al.*, 2017).

459 Mesmo os vírus BVDV-1 e BVDV-2 sendo genética e antigenicamente
460 diferentes, ambas as espécies possuem cepas CP e NCP (PETERHANS *et al.*, 2010).
461 No entanto, as cepas NCP são responsáveis pela maioria das infecções naturais
462 (EVANS *et al.*, 2019), denominadas como infecções transitórias, isto é, são infecções
463 agudas com viremia transitória que inicia aproximadamente três dias após a infecção
464 e perdura até o desenvolvimento da imunidade, geralmente duas semanas pós-
465 infecção (LANYON *et al.*, 2014).

466 A infecção de vacas por BVDV entre 29 a 41 dias pós-concepção pode
467 levar à morte embrionária. Já, a infecção entre o segundo e o quarto mês de gestação
468 com cepas NCP de BVDV pode resultar em infecção persistente do feto (LANYON *et al.*,
469 *et al.*, 2014; PETERHANS *et al.*, 2010) e em nascimento de bezerros imunotolerantes e
470 persistentemente infectados (PI). Animais PI excretam o vírus em todas as secreções
471 e excreções durante toda a vida e são os principais transmissores/disseminadores do

472 vírus em um rebanho infectado (PECORA *et al.*, 2014). Bovinos PI podem apresentar
473 baixo ganho de peso, infecções secundárias recorrentes e/ou desenvolver doença das
474 mucosas (DM) que é uma doença com alta letalidade e implicações no bem-estar
475 animal (EVANS *et al.*, 2019; LAVEN, 2008). A DM, desencadeada principalmente em
476 indivíduos com idade superior a sete meses, ocorre quando em um animal PI é
477 infectado por uma cepa CP de BVDV (LANYON *et al.*, 2014). A origem dessa cepa
478 pode ser outro animal contactante ou do próprio animal PI decorrente de uma mutação
479 da cepa NCP, a qual ele é imunotolerante, em uma cepa CP (MEYERS; THIEL, 1996).

480 Além de bovinos, infecção persistente por BVDV foi demonstrada
481 também em outras espécies, incluindo animais selvagens (PATON; DONE, 1994;
482 RIDPATH, 2012). Porém, mesmo com abundantes evidências de que os pestivírus
483 atualmente circulam em populações de animais selvagens, estudos epidemiológicos
484 são escassos e o impacto da exposição e prevalência dessas infecções são
485 amplamente desconhecidos (RIDPATH; NEILL, 2016). Considerando as evidências
486 de que infecções por BVDV em animais silvestres resultam em consequências
487 semelhantes às observadas em animais domésticos (KHODAKARAM-TAFTI;
488 FARJANIKISH, 2017; VILČEK; NETTLETON, 2006), a detecção de animais PI em
489 populações de animais silvestres de vida livre tem relevância epidemiológica
490 equiparável ao monitoramento de PI em rebanhos de animais domésticos, pois os PIs
491 atuam como transmissores eficientes para manter o vírus em circulação (RIDPATH;
492 NEILL, 2016).

493 Em rebanhos, a avaliação da presença de BVDV nos animais é razão-
494 depende, de forma que para cada caso, como, doença das mucosas, problemas
495 reprodutivos, animais jovens com baixo ganho de peso e problemas de doenças
496 intercorrentes, a estratégia de triagem pode ser diferente (LAVEN, 2008). Devido à
497 importância na diferenciação de infecção aguda de uma persistente para a
498 identificação e remoção de animais PI, métodos de diagnóstico como isolamento viral
499 em cultivo celular, RT-PCR, imunohistoquímica (IHQ), ensaio imunoenzimático para
500 captura de antígeno (AC-ELISA) são comumente utilizados (KHODAKARAM-TAFTI;
501 FARJANIKISH, 2017).

502 O isolamento viral é um método virológico clássico empregado em
503 programas de controle e erradicação e consiste no isolamento de BVDV em cultivos
504 celulares a partir de linhagens celulares, como a linhagem de rim bovino Madin Darby
505 (MDBK) (SALIKI; DUBOVI, 2004). A caracterização do agente infeccioso nos aspectos

506 antigênicos e genotípicos é importante para a epidemiologia da doença (PECORA *et*
507 *al.*, 2014), porém para identificação de PI um novo teste RT-PCR deve ser realizado
508 após três semanas. O soro de bezerros jovens deve ser evitado para a identificação
509 de PI, pois anticorpos colostrais podem reduzir o número de partículas virais
510 circulantes (KHODAKARAM-TAFTI; FARJANIKISH, 2017). Adicionalmente, a
511 manipulação desses pestivírus em laboratório pode pôr em risco o isolamento viral
512 devido à contaminação cruzada (VILČEK; NETTLETON, 2006). Diante das restrições
513 apresentadas pelo método, mesmo que o isolamento viral seja considerado “padrão
514 ouro” para diagnóstico de BVDV, o uso de RT-PCR tem se tornado cada vez mais
515 comum, devido a sensibilidade, especificidade e rapidez no resultado do teste, ao
516 relativo baixo custo e por não se restringir a laboratórios com instalações adequadas
517 para cultivo de células (DUBOVI, 2013; LANYON *et al.*, 2014; SALIKI; DUBOVI, 2004).

518 Ao considerarmos a facilidade de amostragem e custo relativamente
519 reduzido, coloração IHQ de biópsias de pele é uma técnica sensível e específica que
520 detecta antígeno de BVDV e possibilita a identificação de animais PI (KHODAKARAM-
521 TAFTI; FARJANIKISH, 2017). O teste AC-ELISA é apresentado como um kit
522 comercial, que captura a glicoproteína E^{ms} que é uma proteína estrutural (envelope
523 viral) produzidas por células infectadas durante a replicação do vírus. Além do uso de
524 fragmentos da orelha como tecido-alvo, outros materiais biológicos como células
525 leucocitárias, plasma, soro e tecidos também podem ser utilizados (KHAN *et al.*, 2011;
526 KHODAKARAM-TAFTI; FARJANIKISH, 2017).

527 No entanto, quando o objetivo é detectar anticorpos de animais
528 expostos ao agente infeccioso por meio de uma exposição natural ou um protocolo de
529 imunização, a sorologia é o procedimento padrão sendo os testes de ELISA e de
530 vírusneutralização (VN) os mais difundidos (DUBOVI, 2013). Esses métodos
531 sorológicos são mais eficientes para avaliar a eficácia da vacina, a conformidade do
532 protocolo de vacinação e o *status* do rebanho quanto à exposição ao BVDV,
533 determinar se um bezerro possui anticorpos colostrais e, com exceção de animais PI,
534 associar BVDV aos sinais clínicos (DUBOVI, 2013; SALIKI; DUBOVI, 2004). Embora
535 a VN dificulte a comparação minuciosa entre resultados de diferentes laboratórios
536 devido à dificuldade na padronização dos testes, além de custo e tempo maior que os
537 testes de ELISA, a VN é o único teste que possibilita avaliar o *status* e títulos de
538 anticorpos neutralizantes em relação às variações de cepas que existem entre os
539 isolados de BVDV. A VN apresenta ainda vantagem adicional de possibilitar a

540 avaliação do perfil sorológico para BVDV em espécies não bovinas (DUBOVI, 2013).
541 Estudos da diversidade genética de BVDV em um mesmo rebanho
542 têm sido realizados, principalmente para avaliação das medidas profiláticas e
543 avaliação da eficiência dos protocolos vacinais (OTONEL *et al.*, 2014). Esses
544 programas de vacinação são empregados com o objetivo de prevenir a viremia, o
545 nascimento de animais PI e limitar a disseminação de BVDV e/ou outros patógenos
546 que podem estar associados ao BVDV, possivelmente devido ao comprometimento
547 do sistema imunológico do animal (FULTON *et al.*, 2009; NEWCOMER *et al.*, 2017;
548 OLIVEIRA *et al.*, 2020). Considerando que a grande diversidade molecular e
549 antigênica das cepas de campo de BVDV contribui com falhas vacinais,
550 principalmente com relação à prevenção de infecções embrionárias e fetais, todos os
551 esforços de controle devem ser acompanhados e monitorados por rígidos protocolos
552 de biossegurança externa e interna ao rebanho (MOENNIG; BECHER, 2018).

553 2.3.1.3 BVDV em suídeos

554 A presença de BVDV em suínos domésticos tem sido observada com
555 mais frequência, em razão da maior facilidade de obtenção de amostras biológicas
556 para análise em relação aos animais de vida livre. Mesmo que o foco do
557 monitoramento de BVDV seja maior em bovinos, vários estudos envolvendo suídeos
558 tem avaliado a presença de anticorpos anti-BVDV e de RNA viral (OLIVEIRA *et al.*,
559 2020).

560 Anticorpos anti-BVDV foram encontrados em suínos domésticos da
561 Noruega (LØKEN, *et al.*, 1991), Irlanda (GRAHAM *et al.*, 2001), Países Baixos
562 (LOEFFEN *et al.*, 2009), Polônia (LIPOWSKI, 2014), Brasil (GATTO *et al.*, 2017;
563 MOSENAV *et al.*, 2020) e javalis da Croácia (ŽUPANČIĆ *et al.*, 2002).

564 O RNA viral também foi detectado em suídeos de vários países. Na
565 Europa, os estudos envolveram suínos domésticos e javalis da Romênia (TURCITU
566 *et al.*, 2010; ANIȚĂ *et al.*, 2020) e javalis da Sérvia (MILIĆEVIĆ *et al.*, 2018). Na Ásia,
567 a presença de BVDV foi detectada em suínos domésticos da China (DENG *et al.*,
568 2012). Já na América do Sul, especialmente no Brasil, a investigação do RNA BVDV
569 envolveu suínos domésticos (MOSENAV *et al.*, 2020) e javalis de cativeiro (WEBER
570 *et al.*, 2016). Mais recentemente, RNA de BVDV foi identificado em javalis brasileiros
571 de vida livre (PORTO *et al.*, 2021), constituindo-se como o primeiro estudo a investigar

572 BVDV em javalis da natureza.

573 Inicialmente, acreditava-se que a infecção de suínos por BVDV
574 ocorresse principalmente pela proximidade com rebanhos bovinos (LOEFFEN *et al.*,
575 2009; TERPSTRA; WENSVOORT, 1997). Porém, a partir de um experimento
576 realizado com suínos infectados e não infectados por BVDV e a presença de baias
577 com fundo d'água, foi possível observar que os suínos podem se infectar por meio da
578 lâmina d'água contaminada (NASCIMENTO *et al.*, 2018). Levando em consideração
579 que suídeos domésticos e selvagens tem o hábito de usarem lâminas d'água para
580 troca de calor, BVDV pode ser disseminado para os indivíduos suscetíveis da
581 população pela contaminação do ambiente e não somente pelo contato físico entre os
582 indivíduos.

583 A presença de sinais clínicos e capacidade de BVDV causar doença
584 em suídeos ainda não é um consenso. Estudos observaram a presença
585 (NASCIMENTO *et al.*, 2018) ou não (ŽUPANČIĆ *et al.*, 2002) de sinais clínicos
586 ocasionados pela infecção experimental com o vírus em leitões. Diarreia, calafrios,
587 secreção nasal foi observada a partir do 15º dia pós infecção, quando comparados
588 aos leitões controle, coincidindo com o início da eliminação viral. Em observações de
589 campo, um estudo envolvendo suínos de várias províncias da China observou sinais
590 clínicos como aborto, hiperpirexia, diarreia e mortalidade neonatal (DENG *et al.*,
591 2012). Porém, a alta taxa de infecção mista envolvendo circovírus suíno tipo 2 (PCV2)
592 e CSFV podem ter contribuído para o aparecimento e agravamento dos sinais clínicos
593 e morte.

594 A capacidade de cepas NCP originar indivíduos PI em suídeos tem
595 sido pouco estudada e com resultados que sugerem pouca (TERPSTRA;
596 WENSVOORT, 1997) ou nenhuma capacidade de produzir infecção persistente
597 (GOMES *et al.*, 2019). Entretanto, são necessários mais estudos epidemiológicos
598 envolvendo o monitoramento de populações BVDV-positivas, principalmente em
599 animais de vida livre. Considerando que no Brasil o abate de javalis de vida livre é
600 permitido e incentivado, métodos investigativos mais invasivos como autópsia e RT-
601 PCR a partir de amostras de tecidos são excelentes para o monitoramento de BVDV
602 em populações de javalis de vida livre.

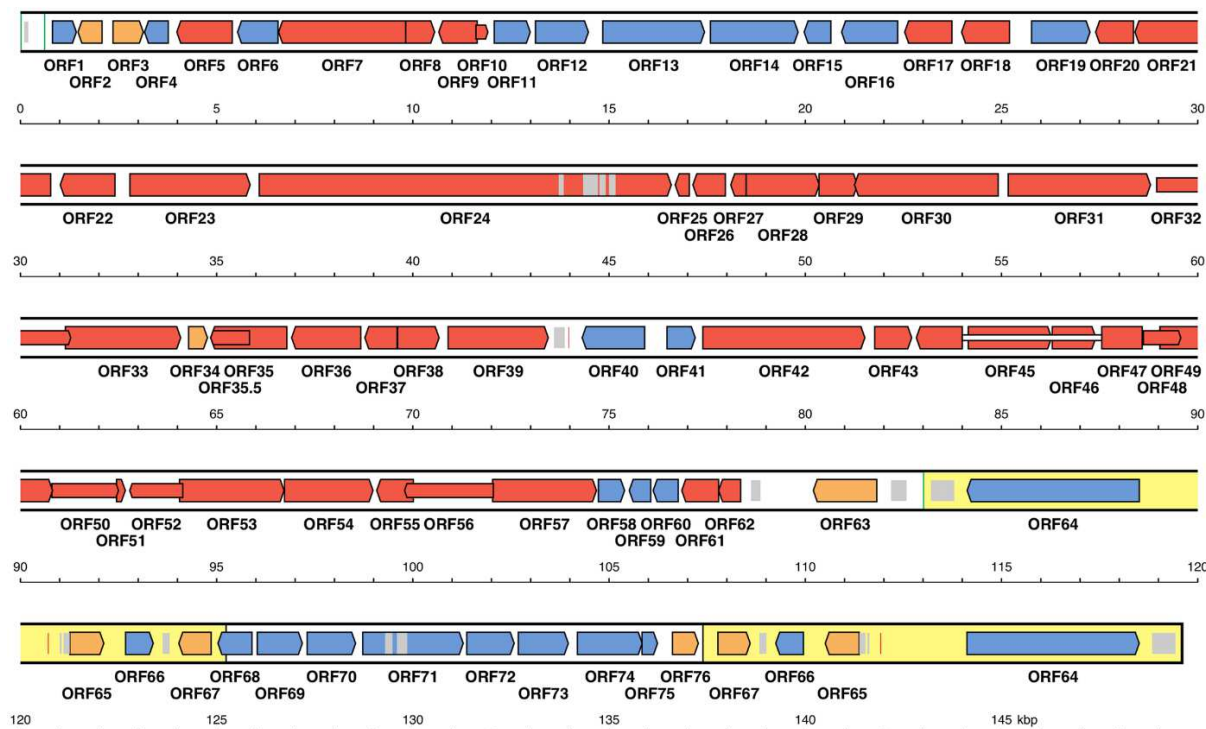
603 O monitoramento de BVDV em suínos, incluindo os asselvajados, é
604 importante (i) pela possibilidade do animal infectado apresentar sinais clínicos; (ii) pela
605 possibilidade de transmissão para outros indivíduos, principalmente em animais de

606 vida livre transeuntes que tem contatos com indivíduos de outras populações; (iii) pela
607 possibilidade de reatividade cruzada com CSFV, podendo levar a redução do tamanho
608 do surto de CSFV em rebanhos positivos e como consequência esse surto
609 autolimitado não ser percebido; e (iv) interferência de BVDV no diagnóstico de CSFV,
610 pois a presença de anticorpos anti-BVDV no soro suíno pode levar a resultados falso-
611 positivos em testes sorológicos para o diagnóstico de CSFV, ou a possibilidade de
612 também ocorrer o inverso (OLIVEIRA *et al.*, 2020; TAO *et al.*, 2013; WIERINGA-
613 JELSMA *et al.*, 2006).

614 2.3.2 *Herpesviridae*

615 Herpesvíroses são infecções causadas por vírus da ordem
616 *Herpesvirales*, que infectam uma grande variedade de animais, desde moluscos a
617 mamíferos (DAVISON *et al.*, 2009). Vírus dessa ordem são classificados em três
618 famílias, *Herpesviridae* (infectam répteis, aves e mamíferos), *Alloherpesviridae*
619 (infectam anfíbios e peixes) e *Malacoherpesviridae* (infectam bivalves) (DAVISON *et*
620 *al.*, 2009; METTENLEITER *et al.*, 2019). Especula-se que uma ou mais espécies de
621 herpesvírus tenha infectado cada espécie de vertebrado até o momento
622 (MACLACHLAN *et al.*, 2017).

623 *Herpesvirales* são vírus DNA de fita dupla, com 125-290 kbp e 120 a
624 260 nanômetros de diâmetro (ICTV, 2020d). Compartilham morfologia comum e são
625 constituídos por capsídeo icosaédrico contendo 161 capsômeros, que envolve o DNA,
626 circundado por uma camada de tegumento (matriz proteica) e um envelope
627 glicolipoproteico (DAVISON *et al.*, 2009; METTENLEITER *et al.*, 2006). O genoma
628 dessa ordem viral é dividido em 70-200 ORFs que codificam proteínas (Figura 3), além
629 de abrigam vários genes de microRNA e expressar numerosas transcrições
630 supostamente não traduzidas de função desconhecida (ICTV, 2020d).



631 **Figura 3:** Representação esquemática das ORFs do genoma de herpesvírus equino
 632 tipo 8 (EHV-8) Fonte: Garvey e colaboradores (2018).

633 A classificação dos herpesvírus é complexa (MACLACHLAN *et al.*,
 634 2017), pois a característica unificadora em toda a ordem *Herpesvirales* é a morfologia
 635 do vírion e não as características genéticas, de forma que membros de suas três
 636 famílias são muito distantes uns dos outros (PAYNE, 2017). Apesar disso, a ordem
 637 compartilha quatro genes conservados: DNA polimerase; subunidade ATPase da
 638 DNATERMINASE, proteína envolvida no empacotamento do DNA durante a maturação
 639 do vírion (DAVISON, 2002; PAYNE, 2017); Ribonucleotídeo redutase subunidade alfa
 640 e dUTP difosfatase (Figura 4) (ANDRADE-MARTÍNEZ *et al.*, 2019).

641 Herpesvírus estabelecem infecção vitalícia latente em seus
 642 hospedeiros (STACK *et al.*, 2012). A DNA polimerase viral é uma enzima chave na
 643 fase lítica da infecção por herpesvírus para garantir a replicação do genoma viral. As
 644 DNA polimerases são, portanto, alvos tanto para o desenvolvimento de inibidores
 645 potentes, quanto dos miRNAs virais, responsáveis pela inibição da DNA polimerase e
 646 implicados no estado de latência de alguns herpesvírus (ZARROUK *et al.*, 2017).

647 O sucesso dos herpesvírus é em grande parte devido à sua
 648 capacidade de estabelecer latência e de reativar, de maneira que o DNA viral é
 649 mantido de forma estável no núcleo da célula como múltiplas cópias circulares na
 650 forma episossomal fazendo com que o vírus estabeleça infecção persistente na célula,

651 sem neutralização pelo sistema imunológico (COHEN, 2020; METTENLEITER *et al.*,
652 2019). A análise do viroma humano permitiu a descoberta de alta prevalência desses
653 vírus em indivíduos assintomáticos, com algumas espécies estabelecendo infecções
654 crônicas em até 90% da população (ANDRADE-MARTÍNEZ *et al.*, 2019), como por
655 exemplo, o vírus Epstein-Barr (EBV), vírus varicella-zoster (VZV) e herpesvírus
656 simplex tipo 1 (HSV-1). No entanto, estas mesmas espécies também estão
657 relacionadas a várias doenças com impacto na saúde humana (VIRGIN *et al.*, 2009).

658 As diferentes interações observadas entre a espécie de herpesvírus
659 e o hospedeiro dependem do processo da infecção (aguda ou crônica) e do *status*
660 imunológico hospedeiro (indivíduos normais ou imunocomprometidos) (VIRGIN, 2014;
661 VIRGIN *et al.*, 2009). Devido às características do processo de infecção observadas
662 nas herpesviroses, um cenário de impacto sanitário e econômico é observado em
663 animais domésticos e de produção, já que pelo menos uma doença importante de
664 cada espécie de animal doméstico, é causada por herpesvírus, como por exemplo,
665 rinotraqueíte infecciosa bovina, pseudo-raiva ou doença de Aujeszky em suínos e
666 outros animais, rinotraqueíte viral felina e doença de Marek em galinhas
667 (MACLACHLAN *et al.*, 2017).

668 A família *Herpesviridae*, que compõe tanto os vírus de importância
669 animal quando humana, é dividida em três subfamílias: *Alphaherpesvirinae*,
670 *Betaherpesvirinae* e *Gammaherpesvirinae*. Muitos elementos do conteúdo e ordem
671 dos genes são conservados no nível da subfamília. Com isso, a classificação dos
672 membros da família *Herpesviridae* pode ser facilmente e confiavelmente realizada
673 atribuindo-os a uma das três subfamílias, com base nas relações entre qualquer uma
674 das várias proteínas conservadas, como por exemplo, a DNA polimerase (ICTV,
675 2020d).

676 O sítio de latência varia nas diferentes subfamílias de herpesvírus.
677 *Alphaherpesvirus* estabelece latência em neurônios; *Betaherpesvirus*, em células
678 tronco hematopoiéticas CD34+, células progenitoras mieloides CD34+ e monócitos
679 CD14 e CD4+; e *Gammaherpesvirus*, em linfócitos B (COHEN, 2020;
680 METTENLEITER *et al.*, 2019). Herpesvírus relevantes para suínos são encontrados
681 nessas três subfamílias, como por exemplo: *Suid alphaherpesvirus 1* (vírus da doença
682 de Aujeszky), *Suid betaherpesvirus 2* (citomegalovírus suíno) e *Suid*
683 *gammaherpesvirus 3* (herpesvírus linfotrópico suíno 1).

684 *Gammaherpesvirinae*, subfamília de interesse do presente estudo, é

685 dividida em quatro gêneros: *Lymphocryptovirus*, *Macavirus*, *Percavirus* e
686 *Rhadinovirus*. Os vírus distribuídos em cada gênero acometem uma ampla variedade
687 de espécies animais e as sequências de nucleotídeos ou deduzidas de aminoácidos
688 das espécies dos gêneros formam linhagens distintas no âmbito da subfamília (ICTV,
689 2020d). Membros dessa subfamília são mais restritos em relação a hospedeiros e
690 tipos de células que infectam do que vírus classificados nas outras subfamílias
691 (SPEAR; LONGNECKER, 2003). As infecções ocasionadas por espécies
692 classificadas na subfamília *Gammaherpesvirinae*, assim como aquelas ocasionadas
693 por vírus da subfamília *Betaherpesvirinae* frequentemente, mas não invariavelmente,
694 são clinicamente silenciosas, especialmente em mamíferos (MACLACHLAN *et al.*,
695 2017).

696 2.3.2.1 Gênero *Macavirus*

697 O gênero *Macavirus* compreende vírus que tem mamíferos como
698 hospedeiros. As espécies desse gênero podem ser distribuídas em duas categorias:
699 i) as que ocasionam infecções inaparentes, geralmente em seus hospedeiros
700 reservatórios; ii) as que determinam infecções linfoproliferativas fatais, como a febre
701 catarral maligna (MCF), que afeta ruminantes selvagens e domésticos e suínos,
702 porém geralmente é de baixa patogenicidade em hospedeiros naturais específicos
703 (CUNHA *et al.*, 2019; DAS NEVES *et al.*, 2020). Até o momento este gênero possui
704 nove espécies conhecidas: *Alcelaphine herpesvirus 1* (AIHV-1); *Alcelaphine*
705 *herpesvirus 2* (AIHV-2); *Bovine herpesvirus 6* (BoHV-6); *Caprine herpesvirus 2* (CpHV-
706 2); *Hippotragine herpesvirus 1* (HiHV-1); *Ovine herpesvirus 2* (OvHV-2); *Suid*
707 *gammaherpesvirus 3* (PLHV-1), *Suid gammaherpesvirus 4* (PLHV-2) e *Suid*
708 *gammaherpesvirus 5* (PLHV-3) (ICTV, 2020c; METTENLEITER *et al.*, 2019; ZHU *et*
709 *al.*, 2018).

710 2.3.2.2 Herpesvírus linfotrópico suíno

711 Herpesvírus linfotrópico suíno (*Porcine lymphotropic herpesvirus* –
712 PLHV) são vírus que acometem suídeos domésticos e silvestres (ICTV, 2020d). Em
713 suínos domésticos, até o momento foram detectados na Alemanha ((EHLERS *et al.*,
714 1999b; ULRICH *et al.*, 1999), França, Itália e Suécia (CHMIELEWICZ *et al.*, 2003;
715 FRANZO *et al.*, 2021), Brasil (DALL AGNOL *et al.*, 2020) e suínos miniatura

716 (miniporcosp) provenientes dos Estados Unidos (CHMIELEWICZ *et al.*, 2003). Nos
717 suídeos selvagens, PLHV-1 e PLHV-2 foram detectados em porco feral de vida livre
718 da Alemanha (ULRICH *et al.*, 1999), PLHV-1 em porcos barbudos (*Sus barbatus*
719 Müller, 1838) provenientes de zoológico do sudeste asiático, PLHV-1 e PLHV-3 em
720 *Phacochoerus africanus* (Gmelin, 1788) de vida livre de Zimbábue, PLHV-3 em
721 *Babyrousa babyrussa* (Linnaeus, 1758) provenientes de zoológicos europeus e do
722 sudeste asiático (EHLERS *et al.*, 2004).

723 PLHV-1 e PLHV-2 foram descritos pela primeira vez em 1999, em
724 amostras de sangue de suínos domésticos na Alemanha e amostras de baço e pulmão
725 de suínos domésticos da Espanha, com diferença entre os dois tipos virais de 7% em
726 análises de identidade de nucleotídeos e de 5% similaridade de aminoácidos nos
727 genes da DNA polimerases (EHLERS *et al.*, 1999b). Já PLHV-3 foi identificado em
728 sangue de suínos na Alemanha em 2003 e se mostrou mais distante dos tipos PLHV-
729 1 e PLHV-2, com 66% de identidade de nucleotídeos em sequências de DNA
730 polimerase (CHMIELEWICZ *et al.*, 2003).

731 A caracterização dos vírus foi realizada a partir de PCR que amplificou
732 genomas com 101 kbp, 68 kbp e 98 kbp para PLHV-1, PLHV-2 e PLHV-3,
733 respectivamente. Estes vírus, devido a não propagação em culturas de células, foram
734 detectados diretamente de amostras clínicas positivas. A partir de um linfonodo de
735 suíno miniatura acometido pela doença linfoproliferativa pós-transplante
736 (*Posttransplantation lymphoproliferative disease* - PTLD) foi detectado PLHV-1, já
737 PLHV-2 foi detectado inicialmente em uma tonsila de um javali e PLHV-3 em baço de
738 um suíno de abatedouro (GOLTZ *et al.*, 2002; LINDNER *et al.*, 2007; METTENLEITER
739 *et al.*, 2019). O gene da DNA polimerase tem sido utilizado para a caracterização do
740 vírus, pois contém regiões altamente conservadas, adequadas para o direcionamento
741 dos *primers* degenerados. Além de ser sequenciado com relativa frequência, gerando
742 informações sobre as sequências de nucleotídeos de várias cepas provenientes de
743 regiões geográficas distintas e que são disponibilizadas em bancos públicos de dados,
744 permitindo a realização de análises comparativas (EHLERS *et al.*, 1999b).

745 PLHV é frequentemente encontrado em suínos domésticos e porcos
746 ferais, com infecção persistente em linfócitos B e potencial linfoproliferativo
747 (CHMIELEWICZ *et al.*, 2003). A detecção pode ser feita em leucócitos sanguíneos,
748 que pode ser utilizado em diagnósticos de indivíduos vivos; em órgãos linforeticulares
749 (baço, nódulos linfáticos, amígdalas, medula óssea); pulmões (CHMIELEWICZ *et al.*,

750 2003; EHLERS *et al.*, 1999b; ULRICH *et al.*, 1999); coração, bexiga, rim, coração,
751 fígado e sistema nervoso central (DALL AGNOL *et al.*, 2020).

752 Muitos suínos apresentam infecções múltiplas por diferentes espécies
753 de PLHV e, devido à natureza degenerada e propriedades de ligação universal dentro
754 da família *Herpesviridae* dos *primers* consensus utilizados na PCR, são utilizados para
755 uma triagem inicial das amostras. Geralmente esses *primers* consensus amplificam
756 sequências de apenas um vírus a partir de uma infecção mista, o que inviabiliza o
757 diagnóstico específico (METTENLEITER *et al.*, 2019). Para diagnóstico simultâneo de
758 múltiplas infecções em uma única amostra são realizados ensaios de PCR com
759 *primers* específicos para cada espécie de PLHV (CHMIELEWICZ *et al.*, 2003;
760 EHLERS *et al.*, 1999b).

761 Ensaios sorológicos baseados em ELISA também são eficientes para
762 avaliar soropositividade de suínos de diferentes idades, com resultados compatíveis
763 com a taxa de animais positivos por PCR (BREMA *et al.*, 2008; METTENLEITER *et*
764 *al.*, 2019)

765 A principal via de transmissão de PLHV é a horizontal e, como
766 esperado para herpesvírus, ocorre principalmente pelo contato próximo,
767 particularmente contato entre mucosas (TUCKER *et al.*, 2003; MACLACHLAN *et al.*,
768 2017). O confinamento dos rebanhos domésticos também favorece a transmissão,
769 principalmente por espirros e dispersão de gotículas a curta distância, como
770 observado em outros gamaherpesvírus (DENNER, 2021; MACLACHLAN *et al.*, 2017).
771 No entanto, a transmissão vertical não foi descartada, até o momento, apenas um
772 estudo experimental avaliou a capacidade de transmissão transplacentária de PLHV
773 em leitões derivados de cesarianas, com resultados satisfatórios (1/33 animais
774 avaliados foi positivo) mas, exigências de biossegurança estritas são importantes
775 para evitar a transmissão horizontal desses animais negativos (TUCKER *et al.*, 2003).

776 Em condições naturais nenhuma doença clínica foi observada
777 envolvendo a infecção por PLHV (METTENLEITER *et al.*, 2019). Em estudo
778 experimental, PLHV-1 foi associado à PTLD em suínos miniatura submetidos a
779 transplante de células-tronco hematopoiéticas alógenas (HUANG *et al.*, 2001). A
780 participação de PLHV-1 em PTLD foi sugerida a partir da análise de sequência e
781 expressão gênica desse vírus, o que indicou que PLHV-1 estava ativo durante a PTLD
782 e pode estar envolvido na etiologia desta doença linfoproliferativa (GOLTZ *et al.*,
783 2002). Resultado semelhante foi observado em PTLD em humanos ocasionada pelo

784 EBV, um gammaherpesvirus humano (METTENLEITER *et al.*, 2019).

785 PLHVs são altamente prevalentes em rebanhos suínos e, devido ao
786 potencial linfoproliferativo, tem despertado o interesse sobre a possibilidade de
787 interação entre esse agente e outros patógenos virais (FRANZO *et al.*, 2021;
788 MCMAHON *et al.*, 2006). Com base nesses estudos, e apesar de sua alta prevalência,
789 a relevância dos PLHVs para a indústria suína é muito pequena (FRANZO *et al.*,
790 2021). Com exceção da preocupação que existe com a obtenção de órgãos a partir
791 de animais infectados para serem utilizados em xenotransplantes devido à
792 possibilidade de interação com outros herpesvírus ou de seu potencial zoonótico,
793 particularmente em indivíduos imunossuprimidos transplantados (DALL AGNOL *et al.*,
794 2020; GOLTZ *et al.*, 2002; METTENLEITER *et al.*, 2019).

795 **3 REFERÊNCIAS**

- 796 ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal. **Relatório Anual 2020**. [S. l.: s. n.],
797 2020.
- 798 ALFIERI, A. A.; PARAZZI, M. E.; TAKIUCHI, E.; MÉDICI, K. C.; ALFIERI, A. F.
799 Frequency of group A rotavirus in diarrhoeic calves in Brazilian cattle herds, 1998-
800 2002. **Tropical Animal Health and Production**, vol. 38, no. 7–8, p. 521–526, 2006.
801 <https://doi.org/10.1007/s11250-006-4349-9>.
- 802 ANDRADE-MARTÍNEZ, J. S.; MORENO-GALLEGO, J. L.; REYES, A. Defining a Core
803 Genome for the Herpesvirales and Exploring their Evolutionary Relationship with the
804 Caudovirales. **Scientific Reports**, vol. 9, no. 1, p. 1–13, 2019.
805 <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47742-z>.
- 806 ANIȚĂ, D. C.; POPA, E.; ANIȚĂ, A.; OȘLOBANU, L. E.; SAVUȚA, G. Pestivirus
807 spillover effect: Molecular detection of bovine viral diarrhoea virus in domestic and feral
808 pigs. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, vol. 40, no. 6, p. 479–483, 2020.
809 <https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-6520>.
- 810 ARASAKI, M. O.; GÓES, C. G. De; OLIVEIRA, R. C. De; ALAN, D.; PORTO, G. S.;
811 MCCRATE, G. B.; CAMPOS-SILVA, J. V. Biological Invasion by wild pig (*Sus scrofa*
812 Linnaeus , 1758) in an Atlantic Rainforest protected area. **Notas sobre Mamíferos**
813 **Sudamericanos**, vol. 3, p. 1–6, 2021. <https://doi.org/doi.org/10.31687/>.
- 814 AZZURRO, E.; TUSET, V. M.; LOMBARTE, A.; MAYNOU, F.; SIMBERLOFF, D.;
815 RODRÍGUEZ-PÉREZ, A.; SOLÉ, R. V. External morphology explains the success of
816 biological invasions. **Ecology Letters**, vol. 17, no. 11, p. 1455–1463, 2014.
817 <https://doi.org/10.1111/ele.12351>.
- 818 BALTER, M. Archaeology: In search of the world's most ancient mariners. **Science**,
819 vol. 318, no. 5849, p. 388–389, 2007. <https://doi.org/10.1126/science.318.5849.388>.
- 820 BARRIOS-GARCIA, M. N.; BALLARI, S. A. Impact of wild boar (*Sus scrofa*) in its
821 introduced and native range: A review. **Biological Invasions**, vol. 14, no. 11, p. 2283–
822 2300, 2012. <https://doi.org/10.1007/s10530-012-0229-6>.
- 823 BELLAY, S.; ROSA, R. R.; BOZZA, A. N.; FERNANDES, S. E. P.; SILVEIRA, M. J.
824 Introdução de espécies em ecossistemas aquáticos: Causas, prevenção e medidas
825 de controle. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, vol. 9, no. 1, p. 181–201,
826 2016. .
- 827 BEST, S. M. Flaviviruses. **Current Biology**, vol. 26, no. 24, p. R1258–R1260, 2016.
828 <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.09.029>.
- 829 BLACKBURN, T. M.; ESSL, F.; EVANS, T.; HULME, P. E.; JESCHKE, J. M.; KÜHN,
830 I.; KUMSCHICK, S.; MARKOVÁ, Z.; MRUGAŁA, A.; NENTWIG, W.; PERGL, J.;
831 PYŠEK, P.; RABITSCH, W.; RICCIARDI, A.; RICHARDSON, D. M.; SENDEK, A.;
832 VILÀ, M.; WILSON, J. R. U.; WINTER, M.; ... BACHER, S. A Unified Classification of
833 Alien Species Based on the Magnitude of their Environmental Impacts. **PLoS Biology**,
834 vol. 12, no. 5, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001850>.

- 835 BLACKBURN, T. M.; PYŠEK, P.; BACHER, S.; CARLTON, J. T.; DUNCAN, R. P.;
836 JAROŠÍK, V.; WILSON, J. R. U.; RICHARDSON, D. M. A proposed unified framework
837 for biological invasions. **Trends in Ecology and Evolution**, vol. 26, no. 7, p. 333–339,
838 2011. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2011.03.023>.
- 839 BOOM, R.; SOL, C. J. A.; SALIMANS, M. M. M.; JANSEN, C. L.; WERTHEIM-VAN
840 DILLEN, P. M. E.; VAN DER NOORDAA, J. Rapid and simple method for purification
841 of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, vol. 28, no. 3, p. 495–503, 1990.
842 <https://doi.org/10.1128/jcm.28.3.495-503.1990>.
- 843 BRANDÃO, L. N. S.; ROSA, J. M. A.; KRAMER, B.; DE SOUSA, A. T. H. I.; TREVISOL,
844 I. M.; SILVA, V. S.; NAKAZATO, L.; DUTRA, V. Detection of *Toxoplasma gondii*
845 infection in feral wild boars (*Sus scrofa*) through indirect hemagglutination and PCR.
846 **Ciencia Rural**, vol. 49, no. 3, p. 2018–2020, 2019. [https://doi.org/10.1590/0103-](https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20180640)
847 [8478cr20180640](https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20180640).
- 848 BREMA, S.; LINDNER, I.; GOLTZ, M.; EHLERS, B. Development of a recombinant
849 antigen-based ELISA for the sero-detection of porcine lymphotropic
850 herpesviruses.pdf. vol. 15, p. 357–364, 2008.
- 851 BRINKMANN, M. M.; SCHULZ, T. F. Regulation of intracellular signalling by the
852 terminal membrane proteins of members of the Gammaherpesvirinae. **Journal of**
853 **General Virology**, vol. 87, no. 5, p. 1047–1074, 2006.
854 <https://doi.org/10.1099/vir.0.81598-0>.
- 855 CHMIELEWICZ, B.; GOLTZ, M.; FRANZ, T.; BAUER, C.; BREMA, S.; ELLERBROK,
856 H.; BECKMANN, S.; RZIHA, H. J.; LAHRMANN, K. H.; ROMERO, C.; EHLERS, B. A
857 novel porcine gammaherpesvirus. **Virology**, vol. 308, no. 2, p. 317–329, 2003.
858 [https://doi.org/10.1016/S0042-6822\(03\)00006-0](https://doi.org/10.1016/S0042-6822(03)00006-0).
- 859 COHEN, J. I. Herpesvirus latency. **Journal of Clinical Investigation**, vol. 130, no. 7,
860 p. 3361–3369, 2020. <https://doi.org/10.1172/JCI136225>.
- 861 COSTA, G. J. A.; CAVALCANTI, S. M. A.; LINS FILHO, N. M.; DELLA BELLA, S.;
862 MARVULO, M. F. V.; BEZERRA, R.; ALVES, L. C.; SILVA, J. C. R. Avaliação da
863 percepção sobre zoonoses com agentes de saúde, combate a endemias e docentes
864 de escola públicas, do entorno da Estação Ecológica de Caetés, Região Metropolitana
865 do Recife-PE, Brasil. **Medicina Veterinaria (UFRPE)**, vol. 11, no. 1, p. 67–75, 2017.
866 <https://doi.org/10.26605/medvet-n1-1627>.
- 867 CRAIG, M. I.; VENZANO, A.; KÖNIG, G.; MORRIS, W. E.; JIMÉNEZ, L.; JULIÁ, S.;
868 CAPELLINO, F.; BLANCO VIERA, J.; WEBER, E. L. Detection of bovine viral
869 diarrhoea virus (BVDV) nucleic acid and antigen in different organs of water buffaloes
870 (*Bubalus bubalis*). **Research in Veterinary Science**, vol. 85, no. 1, p. 194–196, 2008.
871 <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2007.08.013>.
- 872 CROWL, T. A.; CRIST, T. O.; PARMENTER, R. R.; BELOVSKY, G.; LUGO, A. E. The
873 spread of invasive species and infectious disease as drivers of ecosystem change.
874 **Frontiers in Ecology and the Environment**, vol. 6, no. 5, p. 238–246, 2008.
875 <https://doi.org/10.1890/070151>.
- 876 CUNHA, C. W.; SLATER, O. M.; MACBETH, B.; DUIGNAN, P. J.; WARREN, A.;

- 877 HIGHLAND, M. A.; LI, H. Domestic sheep and bighorn sheep carry distinct
878 gammaherpesviruses belonging to the genus *Macavirus*. **Virus Research**, vol. 272,
879 no. July, p. 197729, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2019.197729>.
- 880 DALL AGNOL, A. M.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. *Pestivirus K* (Atypical Porcine
881 Pestivirus): Update on the virus, viral infection, and the association with congenital
882 tremor in newborn piglets. **Viruses**, vol. 12, no. 8, 2020.
883 <https://doi.org/10.3390/v12080903>.
- 884 DALL AGNOL, A. M.; LEME, R. A.; SUPHORONSKI, S. A.; OLIVEIRA, T. E. S.;
885 SAPORITI, V.; HEADLEY, S. A.; ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F. Porcine lymphotropic
886 herpesvirus DNA detection in multiple organs of pigs in Brazil. **Brazilian Journal of**
887 **Microbiology**, vol. 51, no. 4, p. 2145–2152, 2020.
888 <https://doi.org/doi.org/10.1007/s42770-020-00335-9>.
- 889 DARRÉ, R.; BERLAND, H.; GOUSTAT, P. Chromosomal status of free ranging and
890 bred wild-boar populations in France. **Revue de Medecine Veterinaire**, France, vol.
891 143, no. 3, p. 225–232, 1992. .
- 892 DAS NEVES, C. G.; SACRISTÁN, C.; MADSLIEN, K.; TRYLAND, M.
893 Gammaherpesvirus in cervid species from Norway: Characterization of a new virus in
894 wild and semi-domesticated eurasian tundra reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*).
895 **Viruses**, vol. 12, no. 8, p. 1–14, 2020. <https://doi.org/10.3390/v12080876>.
- 896 DAVIS, A. J.; MCCREARY, R.; PSIROPOULOS, J.; BRENNAN, G.; COX, T.; PARTIN,
897 A.; PEPIN, K. M. Quantifying site-level usage and certainty of absence for an invasive
898 species through occupancy analysis of camera-trap data. **Biological Invasions**, vol.
899 20, no. 4, p. 877–890, 2018. <https://doi.org/10.1007/s10530-017-1579-x>.
- 900 DAVIS, M. A. **Invasion Biology**. New York: Oxford University Press, 2009.
- 901 DAVISON, A. J. Evolution of the herpesviruses. **Veterinary Microbiology**, vol. 86, no.
902 1–2, p. 69–88, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(01\)00492-8](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(01)00492-8).
- 903 DAVISON, A. J.; EBERLE, R.; EHLERS, B.; HAYWARD, G. S.; MCGEOCH, D. J.;
904 MINSON, A. C.; PELLETT, P. E.; ROIZMAN, B.; STUDDERT, M. J.; THIRY, E. The
905 order Herpesvirales. **Archives of Virology**, vol. 154, no. 1, p. 171–177, 2009.
906 <https://doi.org/10.1007/s00705-008-0278-4>.
- 907 DEBERDT, A.; SCHERER, S. O javali asselvajado: ocorrência e manejo da especie
908 no Brasil. **Natureza & Conservação**, vol. 5, no. 2, p. 31–44, 2007.
- 909 DENNER, J. Porcine Lymphotropic Herpesviruses (PLHVs) and Xenotransplantation.
910 **Viruses**, vol. 13, no. 1072, 2021. <https://doi.org/10.3390/v13061072>.
- 911 DENG, Y.; SUN, C. Q.; CAO, S. J.; LIN, T.; YUAN, S. S.; ZHANG, H. B.; ZHAI, S. L.;
912 HUANG, L.; SHAN, T. L.; ZHENG, H.; WEN, X. T.; TONG, G. Z. High prevalence of
913 bovine viral diarrhoea virus 1 in Chinese swine herds. **Veterinary Microbiology**, v. 159,
914 n. 3–4, p. 490–493, 2012. <http://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.04.023>.
- 915 DEREGT, D.; TESSARO, S. V.; BAXI, M. K.; BEREZOWSKI, J.; ELLIS, J. A.; WU, J.
916 T. Y.; GILBERT, S. A. Isolation of bovine viral diarrhoea viruses from bison. **Veterinary**

- 917 **Record**, vol. 157, no. 15, p. 448–450, 2005. <https://doi.org/10.1136/vr.157.15.448>.
- 918 DERIVERA, C. E.; RUIZ, G. M.; HINES, A. H.; JIVOFF, P. Biotic resistance to invasion:
919 Native predator limits abundance and distribution of an introduced crab. **Ecology**, vol.
920 86, no. 12, p. 3364–3376, 2005. <https://doi.org/10.1890/05-0479>.
- 921 DESBIEZ, A. L. J.; KEUROGHLIAN, A.; PIOVEZAN, U.; BODMER, R. E. Population
922 ecology of feral pigs in the brazilian Pantanal. **Embrapa Documentos**, vol. 106, p. 1–
923 44, 2009.
- 924 DIAS, G. B.; DO AMARAL, R. B.; GATTO, I. R. H.; LAPERA, I. M.; DE OLIVEIRA, L.
925 G.; LUX HOPPE, E. G.; MACHADO, R. Z.; ANDRÉ, M. R. Molecular detection of
926 *Mycoplasma suis* in captive white-lipped peccaries (*Tayassu pecari*) and wild boars
927 (*Sus scrofa*) in Brazil. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious**
928 **Diseases**, vol. 63, p. 94–96, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2019.01.013>.
- 929 DUBOVI, E. J. Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhea virus. **Biologicals**, vol.
930 41, no. 1, p. 8–13, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2012.06.004>.
- 931 EDWARDS, S.; FUKUSHO, A.; LEFÈVRE, P. C.; LIPOWSKI, A.; PEJSAK, Z.;
932 ROEHE, P.; WESTERGAARD, J. Classical swine fever: The global situation.
933 **Veterinary Microbiology**, vol. 73, no. 2–3, p. 103–119, 2000.
934 [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(00\)00138-3](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(00)00138-3).
- 935 EHLERS, B.; BORCHERS, K.; GRUND, C.; FRÖLICH, K.; LUDWIG, H.; BUHK, H. J.
936 Detection of new DNA polymerase genes of known and potentially novel herpesviruses
937 by PCR with degenerate and deoxyinosine-substituted primers. **Virus Genes**, vol. 18,
938 no. 3, p. 211–220, 1999. <https://doi.org/10.1023/A:1008064118057>.
- 939 EHLERS, B.; LOWDEN, S. Novel herpesviruses of Suidae: Indicators for a second
940 genogroup of artiodactyl gammaherpesviruses. **Journal of General Virology**, vol. 85,
941 no. 4, p. 857–862, 2004. <https://doi.org/10.1099/vir.0.79799-0>.
- 942 EHLERS, B.; ULRICH, S.; GOLTZ, M. Detection of two novel porcine herpesviruses
943 with high similarity to gammaherpesviruses. **Journal of General Virology**, vol. 80, no.
944 4, p. 971–978, 1999. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-4-971>.
- 945 EMBRAPA. Maiores produtores mundiais de carne suína. 2020. **Central de**
946 **inteligência de Aves e Suínos**. Available at: [https://www.embrapa.br/suinos-e-](https://www.embrapa.br/suinos-e-aves/cias/estatisticas/suinos/mundo)
947 [aves/cias/estatisticas/suinos/mundo](https://www.embrapa.br/suinos-e-aves/cias/estatisticas/suinos/mundo). Accessed on: 18 Dec. 2020.
- 948 EVANS, C. A.; PINIOR, B.; LARSKA, M.; GRAHAM, D.; SCHWEIZER, M.;
949 GUIDARINI, C.; DECARO, N.; RIDPATH, J.; GATES, M. C. Global knowledge gaps in
950 the prevention and control of bovine viral diarrhoea (BVD) virus. **Transboundary and**
951 **Emerging Diseases**, vol. 66, no. 2, p. 640–652, 2019.
952 <https://doi.org/10.1111/tbed.13068>.
- 953 EVANS, H. E.; SACK, W. O. Prenatal Development of Domestic and Laboratory
954 Mammals: Growth Curves, External Features and Selected References. **Anatomia,**
955 **Histologia, Embryologia**, vol. 2, no. 1, p. 11–45, 1973. [https://doi.org/10.1111/j.1439-](https://doi.org/10.1111/j.1439-0264.1973.tb00253.x)
956 [0264.1973.tb00253.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0264.1973.tb00253.x).

- 957 FONSECA, C.; DA SILVA, A. A.; ALVES, J.; VINGADA, J.; SOARES, A. M. V. M.
958 Reproductive performance of wild boar females in Portugal. **European Journal of**
959 **Wildlife Research**, vol. 57, no. 2, p. 363–371, 2011. [https://doi.org/10.1007/s10344-](https://doi.org/10.1007/s10344-010-0441-6)
960 010-0441-6.
- 961 FRANZO, G.; DRIGO, M.; LEGNARDI, M.; GRASSI, L.; MENANDRO, M. L.;
962 CECCHINATO, M.; TUCCIARONE, C. M.; PASOTTO, D. Porcine
963 Gammaherpesviruses in Italian Commercial Swine Population: Frequent but
964 Harmless. **Pathogens**, vol. 10, no. 47, p. 0–5, 2021.
965 <https://doi.org/10.3390/pathogens10010047>.
- 966 FUKANO, Y.; SOGA, M. Spatio-temporal dynamics and drivers of public interest in
967 invasive alien species. **Biological Invasions**, vol. 21, no. 12, p. 3521–3532, 2019.
968 <https://doi.org/10.1007/s10530-019-02065-y>.
- 969 FULTON, R. W.; BLOOD, K. S.; PANCIERA, R. J.; PAYTON, M. E.; RIDPATH, J. F.;
970 CONFER, A. W.; SALIKI, J. T.; BURGE, L. T.; WELSH, R. D.; JOHNSON, B. J.; RECK,
971 A. Lung pathology and infectious agents in fatal feedlot pneumonias and relationship
972 with mortality, disease onset, and treatments. **Journal of Veterinary Diagnostic**
973 **Investigation**, vol. 21, no. 4, p. 464–477, 2009.
974 <https://doi.org/10.1177/104063870902100407>.
- 975 GALVANI, J. W. de C.; AMARAL, F. do; CAVAGNO, G. M.; SILVA, V. S.
976 Monitoramento sanitário para peste suína clássica em suídeos asselvajados no
977 Estado do Rio Grande do Sul, Brasil, de 2014 a 2018. **Pesquisa Agropecuária**
978 **Gaúcha**, vol. 25, no. 3, p. 172–178, 2019.
979 <https://doi.org/doi.org/10.36812/pag.2019253172-178>.
- 980 GARCÍA, G.; VERGARA, J.; LOMBARDI, R. Genetic characterization and
981 phylogeography of the wild boar *Sus scrofa* introduced into Uruguay. **Genetics and**
982 **Molecular Biology**, vol. 34, no. 2, p. 329–337, 2011. [https://doi.org/10.1590/S1415-](https://doi.org/10.1590/S1415-47572011005000015)
983 47572011005000015.
- 984 GARVEY, M.; SUÁREZ, N. M.; KERR, K.; HECTOR, R.; MOLONEY-QUINN, L.;
985 ARKINS, S.; DAVISON, A. J.; CULLINANE, A. Equid herpesvirus 8: Complete
986 genome sequence and association with abortion in mares. **Plos One**, vol. 13, no. 2, p.
987 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192301>
- 988 GATTO, I.R.H.; COTRIN, J.A.B.; ALMEIDA, H.M.S.; MECHLER, M.L.; OLIVEIRA, L.
989 G. Sectional study of the occurrence of Bovine Viral Diarrhea Virus in pig farms in São
990 Paulo State. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, vol. 11, p. 365–373,
991 2017.
- 992 GOLTZ, M.; ERICSSON, T.; PATIENCE, C.; HUANG, C. A.; NOACK, S.; SACHS, D.
993 H.; EHLERS, B. Sequence analysis of the genome of porcine lymphotropic herpesvirus
994 1 and gene expression during posttransplant lymphoproliferative disease of pigs.
995 **Virology**, vol. 294, no. 2, p. 383–393, 2002. <https://doi.org/10.1006/viro.2002.1390>.
- 996 GOMES, F. S.; MECHLER-DREIBI, M. L.; GATTO, I. R. H.; STORINO, G. Y.; PIRES,
997 F. F. B.; XAVIER, E. B.; SAMARA, S. I.; OLIVEIRA, L. G. De. Congenital persistent
998 infection with bovine viral diarrhea virus not observed in piglets. **Canadian Veterinary**

- 999 **Journal**, vol. 60, no. November, p. 1220–1222, 2019.
- 1000 GORTÁZAR, C.; FERROGLIO, E.; HÖFLE, U.; FRÖLICH, K.; VICENTE, J. Diseases
1001 shared between wildlife and livestock: A European perspective. **European Journal of**
1002 **Wildlife Research**, vol. 53, no. 4, p. 241–256, 2007. [https://doi.org/10.1007/s10344-](https://doi.org/10.1007/s10344-007-0098-y)
1003 007-0098-y.
- 1004 GRAHAM, D. A.; CALVERT, V.; GERMAN, A.; MCCULLOUGH, S. J. Pestiviral
1005 infections in sheep and pigs in Northern Ireland. **Veterinary Record**, vol. 148, no. 3,
1006 p. 69–72, 2001. <https://doi.org/10.1136/vr.148.3.69>.
- 1007 GROSHOLZ, E. D. Recent biological invasion may hasten invasional meltdown by
1008 accelerating historical introductions. **Proceedings of the National Academy of**
1009 **Sciences of the United States of America**, vol. 102, no. 4, p. 1088–1091, 2005.
1010 <https://doi.org/10.1073/pnas.0308547102>.
- 1011 GROSSI, S. F.; LUI, J. F.; GARCIA, J. E.; MEIRELLES, F. V. Genetic diversity in wild
1012 (*Sus scrofa scrofa*) and domestic (*Sus scrofa domestica*) pigs and their hybrids based
1013 on polymorphism of a fragment of the D-loop region in the mitochondrial DNA.
1014 **Genetics and Molecular Research**, vol. 5, no. 4, p. 564–568, 2006. .
- 1015 GURNELL, J.; RUSHTON, S. P.; LURZ, P. W. W.; SAINSBURY, A. W.; NETTLETON,
1016 P.; SHIRLEY, M. D. F.; BRUEMMER, C.; GEDDES, N. Squirrel poxvirus: Landscape
1017 scale strategies for managing disease threat. **Biological Conservation**, vol. 131, no.
1018 2, p. 287–295, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2006.04.009>.
- 1019 HARDY, S.; JACKSON, B.; GOODBOURN, S.; SEAGO, J. Classical Swine Fever
1020 Virus N pro Antagonizes IRF3 To Prevent Interferon-Independent TLR3- and RIG-I-
1021 Mediated Apoptosis. **Journal of Virology**, vol. 95, no. 5, p. 1–16, 2020.
1022 <https://doi.org/10.1128/jvi.01136-20>.
- 1023 HEBEISEN, C.; FATTEBERT, J.; BAUBET, E.; FISCHER, C. Estimating wild boar (*Sus*
1024 *scrofa*) abundance and density using capture-resights in Canton of Geneva,
1025 Switzerland. **European Journal of Wildlife Research**, vol. 54, no. 3, p. 391–401,
1026 2008. <https://doi.org/10.1007/s10344-007-0156-5>.
- 1027 HEDRICK, R. P. Relationships of the host, pathogen, and environment: Implications
1028 for diseases of cultured and wild fish populations. **Journal of Aquatic Animal Health**,
1029 vol. 10, no. 2, p. 107–111, 1998. [https://doi.org/10.1577/1548-](https://doi.org/10.1577/1548-8667(1998)010<0107:ROTHPA>2.0.CO;2)
1030 8667(1998)010<0107:ROTHPA>2.0.CO;2.
- 1031 HEGEL, C. G. Z.; MARINI, M. Â. Impacto do javali Europeu, *Sus scrofa*, em um
1032 fragmento da Mata Atlântica Brasileira. **Neotropical Biology and Conservation**, vol.
1033 8, no. 1, p. 17–24, 2013. <https://doi.org/10.4013/nbc.2013.81.03>.
- 1034 HOUE, H. Epidemiological features and economical importance of bovine virus
1035 diarrhoea virus (BVDV) infections. **Veterinary Microbiology**, vol. 64, no. 2–3, p. 89–
1036 107, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(98\)00262-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(98)00262-4).
- 1037 HUANG, C. A.; FUCHIMOTO, Y.; GLEIT, Z. L.; ERICSSON, T.; GRIESEMER, A.;
1038 SCHEIER-DOLBERG, R.; MELENDY, E.; KITAMURA, H.; FISHMAN, J. A.; FERRY,
1039 J. A.; HARRIS, N. L.; PATIENCE, C.; SACHS, D. H. Posttransplantation

- 1040 lymphoproliferative disease in miniature swine after allogeneic hematopoietic cell
1041 transplantation: Similarity to human PTLD and association with a porcine
1042 gammaherpesvirus. **Blood**, vol. 97, no. 5, p. 1467–1473, 2001.
1043 <https://doi.org/10.1182/blood.V97.5.1467>.
- 1044 IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis.
1045 **PORTARIA IBAMA nº 102/98, de 15 de julho de 1998**. Diário Oficial da União, 1998.
- 1046 IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis.
1047 **INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 03/2013, de 31 de janeiro de 2013**. Diário Oficial da
1048 União, 2013.
- 1049 IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis.
1050 **Instrução normativa nº 12, de 25 de março de 2019**. Diário Oficial da União, 2019.
- 1051 ICTV. Flaviviridae. 2020 a. **International Committee on Taxonomy of Viruses**.
1052 Available at: [https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/flaviviridae)
1053 [rna-viruses/w/flaviviridae](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/flaviviridae). Accessed on: 8 Mar. 2021.
- 1054 ICTV. Genus: Pestivirus. 2020b. **International Committee on Taxonomy of Viruses**.
1055 Available at: [https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/flaviviridae/361/genus-pestivirus)
1056 [rna-viruses/w/flaviviridae/361/genus-pestivirus](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/flaviviridae/361/genus-pestivirus). Accessed on: 12 Feb. 2020.
- 1057 ICTV. Herpesviridae. 2020c. **International Committee on Taxonomy of Viruses**.
1058 Available at: [https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/dsdna-viruses-](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/dsdna-viruses-2011/w/dsdna_viruses/91/herpesviridae)
1059 [2011/w/dsdna_viruses/91/herpesviridae](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/dsdna-viruses-2011/w/dsdna_viruses/91/herpesviridae). Accessed on: 20 Mar. 2021.
- 1060 ICTV. Herpesviridae. 2020d. **International Committee on Taxonomy of Viruses**.
1061 Available at: [https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/dsdna-viruses-](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/dsdna-viruses-2011/w/dsdna_viruses/91/herpesviridae)
1062 [2011/w/dsdna_viruses/91/herpesviridae](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/dsdna-viruses-2011/w/dsdna_viruses/91/herpesviridae). Accessed on: 23 Dec. 2020.
- 1063 INSTITUTO HÓRUS DE DESENVOLVIMENTO E CONSERVAÇÃO AMBIENTAL.
1064 Busca por espécies - Localidades de ocorrência. 2020. Available at:
1065 [http://bd.institutohorus.org.br/www/?p=Z2tilSZuM2JuYTx9LVZXDQoZXxURRU1IG0s](http://bd.institutohorus.org.br/www/?p=Z2tilSZuM2JuYTx9LVZXDQoZXxURRU1IG0sIfn5qeysuan06a2w2PTk%2FeBcQQR0SHKIARRUHEFleXAIFQRVODI0aThcXFUwhJGBgMmNtMScjJSw%3D#tabsheet_start)
1066 [Ifn5qeysuan06a2w2PTk%2FeBcQQR0SHKIARRUHEFleXAIFQRVODI0aThcXFUwhJ](http://bd.institutohorus.org.br/www/?p=Z2tilSZuM2JuYTx9LVZXDQoZXxURRU1IG0sIfn5qeysuan06a2w2PTk%2FeBcQQR0SHKIARRUHEFleXAIFQRVODI0aThcXFUwhJGBgMmNtMScjJSw%3D#tabsheet_start)
1067 [GBgMmNtMScjJSw%3D#tabsheet_start](http://bd.institutohorus.org.br/www/?p=Z2tilSZuM2JuYTx9LVZXDQoZXxURRU1IG0sIfn5qeysuan06a2w2PTk%2FeBcQQR0SHKIARRUHEFleXAIFQRVODI0aThcXFUwhJGBgMmNtMScjJSw%3D#tabsheet_start). Accessed on: 20 Nov. 2020.
- 1068 JANSEN, A.; NÖCKLER, K.; SCHÖNBERG, A.; LUGE, E.; EHLERT, D.; SCHNEIDER,
1069 T. Wild boars as possible source of hemorrhagic leptospirosis in Berlin, Germany.
1070 **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, vol. 25, no.
1071 8, p. 544–546, 2006. <https://doi.org/10.1007/s10096-006-0174-3>.
- 1072 JONES, K. E.; PATEL, N. G.; LEVY, M. A.; STOREYGARD, A.; BALK, D.;
1073 GITTLEMAN, J. L.; DASZAK, P. Global trends in emerging infectious diseases.
1074 **Nature**, vol. 451, no. 7181, p. 990–993, 2008. <https://doi.org/10.1038/nature06536>.
- 1075 KEITER, D. A.; MAYER, J. J.; BEASLEY, J. C. What is in a “common” name? A call
1076 for consistent terminology for nonnative *Sus scrofa*. **Wildlife Society Bulletin**, vol. 40,
1077 no. 2, p. 384–387, 2016. <https://doi.org/10.1002/wsb.649>.
- 1078 KHAN, F.; VORSTER, J. H.; VAN VUUREN, M.; MAPHAM, P. Evaluation of the effects
1079 of long-term storage of bovine ear notch samples on the ability of 2 diagnostic assays

- 1080 to identify calves persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. **Journal of the**
 1081 **South African Veterinary Association**, vol. 82, no. 1, p. 18–23, 2011.
 1082 <https://doi.org/10.4102/jsava.v82i1.29>.
- 1083 KHODAKARAM-TAFTI, A.; FARJANIKISH, G. H. Persistent bovine viral diarrhea virus
 1084 (BVDV) infection in cattle herds. **Iranian Journal of Veterinary Research**, vol. 18, no.
 1085 3, p. 154–163, 2017. <https://doi.org/10.22099/ijvr.2017.4190>.
- 1086 KIRKLAND, P. D.; POTIER, M.-F.; FINLAISON, D. Pestiviruses. *In*: ZIMMERMAN, J.
 1087 J.; KARRIKE, L. A.; RAMIREZ, A. (eds.). **Diseases of Swine**. Eleventh. Pondicherry,
 1088 India: Wiley-Blackwell, 2019. p. 622–640. [https://doi.org/10.1111/j.1751-](https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1964.tb04494.x)
 1089 [0813.1964.tb04494.x](https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1964.tb04494.x).
- 1090 KMETIUK, Louise B.; KRAWCZAK, F. S.; MACHADO, F. P.; PAPLOSKI, I. A. D.;
 1091 MARTINS, T. F.; TEIDER-JUNIOR, P. I.; SERPA, M. C. A.; BARBIERI, A. R. M.;
 1092 BACH, R. V. W.; BARROS-FILHO, I. R.; LIPINSKI, L. C.; DOS SANTOS, A. P.;
 1093 LABRUNA, M. B.; BIONDO, A. W. Ticks and serosurvey of anti-rickettsia spp.
 1094 Antibodies in wild boars (*Sus scrofa*), hunting dogs and hunters of Brazil. **PLoS**
 1095 **Neglected Tropical Diseases**, vol. 13, no. 5, p. 1–14, 2019.
 1096 <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007405>.
- 1097 KMETIUK, Louise Bach; CASSARO VILLALOBOS, E. M.; DE SOUZA HUNOLD
 1098 LARA, M. do C. C.; MACHADO, F. P.; LIPINSKI, L. C.; DOS SANTOS, A. P.; BIONDO,
 1099 A. W.; DE BARROS FILHO, I. R. Serosurvey for Pseudorabies (Aujeszky's Disease)
 1100 in Free-Range Wild Boars (*Sus scrofa*) of Brazil. **Journal of Wildlife Diseases**, vol.
 1101 56, no. 4, p. 2019–2021, 2020. <https://doi.org/10.7589/2019-10-262>.
- 1102 KMETIUK, Louise Bach; CUSTÓDIO DE SOUZA HUNOLD LARA, M. D. C.;
 1103 MONTEFORTE CASSARO VILLALOBOS, E.; DE BARROS FILHO, I. R.; MARTINS,
 1104 C. M.; BACH, R. V. W.; PISTORI MACHADO, F.; SILVA PEREIRA, M.; CAVALCANTE
 1105 LIPINSKI, L.; DOS SANTOS, A. P.; BIONDO, A. W. Serosurvey of Eastern, Western,
 1106 and Venezuelan Equine Encephalitis Viruses in Wild Boars (*Sus scrofa*), Hunting
 1107 Dogs, and Hunters of Brazil. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, vol. 20, no. 11,
 1108 p. 868–871, 2020. <https://doi.org/10.1089/vbz.2019.2596>.
- 1109 KMETIUK, Louise Bach; NOGUEIRA, A. H.; OKUDA, L. H.; GOMES, A. L.; LARA, M.
 1110 do C. C. S.; VILALOBOS, E. M. C.; MARTINS, C. M.; PEREIRA, M. S.; FILHO, I. R.
 1111 de B.; BACH, R. van W.; LIPINSKI, L. C.; SANTOS, A. P. dos; BIONDO, A. W.
 1112 Serosurvey of anti-Neospora caninum antibodies in wild boars (*Sus scrofa*), hunting
 1113 dogs and hunters of Brazil. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**,
 1114 vol. 23, 2021. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.vprsr.2020.100522>.
- 1115 KOLAR, C. S.; LODGE, D. M. Progress in invasion biology: predicting invaders.
 1116 **Trends in Ecology and Evolution**, vol. 16, no. 4, p. 199–204, 2001.
- 1117 KREY, T.; BONTEMS, F.; VONRHEIN, C.; VANEY, M.; BRICOGNE, G.; RUMENAPF,
 1118 T.; REY, F. A. Crystal Structure of the Pestivirus Envelope Glycoprotein E rns and
 1119 Mechanistic Analysis of Its Ribonuclease Activity. **Structure**, vol. 20, p. 862–873,
 1120 2012. <https://doi.org/10.1016/j.str.2012.03.018>.
- 1121 LANYON, S. R.; HILL, F. I.; REICHEL, M. P.; BROWNLIE, J. Bovine viral diarrhoea:

- 1122 Pathogenesis and diagnosis. **Veterinary Journal**, vol. 199, no. 2, p. 201–209, 2014.
1123 <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.07.024>.
- 1124 LARSON, B. M. H.; NERLICH, B.; WALLIS, P. Metaphors and biorisks: The war on
1125 infectious diseases and invasive species. **Science Communication**, vol. 26, no. 3, p.
1126 243–268, 2005a. <https://doi.org/10.1177/1075547004273019>.
- 1127 LARSON, G.; DOBNEY, K.; ALBARELLA, U.; FANG, M.; MATISOO-SMITH, E.;
1128 ROBINS, J.; LOWDEN, S.; FINLAYSON, H.; BRAND, T.; WILLERSLEV, E.; ROWLEY-
1129 CONWY, P.; ANDERSSON, L.; COOPER, A. Worldwide Phylogeography of Wild Boar
1130 Reveals Multiple Centers of Pig Domestication. **Science**, vol. 307, no. 5715, p. 1618–
1131 1621, 2005b. [https://doi.org/DOI: 10.1126/science.1106927](https://doi.org/DOI:10.1126/science.1106927).
- 1132 LAVEN, R. Diagnosis of bovine viral diarrhoea virus (BVDV)-associated problems.
1133 **Livestock**, vol. 13, no. 3, p. 37–41, 2008. [https://doi.org/10.1111/j.2044-
1134 3870.2008.tb00163.x](https://doi.org/10.1111/j.2044-3870.2008.tb00163.x).
- 1135 LINDBERG, A. L. E. Bovine viral Diarrhoea virus infections and its control. A review
1136 *Clostridium difficile* infections in animals with special reference to the horse. A
1137 review?? **Veterinary Quarterly**, vol. 25, no. 1, p. 1–16, 2003.
1138 <https://doi.org/10.1080/01652176.2003.9695140>.
- 1139 LINDNER, I.; EHLERS, B.; NOACK, S.; DURAL, G.; YASMUM, N.; BAUER, C.;
1140 GOLTZ, M. The porcine lymphotropic herpesvirus 1 encodes functional regulators of
1141 gene expression. **Virology**, vol. 357, no. 2, p. 134–148, 2007.
1142 <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.08.008>.
- 1143 LIPOWSKI, A. Serological study on bovine viral diarrhoea virus infection in pig
1144 population in Poland between 2008 and 2011. **Bulletin of the Veterinary Institute in
1145 Pulawy**, v. 58, n. 3, p. 363–368, 2014.
1146
- 1147 LOCKWOOD, JULIE L.; HOOPES, MARTHA F.; MARCHETTI, M. P. **Invasion
1148 Ecology**. second edi. Oxford: Wiley-Blackwell, 2007.
- 1149 LOCKWOOD, B. L.; SOMERO, G. N. Invasive and native blue mussels (genus *Mytilus*)
1150 on the California coast: The role of physiology in a biological invasion. **Journal of
1151 Experimental Marine Biology and Ecology**, vol. 400, no. 1–2, p. 167–174, 2011.
1152 <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2011.02.022>.
- 1153 LOEFFEN, W. L. A.; VAN BEUNINGEN, A.; QUAK, S.; ELBERS, A. R. W.
1154 Seroprevalence and risk factors for the presence of ruminant pestiviruses in the Dutch
1155 swine population. **Veterinary Microbiology**, vol. 136, no. 3–4, p. 240–245, 2009.
1156 <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.11.011>.
- 1157 LØKEN, T.; KROGSRUD, J.; LARSEN, I. L. Pestivirus Infections in Norway.
1158 Serological Investigations in Cattle, Sheep and Pigs. **Acta Veterinaria Scandinavica**,
1159 v. 32, n. 1, p. 27–34, 1991. <http://doi.org/10.1186/BF03546994>.
- 1160 LOPES, B. C.; MACIEL, A. L. G.; LOIKO, M. R.; BUENO, T. S.; COPPOLA, M. M.;
1161 BERTAGNOLLI, A. C.; MARTINS, A. F.; ROEHE, P. M.; DRIEMEIER, D.; MAYER, F.
1162 Q. Molecular identification of *Mycobacterium spp.* isolated from Brazilian wild boars.

- 1163 **Molecular Biology Reports**, vol. 48, no. 1, p. 1025–1031, 2021.
1164 <https://doi.org/10.1007/s11033-020-06118-7>.
- 1165 LUI, J. F. Estudo citogenético de javalis puros (*Sus scrofa scrofa*) e híbridos nas
1166 regiões sudeste e sul do Brasil. **Revista de Educação Continuada em Medicina**
1167 **Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, vol. 3, p. 43–48, 2000.
- 1168 MACHADO, D. M. R.; DE BARROS, L. D.; DE SOUZA LIMA NINO, B.; DE SOUZA
1169 POLLO, A.; DOS SANTOS SILVA, A. C.; PERLES, L.; ANDRÉ, M. R.; ZACARIAS
1170 MACHADO, R.; GARCIA, J. L.; LUX HOPPE, E. G. *Toxoplasma gondii* infection in wild
1171 boars (*Sus scrofa*) from the State of São Paulo, Brazil: Serology, molecular
1172 characterization, and hunter's perception on toxoplasmosis. **Veterinary Parasitology:**
1173 **Regional Studies and Reports**, vol. 23, no. January, 2021.
1174 <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2021.100534>.
- 1175 MACHADO, F. P.; KMETIUK, L. B.; PELLIZZARO, M.; YAMAKAWA, A. C.; MARTINS,
1176 C. M.; MORIKAWA, V. M.; DE BARROS-FILHO, I. R.; LANGONI, H.; DOS SANTOS,
1177 A. P.; BIONDO, A. W. Leptospira spp. Antibody in wild boars (*Sus scrofa*), hunting
1178 dogs (*Canis lupus familiaris*), and hunters of Brazil. **Journal of Wildlife Diseases**, vol.
1179 57, no. 1, p. 184–188, 2021. <https://doi.org/10.7589/JWD-D-20-00002>.
- 1180 MACK, R. N.; SIMBERLOFF, D.; LONSDALE, W. M.; EVANS, H.; CLOUT, M.;
1181 BAZZAZ, F. A. Issues in Ecology. **Ecological Applications**, vol. 10, no. 3, p. 689–
1182 710, 2000. [https://doi.org/10.1890/0012-9623\(2008\)89\[341:iie\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1890/0012-9623(2008)89[341:iie]2.0.co;2).
- 1183 MACLACHLAN, N. J.; DUBOVI, E. J.; FENNER, F. Herpesvirales. *In*: MACLACHLAN,
1184 N. J.; DUBOVI, E. J. (eds.). **Fenner's Veterinary Virology**. 5th ed. [S. l.]: Elsevier,
1185 2017. p. 189–216. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-800946-8.00009-x>.
- 1186 MANCHESTER, S. J.; BULLOCK, J. M. The impacts of non-native species on UK
1187 biodiversity and the effectiveness of control. **Journal of Applied Ecology**, vol. 37, no.
1188 5, p. 845–864, 2000. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2664.2000.00538.x>.
- 1189 MANTOANI, M. C.; DIAS, J.; ORSI, M. L.; TOREZAN, J. M. D. Efeitos da invasão por
1190 *Tradescantia zebrina* Heynh. sobre regenerantes de plantas arbóreas em um
1191 fragmento de floresta estacional semidecidual secundária em Londrina (PR).
1192 **Biotemas**, vol. 26, no. 3, p. 63–70, 2013. <https://doi.org/10.5007/2175-7925.2013v26n3p63>.
- 1194 MARTIN-ALBARRACIN, V. L.; AMICO, G. C.; SIMBERLOFF, D.; NUÑEZ, M. A.
1195 Impact of non-native birds on native ecosystems: A global analysis. **PLoS ONE**, vol.
1196 10, no. 11, p. 1–14, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143070>.
- 1197 MARTINS, F. I.; MOURÃO, G. M.; CAMPOS, Z.; PELLEGRIN, A.; SILVA, V. S. Activity
1198 pattern and habitat selection by invasive wild boars (*Sus scrofa*) in Brazilian
1199 agroecosystems. **Mastozoologia Neotropical**, vol. 26, no. 1, p. 129–141, 2019.
1200 <https://doi.org/10.31687/saremMN.19.26.1.0.08>.
- 1201 MCGEOCH, M. A.; BUTCHART, S. H. M.; SPEAR, D.; MARAIS, E.; KLEYNHANS, E.
1202 J.; SYMES, A.; CHANSON, J.; HOFFMANN, M. Global indicators of biological
1203 invasion: Species numbers, biodiversity impact and policy responses. **Diversity and**
1204 **Distributions**, vol. 16, no. 1, p. 95–108, 2010.

- 1205 4642.2009.00633.x.
- 1206 MCMAHON, K. J.; MINIHAN, D.; CAMPION, E. M.; LOUGHRAN, S. T.; ALLAN, G.;
1207 MCNEILLY, F.; WALLS, D. Infection of pigs in Ireland with lymphotropic γ -
1208 herpesviruses and relationship to postweaning multisystemic wasting syndrome.
1209 **Veterinary Microbiology**, vol. 116, no. 1–3, p. 60–68, 2006.
1210 <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.03.022>.
- 1211 MENG, X. J. Emerging and Re-emerging Swine Viruses. **Transboundary and**
1212 **Emerging Diseases**, vol. 59, no. SUPPL. 1, p. 85–102, 2012.
1213 <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2011.01291.x>.
- 1214 MENG, X. J.; LINDSAY, D. S. Wild boars as sources for infectious diseases in livestock
1215 and humans. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological**
1216 **Sciences**, vol. 364, no. 1530, p. 2697–2707, 2009.
1217 <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0086>.
- 1218 METTENLEITER, T. C.; EHLERS, B.; MÜLLER, T.; YOON, K.; TEIFKE, J. P.
1219 Herpesviruses. *In*: ZIMMERMAN, J. J.; KARRIKE, L. A.; RAMIREZ, A.; SCHWARTZ,
1220 K. J.; STEVENSON, G. W.; ZHANG, J. (eds.). **Diseases of Swine**. Eleventh.
1221 Pondicherry, India: Wiley-Blackwell, 2019. p. 548–575. [https://doi.org/10.1111/j.1751-](https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1964.tb04494.x)
1222 [0813.1964.tb04494.x](https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1964.tb04494.x).
- 1223 METTENLEITER, T. C.; KLUPP, B. G.; GRANZOW, H. Herpesvirus assembly: a tale
1224 of two membranes. **Current Opinion in Microbiology**, vol. 9, no. 4, p. 423–429, 2006.
1225 <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.06.013>.
- 1226 MEYERS, G.; THIEL, H. J. MOLECULAR CHARACTERIZATION OF PESTIVIRUSES.
1227 **Advances in Virus Research**, vol. 47, p. 53–118, 1996.
1228 [https://doi.org/doi:10.1016/s0065-3527\(08\)60734-4](https://doi.org/doi:10.1016/s0065-3527(08)60734-4).
- 1229 MILIĆEVIĆ, V.; MAKSIMOVIĆ-ZORIĆ, J.; VELJOVIĆ, Lj.; KURELJUŠIĆ, B.; SAVIĆ,
1230 B.; CVETOJEVIĆ, Đ.; JEZDIMIROVIĆ, N.; RADOSAVLJEVIĆ, V. Bovine viral diarrhea
1231 virus infection in wild boar. **Research in Veterinary Science**, vol. 119, no. May, p. 76–
1232 78, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2018.05.018>.
- 1233 MIRANDA, L. L. de; LUI, J. F. Citogenética do javali em criatórios comerciais das
1234 regiões Sul e Sudeste do Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, vol. 38, no. 11,
1235 p. 1289–1295, 2003. <https://doi.org/10.1590/s0100-204x2003001100006>.
- 1236 MISHRA, N.; DUBEY, R.; RAJUKUMAR, K.; TOSH, C.; TIWARI, A.; PITALE, S. S.;
1237 PRADHAN, H. K. Genetic and antigenic characterization of bovine viral diarrhea virus
1238 type 2 isolated from Indian goats (*Capra hircus*). **Veterinary Microbiology**, vol. 124,
1239 no. 3–4, p. 340–347, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.04.023>.
- 1240 MOENNIG, V.; BECHER, P. Control of bovine viral diarrhea. **Pathogens**, vol. 7, no. 1,
1241 p. 1–12, 2018. <https://doi.org/10.3390/pathogens7010029>.
- 1242 MOENNIG, V.; HOUE, H.; LINDBERG, A. BVD control in Europe: current status and
1243 perspectives. **Animal Health Research Reviews**, vol. 6, no. 1, p. 63–74, 2005.
1244 <https://doi.org/10.1079/ahr2005102>.

- 1245 MORAIS, T. A.; ROSA, C. A.; AZEVEDO, C. S.; VIANA-JUNIOR, A. B.; SANTOS, P.;
1246 PASSAMANI, M. Factors affecting space use by wild boars (*Sus scrofa*) in high-
1247 elevation tropical forests. **Canadian Journal of Zoology**, vol. 97, no. 11, p. 971–978,
1248 2019. <https://doi.org/10.1139/cjz-2019-0130>.
- 1249 MOSENAV, A. C. S.; WEBER, M. N.; CIBULSKI, S. P.; SILVA, M. S.; PAIM, W. P.;
1250 SILVA, G. S.; MEDEIROS, A. A.; VIANA, N. A.; BAUMBACH, L. F.; PUHL, D. E.;
1251 SILVEIRA, S.; CORBELLINI, L. G.; CANAL, C. W. Survey for pestiviruses in backyard
1252 pigs in southern Brazil. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, vol. 1, p. 1–
1253 6, 2020. <https://doi.org/10.1177/1040638719896303>.
- 1254 MOURA-BRITTO, M. de; PATROCÍNIO, D. N. M. A fauna de espécies exóticas no
1255 Paraná: contexto nacional e situação atual. *In*: CAMPOS, J. B.; MÜLLER, M. de G. P.
1256 T. C. R. C. (eds.). **UNIDADES DE CONSERVAÇÃO Ações para valorização da**
1257 **biodiversidade**. Curitiba, PR: Secretaria de Estado de Meio Ambiente, 2006. p. 53–
1258 94.
- 1259 MUKHOPADHYAY, S.; KUHN, R. J.; ROSSMANN, M. G. A structural perspective of
1260 the Flavivirus life cycle. **Nature Reviews Microbiology**, vol. 3, no. 1, p. 13–22, 2005.
1261 <https://doi.org/10.1038/nrmicro1067>.
- 1262 MURRAY, A. G.; PEELER, E. J. A framework for understanding the potential for
1263 emerging diseases in aquaculture. **Preventive Veterinary Medicine**, vol. 67, no. 2-3
1264 SPEC. ISS., p. 223–235, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2004.10.012>.
- 1265 NASCIMENTO, K. A.; MECHLER, M. L.; GATTO, I. R. H.; ALMEIDA, H. M. S.; POLLO,
1266 A. S.; SANT'ANA, F. J. F.; PEDROSO, P. M. O.; DE OLIVEIRA, L. G. Evidence of
1267 bovine viral diarrhea virus transmission by back pond water in experimentally infected
1268 piglets. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, vol. 38, no. 10, p. 1896–1901, 2018.
1269 <https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-5629>.
- 1270 NEILL, J. Molecular biology of bovine viral diarrhea virus. **Biologicals**, vol. 41, no. 1,
1271 p. 2-7, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biologicals.2012.07.002>.
- 1272 NEUFELDT, C. J.; CORTESE, M.; ACOSTA, E. G.; BARTENSCHLAGER, R. Rewiring
1273 cellular networks by members of the *Flaviviridae* family. **Nature Reviews**
1274 **Microbiology**, vol. 16, no. 3, p. 125–142, 2018.
1275 <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.170>.
- 1276 NEWCOMER, B. W.; CHAMORRO, M. F.; WALZ, P. H. Vaccination of cattle against
1277 bovine viral diarrhea virus. **Veterinary Microbiology**, vol. 206, no. November, p. 78–
1278 83, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.04.003>.
- 1279 NOGUEIRA-FILHO, S. L. G.; NOGUEIRA, S. S. C.; FRAGOSO, J. M. V. Ecological
1280 impacts of feral pigs in the Hawaiian Islands. **Biodiversity and Conservation**, vol. 18,
1281 no. 14, p. 3677–3683, 2009. <https://doi.org/10.1007/s10531-009-9680-9>.
- 1282 OKADERA, K.; ABE, M.; ITO, N.; MORIKAWA, S.; YAMASAKI, A.; MASATANI, T.;
1283 NAKAGAWA, K.; YAMAOKA, S.; SUGIYAMA, M. Evidence of natural transmission of
1284 group A rotavirus between domestic pigs and wild boars (*Sus scrofa*) in Japan.
1285 **Infection, Genetics and Evolution**, vol. 20, p. 54–60, 2013.
1286 <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.07.029>.

- 1287 OLIVEIRA, L. G. de; MECHLER-DREIBI, M. L.; ALMEIDA, H. M. S.; GATTO, I. R. H.
1288 Bovine viral diarrhea virus: Recent findings about its occurrence in pigs. **Viruses**, vol.
1289 12, no. 6, p. 1–12, 2020. <https://doi.org/10.3390/v12060600>.
- 1290 OLIVEIRA, V. H. S.; DALL AGNOL, A. M.; FRITZEN, J. T. T.; LORENZETTI, E.;
1291 ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F. Microbial diversity involved in the etiology of a bovine
1292 respiratory disease outbreak in a dairy calf rearing unit. **Comparative Immunology,**
1293 **Microbiology and Infectious Diseases**, vol. 71, no. February, 2020.
1294 <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2020.101494>.
- 1295 OTONEL, R. A. A.; ALFIERI, A. F.; DEZEN, S.; LUNARDI, M.; HEADLEY, S. A.;
1296 ALFIERI, A. A. The diversity of BVDV subgenotypes in a vaccinated dairy cattle herd
1297 in Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, vol. 46, no. 1, p. 87–92, 2014.
1298 <https://doi.org/10.1007/s11250-013-0451-y>.
- 1299 PAIXÃO, S. F.; FRITZEN, J. T. T.; CRESPO, S. E. I.; DE MORAES PEREIRA, H.;
1300 ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Bovine viral diarrhea virus subgenotype 1b in water
1301 buffalos (*Bubalus bubalis*) from Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, vol.
1302 50, no. 8, p. 1947–1950, 2018. <https://doi.org/10.1007/s11250-018-1625-4>.
- 1303 PAN, S.; MOU, C.; CHEN, Z. An emerging novel virus: Atypical porcine pestivirus
1304 (APPV). **Reviews in Medical Virology**, vol. 29, no. 1, p. 1–8, 2019.
1305 <https://doi.org/10.1002/rmv.2018>.
- 1306 PATON, D. J.; DONE, S. H. Congenital infection of pigs with ruminant-type
1307 pestiviruses. **Journal of Comparative Pathology**, vol. 111, no. 2, p. 151–163, 1994.
1308 [https://doi.org/10.1016/S0021-9975\(05\)80047-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9975(05)80047-7).
- 1309 PAYNE, S. Family Herpesviridae. *In*: KING, A. M. Q.; ADAMS, M.; CARSTENS, E. B.;
1310 LEFTKOWITC, E. J. (eds.). **Viruses**. 1th ed. [S. l.]: Elsevier Inc., 2017. p. 269–278.
1311 <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-803109-4.00034-9>.
- 1312 PECORA, A.; MALACARI, D. A.; RIDPATH, J. F.; PEREZ AGUIRREBURUALDE, M.
1313 S.; COMBESSIES, G.; ODEÓN, A. C.; ROMERA, S. A.; GOLEMBBA, M. D.;
1314 WIGDOROVITZ, A. First finding of genetic and antigenic diversity in 1b-BVDV isolates
1315 from Argentina. **Research in Veterinary Science**, vol. 96, no. 1, p. 204–212, 2014.
1316 <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.11.004>.
- 1317 PEDROSA, F.; SALERNO, R.; PADILHA, F. V. B.; GALETTI, M. Current distribution of
1318 invasive feral pigs in Brazil: Economic impacts and ecological uncertainty. **Natureza &**
1319 **Conservação**, vol. 13, no. 1, p. 84–87, 2015.
1320 <https://doi.org/10.1016/j.ncon.2015.04.005>.
- 1321 PEELER, E. J.; OIDTMANN, B. C.; MIDTLYNG, P. J.; MIOSSEC, L.; GOZLAN, R. E.
1322 Non-native aquatic animals introductions have driven disease emergence in Europe.
1323 **Biological Invasions**, vol. 13, no. 6, p. 1291–1303, 2011.
1324 <https://doi.org/10.1007/s10530-010-9890-9>.
- 1325 PETERHANS, E.; BACHOFEN, C.; STALDER, H.; SCHWEIZER, M. Cytopathic
1326 bovine viral diarrhea viruses (BVDV): Emerging pestiviruses doomed to extinction.
1327 **Veterinary Research**, vol. 41, no. 6, 2010. <https://doi.org/10.1051/vetres/2010016>.

- 1328 PETERHANS, E.; SCHWEIZER, M. Pestiviruses: How to outmaneuver your hosts.
 1329 **Veterinary Microbiology**, vol. 142, no. 1–2, p. 18–25, 2010.
 1330 <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.09.038>.
- 1331 PORTO, G. S.; AGNOL, A. M. D.; LEME, R. A.; SOUZA, T. C. G. D. de; ALFIERI, A.
 1332 A.; ALFIERI, A. F. Detection of *Pestivirus A* (bovine viral diarrhea virus 1) in free-living
 1333 wild boars in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2021.
 1334 <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s42770-021-00449-8>.
- 1335 RICCIARDI, A.; BLACKBURN, T. M.; CARLTON, J. T.; DICK, J. T. A.; HULME, P. E.;
 1336 IACARELLA, J. C.; JESCHKE, J. M.; LIEBHOLD, A. M.; LOCKWOOD, J. L.;
 1337 MACISAAC, H. J.; PYŠEK, P.; RICHARDSON, D. M.; RUIZ, G. M.; SIMBERLOFF, D.;
 1338 SUTHERLAND, W. J.; WARDLE, D. A.; ALDRIDGE, D. C. Invasion Science: A Horizon
 1339 Scan of Emerging Challenges and Opportunities. **Trends in Ecology and Evolution**,
 1340 vol. 32, no. 6, p. 464–474, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2017.03.007>.
- 1341 RICHTER, V.; LEBL, K.; BAUMGARTNER, W.; OBRITZHAUSER, W.; KÄSBOHRER,
 1342 A.; PINIOR, B. A systematic worldwide review of the direct monetary losses in cattle
 1343 due to bovine viral diarrhoea virus infection. **The Veterinary Journal**, vol. 220, no. 1,
 1344 p. 80–87, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2017.01.005>.
- 1345 RIDPATH, J. Preventive strategy for BVDV infection in North America. **Japanese**
 1346 **Journal of Veterinary Research**, vol. 60, no. 41–49, 2012.
- 1347 RIDPATH, J. F. Bovine Viral Diarrhea Virus: Global Status. **Veterinary Clinics of**
 1348 **North America - Food Animal Practice**, vol. 26, no. 1, p. 105–121, 2010.
 1349 <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2009.10.007>.
- 1350 RIDPATH, J. F.; NEILL, J. D. Challenges in identifying and determining the impacts of
 1351 infection with pestiviruses on the herd health of free ranging cervid populations.
 1352 **Frontiers in Microbiology**, vol. 7, no. JUN, p. 1–7, 2016.
 1353 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00921>.
- 1354 ROSA, C. A. da; DE ALMEIDA CURI, N. H.; PUERTAS, F.; PASSAMANI, M. Alien
 1355 terrestrial mammals in Brazil: current status and management. **Biological Invasions**,
 1356 vol. 19, no. 7, p. 2101–2123, 2017. <https://doi.org/10.1007/s10530-017-1423-3>.
- 1357 ROSA, C. A. Da; WALLAU, M. O.; PEDROSA, F. Hunting as the main technique used
 1358 to control wild pigs in Brazil. **Wildlife Society Bulletin**, vol. 42, no. 1, p. 111–118,
 1359 2018. <https://doi.org/10.1002/wsb.851>.
- 1360 RUIZ-FONS, F.; SEGALÉS, J.; GORTÁZAR, C. A review of viral diseases of the
 1361 European wild boar: Effects of population dynamics and reservoir rôle. **Veterinary**
 1362 **Journal**, vol. 176, no. 2, p. 158–169, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.02.017>.
- 1363 RUSHTON, S. P.; LURZ, P. W. W.; GURNELL, J.; NETTLETON, P.; BRUEMMER, C.;
 1364 SHIRLEY, M. D. F.; SAINSBURY, A. W. Disease threats posed by alien species: The
 1365 role of a poxvirus in the decline of the native red squirrel in Britain. **Epidemiology and**
 1366 **Infection**, vol. 134, no. 3, p. 521–533, 2006.
 1367 <https://doi.org/10.1017/S0950268805005303>.
- 1368 SAGUA, M. I.; FIGUEROA, C. E.; ACOSTA, D. B.; FERNÁNDEZ, G. P.; CARPINETTI,

- 1369 B. N.; BIROCHIO, D.; MERINO, M. L. Inferring the origin and genetic diversity of the
1370 introduced wild boar (*Sus scrofa*) populations in Argentina: an approach from
1371 mitochondrial markers. **Mammal Research**, vol. 63, no. 4, p. 467–476, 2018.
1372 <https://doi.org/10.1007/s13364-018-0380-2>.
- 1373 SALIKI, J. T.; DUBOVI, E. J. Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhea virus
1374 infections. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, vol. 20, no.
1375 1, p. 69–83, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2003.11.005>.
- 1376 SALVADOR, C.; FERNANDEZ, F. A. S. Using the Eurasian wild boar phenotype as a
1377 basis to document a new process of invasion by *Sus scrofa* L. in a neotropical
1378 biodiversity hotspot. **Wildlife Biology in Practice**, vol. 10, no. 3, p. 22–29, 2014.
1379 <https://doi.org/10.2461/wbp.2014.un.4>.
- 1380 SALVADOR, C. H. **Ecologia e Manejo de Javali (*Sus scrofa* L.) na América do Sul.**
1381 2012. 152 f. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2012.
1382 <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.4120.1360>.
- 1383 SALVADOR, C. H. **Plano Nacional de Prevenção, Controle e Monitoramento de**
1384 **javali (*Sus scrofa*) no Brasil.** Brasília, DF: [s. n.], 2017.
- 1385 SALVADOR, C. H.; FERNANDEZ, F. Biological invasion of wild boar and feral pigs
1386 *Sus scrofa* (Suidae) in south america: Review and mapping with implications for
1387 conservation of peccaries (Tayassuidae). **Ecology, Conservation and Management**
1388 **of Wild Pigs and Peccaries**. [S. l.: s. n.], 2017. p. 313–324.
1389 <https://doi.org/10.1017/9781316941232.031>.
- 1390 SCHWEIZER, M.; PETERHANS, E. Pestiviruses. **Annual Review of Animal**
1391 **Biosciences**, vol. 2, p. 141–163, 2014. [https://doi.org/10.1146/annurev-animal-](https://doi.org/10.1146/annurev-animal-022513-114209)
1392 [022513-114209](https://doi.org/10.1146/annurev-animal-022513-114209).
- 1393 SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE. **Grupo Técnico sobre Espécies Exóticas com**
1394 **Potencial de Invasão Resolução Conjunta SMA / SAA / SS 01 , de 15 / 10 / 2012,**
1395 n. 1. [S. l.: s. n.], 2013.
- 1396 SEVERO, D. R. T.; WERLANG, R. A.; MORI, A. P.; BALDI, K. R. A.; MENDES, R. E.;
1397 SURIAN, S. R. S.; COLDEBELLA, A.; KRAMER, B.; TREVISOL, I. M.; GOMES, T. M.
1398 A.; SILVA, V. S. Health profile of free-range wild boar (*Sus scrofa*) subpopulations
1399 hunted in Santa Catarina State, Brazil. **Transboundary and Emerging Diseases**, , p.
1400 0–2, 2020. <https://doi.org/10.1111/tbed.13752>.
- 1401 SILVA, P. V. C. da. **CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE JAVALIS POR MEIO DE**
1402 **MARCADORES MICROSSATÉLITES** Paula. 2007. 46 f. Faculdade de Ciências
1403 Agrárias e Veterinárias – Unesp, 2007.
- 1404 SIMBERLOFF, D. The role of propagule pressure in biological invasions. **Annual**
1405 **Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, vol. 40, p. 81–102, 2009.
1406 <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.110308.120304>.
- 1407 SIMMONDS, P.; BECHER, P.; BUKH, J.; GOULD, E. A.; MEYERS, G.; MONATH, T.;
1408 MUERHOFF, S.; PLETNEV, A.; RICO-HESSE, R.; SMITH, D. B.; STAPLETON, J. T.
1409 ICTV virus taxonomy profile: Flaviviridae. **Journal of General Virology**, vol. 98, no. 1,

- 1410 p. 2–3, 2017. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000672>.
- 1411 SMITH, D. B.; MEYERS, G.; BUKH, J.; GOULD, E. A.; MONATH, T.; MUERHOFF, A.
1412 S.; PLETNEV, A.; RICO-HESSE, R.; STAPLETON, J. T.; SIMMONDS, P.; BECHER,
1413 P. Proposed revision to the taxonomy of the genus *Pestivirus*, family Flaviviridae.
1414 **Journal of General Virology**, vol. 98, no. 8, p. 2106–2112, 2017.
1415 <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000873>.
- 1416 SMITH, M. T.; BENNETT, A. M.; GRUBMAN, M. J.; BUNDY, B. C. Foot-and-mouth
1417 disease: Technical and political challenges to eradication. **Vaccine**, vol. 32, no. 31, p.
1418 3902–3908, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.04.038>.
- 1419 SPEAR, P. G.; LONGNECKER, R. Herpesvirus Entry: an Update. **Journal of**
1420 **Virology**, vol. 77, no. 19, p. 10179–10185, 2003.
1421 <https://doi.org/10.1128/jvi.77.19.10179-10185.2003>.
- 1422 STACK, G.; STACEY, M. A.; HUMPHREYS, I. R. Herpesvirus exploitation of host
1423 immune inhibitory pathways. **Viruses**, vol. 4, no. 8, p. 1182–1201, 2012.
1424 <https://doi.org/10.3390/v4081182>.
- 1425 STANDISH, R. J. Experimenting with methods to control *Tradescantia fluminensis*, an
1426 invasive weed of native forest remnants in New Zealand. **New Zealand Journal of**
1427 **Ecology**, 2002, vol. 26, no. 2, p. 161–170, 2002.
- 1428 TAO, J.; LIAO, J.; WANG, Y.; ZHANG, X.; WANG, J.; ZHU, G. Bovine viral diarrhea
1429 virus (BVDV) infections in pigs. **Veterinary Microbiology**, vol. 165, no. 3–4, p. 185–
1430 189, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.03.010>.
- 1431 TAUTZ, N.; TEWS, B. A.; MEYERS, G. **The Molecular Biology of Pestiviruses**. 1st
1432 ed. [S. l.]: Elsevier Inc., 2015. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2015.03.002>.
- 1433 TERPSTRA, C.; WENSVOORT, G. A congenital persistent infection of bovine virus
1434 diarrhoea virus in PIGS: Clinical, virological and immunological observations.
1435 **Veterinary Quarterly**, vol. 19, no. 3, p. 97–101, 1997.
1436 <https://doi.org/10.1080/01652176.1997.9694750>.
- 1437 TRCKA, I.; LAMKA, J.; SUCHY, R.; KOPECNA, M.; BERAN, V.; MORAVKOVA, M.;
1438 HORVATHOVA, A.; BARTOS, M.; PARMOVA, I.; PAVLIK, I. Mycobacterial infections
1439 in European wild boar (*Sus scrofa*) in the Czech Republic during the years 2002 to
1440 2005. **Veterinarni Medicina**, vol. 51, no. 5, p. 320–332, 2006.
1441 <https://doi.org/10.17221/5552-VETMED>.
- 1442 TUCKER, A. W.; MCNEILLY, F.; MEEHAN, B.; GALBRAITH, D.; MCARDLE, P. D.;
1443 ALLAN, G.; PATIENCE, C. Methods for the exclusion of circoviruses and
1444 gammaherpesviruses from pigs. **Xenotransplantation**, vol. 10, no. 4, p. 343–348,
1445 2003. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3089.2003.02048.x>.
- 1446 TURCITU, MIHAI A, BĂRBOI, GH, VUTA, VLAD, ZAMFIR, LENUȚA, COSTE,
1447 HANDAN, BONCEA, D. Preliminary results regarding bovine viral diarrhea virus
1448 epidemiology in Romanian wild boars. **Analele Universitatii Spiru Haret**, vol. 11, no.
1449 11, 2010.

- 1450 ULRICH, S.; GOLTZ, M.; EHLERS, B. Characterization of the DNA polymerase loci of
1451 the novel porcine lymphotropic herpesviruses 1 and 2 in domestic and feral pigs.
1452 **Journal of General Virology**, vol. 80, no. 12, p. 3199–3205, 1999.
1453 <https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-12-3199>.
- 1454 VANDEVANTER, D. R.; WARRENER, P.; BENNETT, L.; SCHULTZ, E. R.; COULTER,
1455 S.; GARBER, R. L.; ROSE, T. M. Detection and analysis of diverse herpesviral species
1456 by consensus primer PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, vol. 34, no. 7, p. 1666–
1457 1671, 1996.
- 1458 VILČEK, Š.; NETTLETON, P. F. Pestiviruses in wild animals. **Veterinary**
1459 **Microbiology**, vol. 116, no. 1–3, p. 1–12, 2006.
1460 <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.06.003>.
- 1461 VILELA, A. A.; DEL-CLARO, K. Feeding behavior of the black-tufted-ear Marmoset
1462 (*Callithrix penicillata*) (Primata, Callitrichidae) in a tropical cerrado savanna.
1463 **Sociobiology**, vol. 58, no. 2, p. 309–314, 2011.
- 1464 VILELA, S. L.; DE FARIA, D. S. Seasonality of the activity pattern of *Callithrix*
1465 *penicillata* (Primates, Callitrichidae) in the cerrado (scrub savanna vegetation).
1466 **Brazilian journal of biology**, vol. 64, no. 2, p. 363–370, 2004.
1467 <https://doi.org/10.1590/s1519-69842004000200023>.
- 1468 VIRGIN, H. W. The virome in mammalian physiology and disease. **Cell**, vol. 157, no.
1469 1, p. 142–150, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.032>.
- 1470 VIRGIN, H. W.; WHERRY, E. J.; AHMED, R. Redefining Chronic Viral Infection. **Cell**,
1471 vol. 138, no. 1, p. 30–50, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.06.036>.
- 1472 VITULE, J. R. S.; FREIRE, C. A.; SIMBERLOFF, D. Introduction of non-native
1473 freshwater fish can certainly be bad. **Fish and Fisheries**, vol. 10, no. 1, p. 98–108,
1474 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1467-2979.2008.00312.x>.
- 1475 VITULE, J. R. S.; PRODOCIMO, V. Introdução de espécies não nativas e invasões
1476 biológicas. **Estudos de Biologia**, vol. 34, no. 83, p. 225–237, 2012.
1477 <https://doi.org/10.7213/estud.biol.7335>.
- 1478 WANG, F.; GAOWA, W.; LIU, C.; SUN, Y.; ZHENG, B.; YANG, Y.; ZHAO, H.; WANG,
1479 H.; LI, X.; MA, Z.; JIN, M.; SONG, Q.; ZHANG, H.; WEN, Y.-J. Novel Subgenotypes of
1480 Bovine Viral Diarrhea Virus based on 5' UTR Molecular Epidemiology in Cattle from
1481 Huhhot of Inner Mongolia Autonomous Region, China. **MedRead Journal of**
1482 **Veterinary Science Research**, vol. 1, no. 1, p. 1–7, 2020.
- 1483 WEBER, MATHEUS N.; PINO, ELOISA H. M.; SOUZA, CARINE K.; MÓSENA, ANA
1484 C.S.; BARCELLOS, DAVID E. S. N.; CANAL, C. W. Primeira evidência da infecção
1485 pelo vírus da diarreia viral bovina em javalis. **Acta Scientiae Veterinariae**, vol. 44, no.
1486 September, p. 1–5, 2016.
- 1487 WEHR, N. H. Historical range expansion and biological changes of *Sus scrofa*
1488 corresponding to domestication and feralization. **Mammal Research**, 2020.
1489 <https://doi.org/10.1007/s13364-020-00534-7>.

- 1490 WEHR, N. H.; HESS, S. C.; LITTON, C. M. Biology and Impacts of Pacific Islands
1491 Invasive Species. 14. *Sus scrofa*, the Feral Pig (Artiodactyla: Suidae). **Pacific**
1492 **Science**, vol. 72, no. 2, p. 177–198, 2018. <https://doi.org/10.2984/72.2.1>.
- 1493 WIERINGA-JELSMA, T.; QUAK, S.; LOEFFEN, W. L. A. Limited BVDV transmission
1494 and full protection against CSFV transmission in pigs experimentally infected with
1495 BVDV type 1b. **Veterinary Microbiology**, vol. 118, no. 1–2, p. 26–36, 2006.
1496 <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.06.014>.
- 1497 WILLIAMS, D. T.; MACKENZIE, J. S.; BINGHAM, J. Flaviviruses. *In*: ZIMMERMAN, J.
1498 J.; KARRIKE, L. A.; RAMIREZ, A. (eds.). **Diseases of Swine**. Eleventh. Pondicherry,
1499 India: Wiley-Blackwell, 2019. p. 530–543. <https://doi.org/10.1111/j.1751->
1500 [0813.1964.tb04494.x](https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1964.tb04494.x).
- 1501 WOLFMEYER, A.; WOLF, G.; BEER, M.; STRUBE, W.; HEHNEN, H.-R.; SCHMEER,
1502 N.; KAADEN, O. R. Genomic (5'UTR) and serological differences among German
1503 BVDV field isolates. **Archives of Virology**, vol. 142, no. 10, p. 2049-2057, 1997.
- 1504 YEŞILBAĞ, K.; ALPAY, G.; BECHER, P. Variability and global distribution of
1505 subgenotypes of bovine viral diarrhoea virus. **Viruses**, vol. 9, no. 6, 2017.
1506 <https://doi.org/10.3390/v9060128>.
- 1507 Zarrouk, K.; Piret, J.; Boivin, G. Herpesvirus DNA polymerases: Structures, functions
1508 and inhibitors. **Virus Research**, vol. 234, p.177-192, 2017. [https://](https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.01.019)
1509 doi.org/10.1016/j.virusres.2017.01.019.
- 1510 ZHANG, J.; YOON, K.; ZIMMERMAN, J. Overview of Viruses. *In*: ZIMMERMAN, J. J.;
1511 KARRIKE, L. A.; RAMIREZ, A.; SCHWARTZ, K. |J.; STEVENSON, G. W.; ZHANG, J.
1512 (eds.). **Diseases of Swine**. Eleventh. Pondicherry, India: Wiley-Blackwell, 2019. p.
1513 427–437.
- 1514 ZHAO, D.; FENG, P. Temperature increase impacts personality traits in aquatic non-
1515 native species: Implications for biological invasion under climate change. **Current**
1516 **Zoology**, vol. 61, no. 6, p. 966–971, 2015. <https://doi.org/10.1093/czoolo/61.6.966>.
- 1517 ZHU, H.; Huang, Q.; Hu, X.; Chu, W.; Zhang, J.; Jiang, L.; Yu, X.; Zhang, X.; Cheng,
1518 S. Caprine herpesvirus 2-associated malignant catarrhal fever of captive sika deer
1519 (*Cervus nippon*) in an intensive management system. *BMC Veterinary Research*, vol.
1520 14, no. 38, 2018. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1365-8>.
- 1521 ŽUPANČIĆ, Z.; JUKIĆ, B.; LOJKIĆ, M.; ČAČ, Ž.; JEMERŠIĆ, L.; STAREŠINA, V.
1522 Prevalence of antibodies to classical swine fever, Aujeszky's disease, porcine
1523 reproductive and respiratory syndrome, and bovine viral diarrhoea viruses in wild boars
1524 in Croatia. **Journal of Veterinary Medicine, Series B**, vol. 49, no. 5, p. 253–256,
1525 2002. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0450.2002.00562.x>.

1526 **4 HIPÓTESE**

1527 Javalis capturados no estado do Paraná são hospedeiros de doenças
1528 virais passíveis de serem transmitidas a animais silvestres e domésticos.

1529 **5 OBJETIVOS**

1530 5.1 OBJETIVO GERAL

1531 Estudar o papel do javali de vida livre na epidemiologia das infecções
1532 virais em fragmentos de Mata Atlântica, no estado do Paraná, Brasil.

1533 5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1534 ➤ Estabelecer o perfil sanitário de javalis de vida livre provenientes
1535 do estado do Paraná para agentes etiológicos virais;

1536 ➤ Conhecer a epidemiologia molecular das cepas dos vírus
1537 identificados em javalis de vida livre do estado do Paraná;

1538 ➤ Determinar a ocorrência de infecção múltipla simultânea por
1539 espécies distintas de agentes etiológicos virais;

1540 ➤ Gerar informações que possam melhorar programas sanitários
1541 para o controle e profilaxia de infecções virais em suínos
1542 domésticos e programas de controle e erradicação de javalis no
1543 Brasil.

1544 **6 ARTIGO A – DETECTION OF *PESTIVIRUS A* (BOVINE VIRAL DIARRHEA VIRUS**
1545 **1) IN FREE-LIVING WILD BOARS IN BRAZIL**

1546 O artigo foi publicado em 26 de fevereiro de 2021 no periódico **Brazilian Journal of**
1547 **Microbiology** e encontra-se no formato da publicação.



Detection of *Pestivirus A* (bovine viral diarrhea virus 1) in free-living wild boars in Brazil

Gisele S. Porto^{1,2} · Alais M. Dall Agno^{1,3} · Raquel A. Leme^{1,3} · Tatiana C. G. D. de Souza¹ · Amauri A. Alfieri^{1,2,3} · Alice F. Alfieri^{1,2,3}

Received: 4 September 2020 / Accepted: 3 February 2021
 © Sociedade Brasileira de Microbiologia 2021

Abstract

Bovine viral diarrhea virus (BVDV) is a major pathogen in cattle herds. Considering the epidemiological importance of pestiviruses and the process of wild boar invasion in Brazil, this study aimed to investigate the presence of BVDV in free-living boars. Forty-nine free-living wild boars were collected by exotic wildlife controller agents in 2017 and 2018. The presence of BVDV antibodies was evaluated in 42 serum samples using the virus neutralization test, and the detection of BVDV RNA was performed from the 5'UTR genomic region by RT-PCR assay in 49 lung tissue samples followed by sequencing of amplicons. BVDV neutralizing antibodies in serum were not identified in any of the evaluated samples. However, 3/49 (6.12%) lung samples were positive for BVDV RNA and classified one as BVDV-1a and two as 1d subgenotype. This report identified BVDV RNA in free-living wild boars and these results should be considered in BVDV control programs, especially in extensive beef cattle rearing systems.

Keywords *Sus scrofa* · Swine · BVDV · Cattle herds · Subgenotypes · Biological invasion

Bovine viral diarrhea virus 1 (BVDV-1) and 2 (BVDV-2) belong to the species *Pestivirus A* and *B*, respectively, in the genus *Pestivirus* and family *Flaviviridae*. Pestiviruses are enveloped viruses that have a single-stranded, positive-sense RNA of 11.3 to 13.0 kb [1]. BVDV-1 and BVDV-2 are classified into 21 (1a–1u) and four (2a–2d) subgenotypes, respectively [2].

BVDV is found in dairy and beef cattle herds worldwide and is related to respiratory, reproductive, and enteric problems and immunosuppression in infected animals [3, 4]. Due

to a wide variety of subgenotypes, BVDV is responsible for serious losses in livestock, since the same herd can be infected by several of these subgenotypes [3, 5].

The wild boar *Sus scrofa* Linnaeus, 1758 belongs to the order Cetartiodactyla, family Suidae, with original distribution in Europe, Asia, and North Africa [6]. In Brazil, wild boars are widely distributed in all geographical regions [7] and, due to the ecological, economic, and social effects caused by the invasion process, are considered the most successful invasive mammal in the world [8]. Previous studies suggested that BVDV infection does not cause serious diseases in pigs and wild boars. However, induces a serological cross-reaction with the classical swine fever virus, making diagnosis difficult and negatively interfering with disease monitoring and surveillance programs [9].

Few studies have investigated the presence of BVDV in wild boars [10, 11]. In Brazil, only one study has evaluated the presence of BVDV in captive boars obtained in a slaughterhouse [12]. However, to the best of our knowledge, no studies have evaluated the presence of this virus in free-living boars on the South American continent. Considering the epidemiological importance of pestiviruses for Brazilian cattle herds and the process of wild boar invasion in Brazil, this study investigates the presence of BVDV in free-living boars.

Responsible Editor: Fernando R. Spilki

✉ Amauri A. Alfieri
alfieri@uel.br

- ¹ Laboratory of Animal Virology, Department of Veterinary Preventive Medicine, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil
- ² Multi-User Animal Health Laboratory, Molecular Biology Unit, Department of Veterinary Preventive Medicine, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil
- ³ National Institute of Science and Technology for Dairy Production Chain (INCT – LEITE), Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid-Campus Universitário, PO Box 10011, Londrina, Paraná CEP 86057-970, Brazil

Published online: 26 February 2021

Springer

The study was submitted to the Ethics Committee on Animal Experiments of the Universidade Estadual de Londrina and approved under the identification number 22831.2017.40. All applicable international, national, and institutional guidelines for the care and use of animals were followed. Wild boars were managed by exotic wildlife controller agents who were properly authorized by the Brazilian Institute of Environment and Renewable Natural Resources (IBAMA) and registered in the Federal Technical Register of Potentially Pollutive Activity (CTF/APP). The exotic wildlife controller agents were trained to guarantee the good quality of samples and standardization of epidemiological and additional information, such as sex and weight.

After capturing the animals, weight estimation was performed and categorized into young and adult age classes according to Calado [13] that divided the animals into categories from 0 to 40 kg (young individuals) and over 40 kg (adults individuals). A total of 49 wild boars were captured, of these, 29 animals weighed less than 40 kg and 20 weighed more than 40 kg. Samples of 11 young and three adult wild boars from the north region and 18 young and 17 adult wild boars from the Campos Gerais region were analyzed.

From these captured animals, 49 lung tissue samples and 42 serum samples from 49 free-living wild boars were collected in the years 2017 and 2018 in the north ($n = 14$ lungs and $n = 7$ serums) and Campos Gerais ($n = 35$ lungs and $n = 35$ serums) regions in the state of Paraná, southern Brazil. Serum samples from some animals were not evaluated because the collection of these specimens was not possible.

Suspensions (10% w/v) were prepared from lung tissue samples that were mechanically disrupted (MagNa Lyser Instrument, Roche Diagnostics®, Mannheim, Germany), homogenized in 0.01 M phosphate-buffered saline (PBS) at pH 7.2, and clarified by centrifugation at $2000\times g$ for 10 min. The nucleic acid extraction was performed from 500 μ L proteinase K pretreated aliquots of the tissue suspensions using a combination of phenol/chloroform/isoamyl alcohol and silica/guanidine isothiocyanate methods [14, 15]. The extracted nucleic acids were eluted in 50 μ L UltraPure™ DEPC-treated water (Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and stored at -80 °C. Sterile, ultrapure water was used as a negative control in all of the nucleic acid extractions and subsequent procedures.

The presence of antibodies against BVDV in wild boar serum samples was evaluated using the virus neutralization (VN) test. The VN test was performed in Madin-Darby bovine kidney (MDBK) cells and 100 tissue culture infective doses 50% (TCID₅₀) of the cell culture adapted BVDV-1a prototype (Singer strain), according to the Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals [16]. After, the incubation time of 96 h, the neutralizing titer was considered the reciprocal of the highest serum dilution capable of neutralizing virus replication. Neutralizing activity of serum samples with dilution $\geq 1:10$ was considered positive [17].

The detection of BVDV RNA was performed by RT-PCR, using the PanPesti (324 and 326) primers designed to amplify a 288-bp fragment from the 5' untranslated region (5'UTR) of pestivirus genome [18].

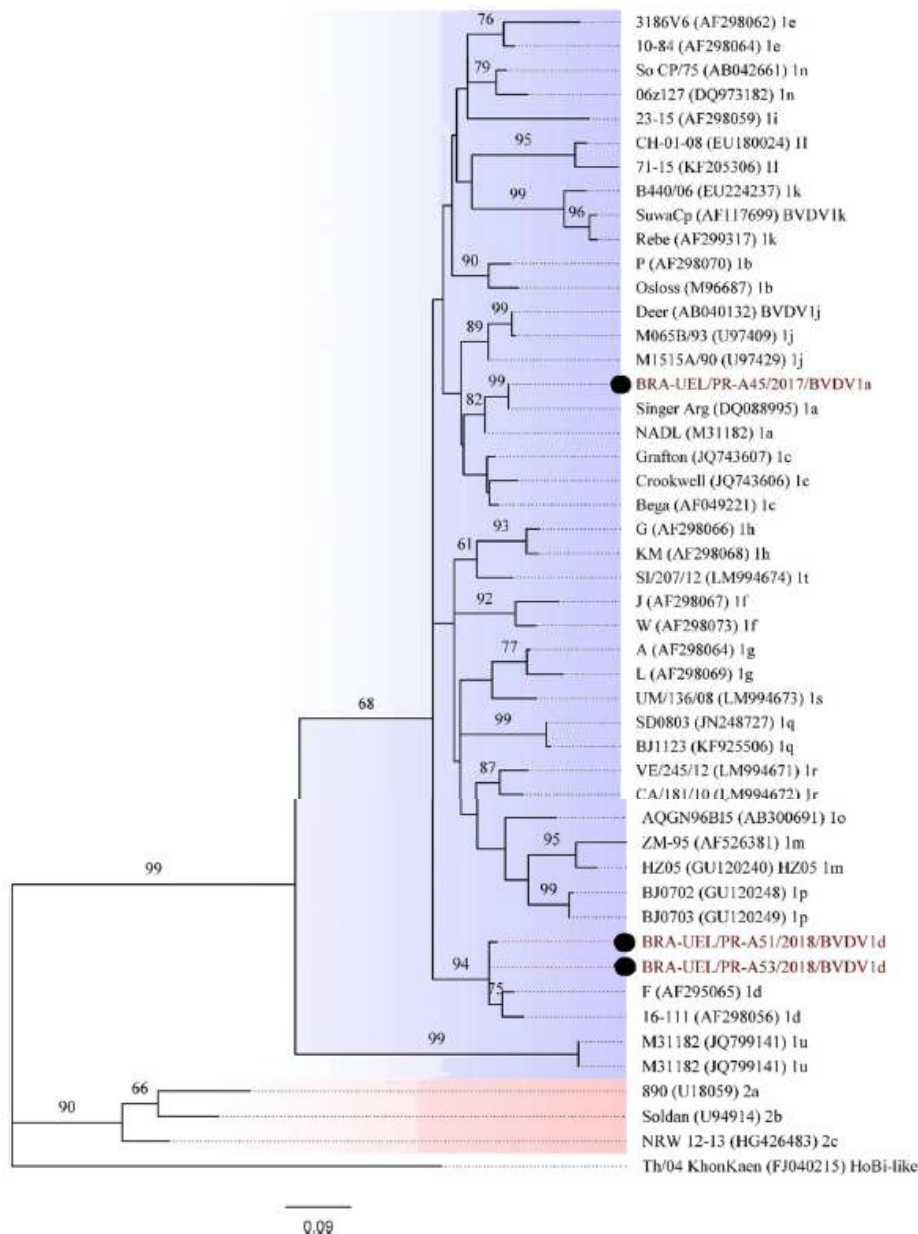
The amplified products were purified using the PureLink® Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit (Invitrogen® Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), quantified using a Qubit® Fluorometer (Invitrogen® Life Technologies, Eugene, OR, USA), and submitted to sequencing in both directions with the same forward and reverse primers used in the molecular assays on an ABI3500 Genetic Analyzer sequencer with the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA). Sequence quality analyses and consensus sequences were obtained using PHRED and CAP3 software (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>), respectively. Similarity searches were performed with nucleotide (nt) sequences deposited in GenBank using the Basic Local Alignment Search Tool software (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Phylogenetic trees were constructed in Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA X) software based on the Maximum Likelihood method and p-distance model, with bootstrap analysis of 1000 replicates by using the Akaike information criterion (AIC). The nt sequence identity matrices were constructed using the BioEdit software v. 7.0.26.

In this survey, all 42 serum samples from free-living wild boars analyzed by the VN test for BVDV antibodies were negative. However, three (6.12%) of the 49 lung tissue samples were positive for BVDV RNA. All three BVDV-positive animals were young (between 10 and 12 kg): one was female and the other two were males. All BVDV-positive wild boars were managed in the north Paraná. The wild boars were managed in different hunting expeditions with one animal being captured in 2017 and the other two in 2018. In the negative controls, no product was amplified.

Sequencing analyses confirmed the specificity of the three amplicons from the BVDV 5'UTR genomic region obtained in this study. The wild boar-derived BVDV strains were named BRA-U-EL/PR-A45/2017, BRA-U-EL/PR-A51/2018, and BRA-U-EL/PR-A53/2018 and were submitted to the GenBank database under accession numbers MT437382, MT437383, and MT437384, respectively.

The comparison of the BVDV strains in this study with the other 47 known strains of BVDV-1 and -2 revealed that all the three nt sequences are BVDV-1 (Fig. 1). The strain BRA-U-EL/PR-A45/2017 was classified as BVDV-1a subgenotype, and the other two strains, BRA-U-EL/PR-A51/2018 and BRA-U-EL/PR-A53/2018 were classified as BVDV-1d subgenotype. Subsequently, the strains in this study were compared with other 33 strains of BVDV-1a and -1d, including reference strains and strains identified in cattle and pigs from Brazil and South American (Fig. 2). The comparison of

Fig. 1 Molecular phylogenetic analysis by maximum Likelihood method. Phylogenetic tree based on 252-bp length of the 5'UTR genomic region of three BVDV strains described in this study and 47 BVDV strains representatives of the different subgenotypes. The tree was constructed using maximum likelihood method and the Kimura two-parameter model using the Akaike information criterion (AIC). Bootstrap values were determined in 1000 replicates. Values of Bootstrap >50 are indicated at the internal nodes. The GenBank accession numbers of the strains are provided in parentheses, and the Brazilian BVDV strains identified in wild boars are marked with filled circles. Out-group: HoBi-like strain Th/04_KhonKaen (FJ040215)



quences revealed nt identity range from 89.1 to 100% for VDV-1a and 97.5 to 99.5% for BVDV-1d. The BRA-UEL/PR-A45/2017 strain exhibited 100% nt identity with the VDV-1a Singer_Arg strain (GenBank accession number: Q088995) [19] and 99% of nt identity with the BVDV-1a ADL strain (GenBank accession number: AJ133738) [20]. Comparative analysis between the BRA-UEL/PR-A51/2018 and BRA-UEL/PR-A53/2018 strains showed 100% nt identity to each other. Both BRA-UEL/PR-A51/2018 and BRA-UEL/PR-A53/2018 strains showed 97.5% nt identity

when compared to the BVDV-1d F strain (GenBank accession number: AF298065) [21].

The circulation of BVDV in commercial pig herds has been reported by several studies worldwide [10, 11, 22], including Brazil [12, 23]. However, to date, few studies have focused on wild boars. In these animals, BVDV was detected in Romania [24] and Serbia [11], and there is also serological evidence of the infection in wild boars in Croatia [10]. In Brazil, the description of this virus in wild boars was described only in captive animals in the Rio Grande do Sul state [12].

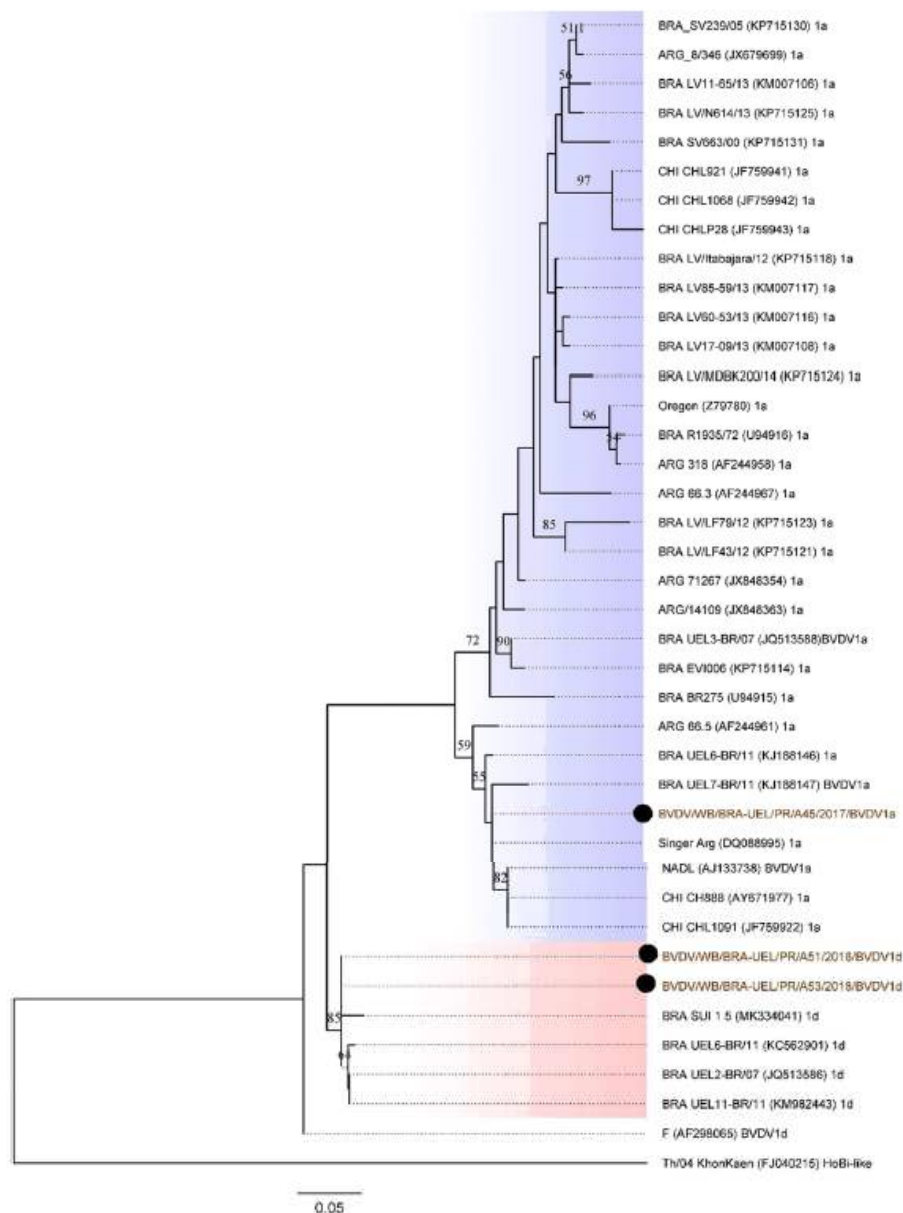


Fig. 2 Molecular phylogenetic analysis by maximum likelihood method. Phylogenetic tree based on 209 bp of the 5'UTR of the three BVDV strains described in this study and representative strains of South America. 28 BVDV-1a strains from Brazil: UEL6-BR/11 (KJ188146), UEL7-BR/11 (KJ188147), UEL3-BR/07 (JQ513588), BR275 (U94915), EV1006 (KP715114), LV/Itabajara/12 (KP715118), LV/MDBK200/14 (KP715124), LV60-53/13 (KM007116), LV85-59/13 (KM007117), LV17-09/13 (KM007108), BRA_SV663/00 (KP715131) LV/LF43/12 (KP715121), SV239/05 (KP715130), LV11-65/13 (KM007106), LV/N614/13 (KP715125), R1935/72 (U94916), LV/LF79/12 (KP715123); from Chile: CH888 (AY671977), CHL1091 (JF759922), CHL921 (JF759941), CHL1068 (JF759942), CHLP28 (JF759943), and from Argentina: 318 (AF244958), 66.5 (AF244961), 14,109 (JX848363),

71,267 (JX848354), 8/346 (JX679699), 66.3 (AF244967). Four BVDV-1d strains from Brazil: UEL2-BR/07 (JQ513586), UEL11-BR/11 (KM982443), UEL6-BR/11 (KC562901), swine SUI_1 (MK334041). The strains representatives of BVDV1a were Singer_Arg (DQ088995), NADL (AJ133738), Oregon (Z79780), and BVDV-1d was F (AF298065). The tree was constructed using maximum likelihood method and the Tamura 3-parameter model with gamma correction (G+I) was the best-fit model using the Akaike information criterion (AIC). Bootstrap values were determined in 1000 replicates. Values of Bootstrap >50 are indicated at the internal nodes. The GenBank accession numbers of the strains are provided in parentheses, and the Brazilian BVDV strains identified in wild boars are marked with filled circles. Out-group: HoBi-like strain Th/04_KhonKaen (FJ040215)

BVDV neutralizing antibodies were not identified in any of the serum samples. However, in other studies, anti-BVDV antibodies were identified only in a notably small proportion of animals [10, 22], which leads us to believe that the sampling in this study was small in the region where the virus was detected circulating in wild boars, since we obtained in the total only seven sera from the north region (five sera from young animals and two adults). Unfortunately, in this study, serum samples from RT-PCR-positive lung samples were not available. The remaining 35 sera were obtained from the region of Campos Gerais, where BVDV was not detected in the lung samples.

The BVDV RNA detection rate in this study (6.12%) is higher than that found in the Brazilian study performed in the State of Rio Grande do Sul, in which 2.5% of samples of captive boars were collected in a commercial slaughterhouse were positive. Similar studies, using RT-PCR, conducted in Serbia [11] and Romania [24] identified 8% (4/50) and 28.12% (9/32) of BVDV-positive animals, respectively.

The three wild boars BVDV RNA-positive were from the north region of the state of Paraná. Concerning bovine livestock, beef cattle herds predominate in this region in the extensive grazing system. Given this situation, we speculate that there is a possibility of BVDV direct transmission between cattle and free-living wild boars and, even, indirect transmission through contamination of, for example, water sources are greater. Differently, of the Campos Gerais region, intensive farming predominates, most often in a closed system. Thus, the possibility of contact between cows and free-living wild boars is considerably lower compared to extensive cattle rearing.

Previous studies on wild boars detected the subgenotypes BVDV-1f in Serbia [11] and BVDV-2b in Brazil [12]. In this study, two different subgenotypes BVDV-1a and -1d were detected. A wide variety of BVDV-1 subgenotypes circulate in Brazilian cattle herds, among which BVDV-1a and -1b are the most prevalent followed by BVDV-1d, -1e, and -1i [25]. Since the subgenotypes found in the present study were described as predominant in Brazilian cattle herds, we hypothesize that there was contact between cattle and wild boar, which transit through the same production area and thus facilitate viral transmission between animal species.

The results from the nucleotide sequence comparisons reinforce this hypothesis, since BVDV-1a showed high identity with the reference strains, as identified in cattle herds from Chile and Brazil [26, 27], and BVDV-1d obtained from wild boars in this study presented high similarity (99.5%) with previously reported BVDV strains from bovine originated in the same Brazilian geographical region [5, 22]. The close genetic relationship between the BVDV strains identified in wild boars and cattle predicts that the infection of wild boars occurs through close contact with infected cattle [11].

The detection of two different BVDV subgenotypes (BVDV-1a and -1d) in free-living wild boars captured on the same farm for approximately two years (2017 and 2018) suggests that different subgenotypes of the virus are circulating in wild boar in the studied region. The possibility of transmission within the wild boar population considering the observed in the domesticated subspecies of the wild boar [28] suggests that maybe this species may act in the dissemination of BVDV to cattle and/or to wild ruminants [29]. However, studies with this purpose are needed to clarify this issue.

Considering strong capacity for invasion and the expansion of wild boar populations across Brazilian territory, there is a risk of the spread of BVDV to livestock, domestic pigs, or cattle to wild boar. Furthermore, BVDV infection in pigs and wild boars is asymptomatic, and therefore, the virus can remain in wild boar populations, which may represent a risk factor for cattle herds [11]. This important epidemiological aspect of BVDV infection in the wild boar population may hinder efforts to achieve control and prophylaxis of BVDV in cattle by, for example, vaccination, which is frequently used in Brazilian dairy and beef cattle farms [5].

The data presented in this study confirm predict that wild boar can be a source of infection of different BVDV subgenotypes for the Brazilian cattle herds. However, studies that include viral isolation and other important regions of Brazilian livestock should be conducted to monitor the circulation of BVDV in wild boars. Besides, it is necessary to understand the epidemiological importance of free-living wild boar as transiently and/or persistently infected animal in the dissemination of BVDV both within the wild boar population and for Brazilian dairy and beef cattle herds.

Author contribution Conceptualization: G.S.P. and A.A.A.; Methodology: G.S.P., A.M.D., R.A.L., and T.C.G.D.S.; Writing—original draft preparation: G.S.P. and A.M.D.; Writing—review and editing: R.A.L., A.A.A., and A.F.A.; Supervision: A.A.A. and A.F.A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding This work was supported by the following Brazilian Institutes for financial support: The National Council of Technological and Scientific Development (CNPq), the Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES), the Financing of Studies and Projects (FINEP), and the Araucaria Foundation (FAP/PR). A.F.A. and A.A.A. are recipients of CNPq Fellowships. A.M.D. is a recipient of INCT-Leite/CAPES fellowship (grant number 88887.495081/2020-00). G.S.P. is a recipient of CAPES fellowship.

This work was also supported by the National Institute of Science and Technology of Dairy Production Chain (CNPq/INCT-Leite grant number 465725/2014-7).

Declarations

Ethics approval The study was submitted to the ethics committee on animal experiments of the Universidade Estadual de Londrina and approved under the identification number 22831.2017.40. All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed.

Conflict of interest The authors declare that there is no conflict of interest.

References

- ICTV Genus: Pestivirus Available online: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-ma-viruses/w/Flaviviridae/361/genus-pestivirus. Accessed 12 Feb 2020
- Yeşilbaş K, Alpay G, Becher P (2017) Variability and global distribution of subgenotypes of bovine viral diarrhoea virus. *Viruses* 9. <https://doi.org/10.3390/v9060128>
- Houe H (1999) Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections. *Vet Microbiol* 64:89–107. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(98\)00262-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(98)00262-4)
- Ridpath JF (2010) Bovine viral diarrhoea virus: global status. *Vet Clin N Am - Food Anim Pract* 26:105–121. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2009.10.007>
- Otonel RAA, Alfieri AF, Dezen S, Lunardi M, Headley SA, Alfieri AA (2014) The diversity of BVDV subgenotypes in a vaccinated dairy cattle herd in Brazil. *Trop Anim Health Prod* 46:87–92. <https://doi.org/10.1007/s11250-013-0451-y>
- Deberdt A, Scherer S (2007) O javali asselvajado: ocorrência e manejo da espécie no Brasil. *Nat Conserv* 5:31–34
- Da Rosa CA, Wallau MO, Pedrosa F (2018) Hunting as the main technique used to control wild pigs in Brazil. *Wildl Soc Bull* 42:111–118. <https://doi.org/10.1002/wsb.851>
- Lewis JS, Corn JL, Mayer JJ, Jordan TR, Farnsworth ML, Burdett CL, VerCauteren KC, Sweeney SJ, Miller RS (2019) Historical, current, and potential population size estimates of invasive wild pigs (*Sus scrofa*) in the United States. *Biol Invasions* 21:2373–2384. <https://doi.org/10.1007/s10530-019-01983-1>
- de Oliveira LG, Mechler-Dreibl ML, Almeida HMS, Gatto IRH (2020) Bovine viral diarrhoea virus: recent findings about its occurrence in pigs. *Viruses* 12:1–12. <https://doi.org/10.3390/v12060600>
- Župančić Z, Jukić B, Lojkić M, Čač Ž, Jemeršić L, Starešina V (2002) Prevalence of antibodies to classical swine fever, Aujeszky's disease, porcine reproductive and respiratory syndrome, and bovine viral diarrhoea viruses in wild boars in Croatia. *J Veterinary Med Ser B* 49:253–256. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0450.2002.00562.x>
- Miličević V, Maksimović-Zorić J, Veljović LJ, Kureljušić B, Savić B, Cvetojević Đ, Jezdimirović N, Radosavljević V (2018) Bovine viral diarrhoea virus infection in wild boar. *Res Vet Sci* 119:76–78. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2018.05.018>
- Weber MN, Pino EHM, Souza CK, Mósena ACS, Barcellos DEN, Canal CW (2016) Primeira evidência da infecção pelo vírus da diarréia viral bovina em javalis. *Acta Sci Vet* 44:1–5
- Calado MRM (2009) Biologia e parasitoses do javali (*Sus Scrofa*) e repovoamento de coelho-bravo (*Oryctolagus cuniculus*). 3
- Boom R, Sol CJA, Salimans MMM, Jansen CL, Wertheim-Van Dillen PME, Van Der Noordaa J (1990) Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 28:495–503. <https://doi.org/10.1128/jcm.28.3.495-503.1990>
- Alfieri AA, Parazzi ME, Takiuchi E, Médici KC, Alfieri AF (2006) Frequency of group A rotavirus in diarrhoeic calves in Brazilian cattle herds, 1998–2002. *Trop Anim Health Prod* 38:521–526. <https://doi.org/10.1007/s11250-006-4349-9>
- OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2019
- Paixão SF, Fritzen JTT, Alfieri AF, Alfieri AA (2018) Virus neutralization technique as a tool to evaluate the virological profile for bovine viral diarrhoea virus infection in dairy water buffalo (*Bubalus bubalis*) herds. *Trop Anim Health Prod* 50:911–914. <https://doi.org/10.1007/s11250-017-1503-5>
- Vilček S, Herring AJ, Herring JA, Nettleton PF, Lowings JP, Paton DJ (1994) Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. *Arch Virol* 136:309–323
- Jones LR, Zandomeni RO, Weber EL (2006) A long distance RT-PCR able to amplify the Pestivirus genome. *J Virol Methods* 134:197–204. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.01.005>
- Vilček Š, Paton DJ, Durković B, Strojny L, Ibata G, Moussa A, Loitsch A, Rossmannith W, Vega S, Scicluna MT, Palfi V (2001) Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups. *Arch Virol* 146:99–115
- Oliveira VHS, Dall Agnol AM, Fritzen JTT, Lorenzetti E, Alfieri AA, Alfieri AF (2020) Microbial diversity involved in the etiology of a bovine respiratory disease outbreak in a dairy calf rearing unit. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 71:101494. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2020.101494>
- Sedlak K, Bartova E, Machova J (2008) Antibodies to selected viral disease agents in wild boars from the Czech Republic. *J Wildl Dis* 44:777–780. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-44.3.777>
- Gatto IRH, Cotrin JAB, Almeida HMS, Mechler ML, Oliveira LG (2017) Sectional study of the occurrence of bovine viral diarrhoea virus in pig farms in São Paulo State. *Rev Bras Hig Sanidade Anim* 11:365–373
- Turcitu MA, Bârboi G, Vuta V, Zamfir L, Coste H, Boncea D (2010) Preliminary results regarding bovine viral diarrhoea virus epidemiology in Romanian wild boars. *Analele Univ Spiru Haret* .11
- Flores EF, Cargnelutti JF, Monteiro FL, Bauermann FV, Ridpath JF, Weiblen R (2018) A genetic profile of bovine pestiviruses circulating in Brazil (1998–2018). *Anim Health Res Rev* 19:134–141. <https://doi.org/10.1017/S1466252318000130>
- Donoso A, Inostroza F, Celedón M, Pizarro-Lucero J Genetic diversity of bovine viral diarrhoea virus from cattle in Chile between 2003 and 2007. *BMC Vet Res* 2018(14):1–10. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1641-7>
- Figueiredo Pd O, de Oliveira DB, Figueiredo LB, Costa GB, Alves PA, Guedes MIMC, Barbosa-Stancio EF, Drumond BP, Abrahão JS, Kroon EG et al (2019) Molecular detection and phylogeny of bovine viral diarrhoea virus 1 among cattle herds from Northeast, Southeast, and Midwest regions, Brazil. *Braz J Microbiol* 50:571–577. <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00064-8>
- Nascimento KA, Mechler ML, Gatto IRH, Almeida HMS, Pollo AS, Sant'Ana FJF, Pedrosa PMO, De Oliveira LG (2018) Evidence of bovine viral diarrhoea virus transmission by back pond water in experimentally infected piglets. *Pesqui Vet Bras* 38:1896–1901. <https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-5629>
- Ricci S, Bartolini S, Morandi F, Cuteri V, Preziuso S (2019) Genotyping of Pestivirus A (Bovine Viral Diarrhoea Virus 1) detected in faeces and in other specimens of domestic and wild ruminants at the wildlife-livestock interface. *Vet Microbiol* 235:180–187. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.07.002>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

1554 **PORCINE LYMPHOTROPIC HERPESVIRUS IN BRAZILIAN FREE-LIVING WILD**
1555 **BOARS**

1556 O artigo foi aceito para publicação em *Journal of Veterinary Science*, e encontra-
1557 se nas normas do referido periódico

1558 **Original articles**

1559 **Porcine lymphotropic herpesvirus (*Gammaherpesvirinae*) DNA in free-living wild boars**
1560 **(*Sus scrofa* Linnaeus, 1758) in Brazil**

1561

1562 **Porcine lymphotropic herpesvirus in Brazilian free-living wild boars**

1563 Gisele S. **Porto**^{1,2}, Raquel A. **Leme**¹, Alais M. Dall **Agnol**¹, Tatiana C.G.D. de **Souza**¹,
1564 Amauri A. **Alfieri**^{1,2*}, Alice F. **Alfieri**^{1,2}

1565 ¹ Laboratory of Animal Virology, Department of Veterinary Preventive Medicine,
1566 Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil

1567 ² Multi-User Animal Health Laboratory, Molecular Biology Unit, Department of Veterinary
1568 Preventive Medicine, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil
1569 Rodovia Celso Garcia Cid - Campus Universitário. CEP 86057-970 - Londrina, Paraná,
1570 Brazil.

1571 PO Box 10011.

1572 Tel: 55 43 3371 5876 - Fax: 55 43 3371 4485

1573 *Corresponding author: alfieri@uel.br

1574 **ORCID ID**

1575 Gisele da Silva Porto: 0000-0002-4204-6475

1576 Raquel A. Leme: 0000-0002-5911-1261

1577 Alais M. Dall Agnol: 0000-0002-0420-820X

1578 Tatiana C. G. D. de Souza: 0000-0001-7463-6624

1579 Alice F. Alfieri: 0000-0002-8607-956X

1580 Amauri A. Alfieri: 0000-0002-7024-4487

1581 **Author Contributions:** Conceptualization: Porto GS, Alfieri AA; Data curation: Porto GS;
1582 Formal analysis: Porto GS, Dall Agnol AM; Investigation: Porto GS, Souza TCGD;
1583 Methodology, Porto, GS, Dall Agnol AM, Leme RA, Souza TCGDS; Project administration:
1584 Alfieri AF; Resources: Alfieri AA; Supervision: Alfieri AF; Validation: Alfieri AA; Writing -
1585 original draft: Porto, GS, Dall Agnol AM; Writing - review & editing: Leme RA, Alfieri AA,
1586 Alfieri AF.

1587

1588 **Abstract**

1589 **Background:** *Suid gammaherpesvirus 3, 4, and 5* (porcine lymphotropic herpesvirus – PLHV-
1590 1, -2, and -3) are viruses that infect domestic and feral pigs.

1591 **Objectives:** To investigate the presence of PLHV DNA in biological samples from free-living
1592 wild boars circulating in a Brazilian geographical region with a high density of commercial
1593 domestic pigs.

1594 **Methods:** Lung samples of 50 free-living wild boars were collected by exotic wildlife controller
1595 agents between 2017 and 2019 in the state of Paraná, southern Brazil. Additionally, lung and
1596 spleen fragments were obtained from six fetuses, collected by hysterectomy *post mortem* from
1597 a pregnant sow. A PCR assay using consensus primers (pan-herpesviruses) was performed to
1598 detect PLHV DNA. Samples that were detected as positive for PLHV DNA were subjected to
1599 single-round PCR assays with specific primers for identifying PLHV-1 (213-S/215-As), PLHV-
1600 2 (208-S/212-As), and PLHV-3 (886s/886As). The specificity of the species-specific PCR
1601 products was assessed by nucleotide sequencing of the amplicons.

1602 **Results:** Forty-eight (96%) of the 50 lung samples analyzed were positive for PLHV based on
1603 the PCR assay with pan-herpesvirus primers. At least two PLHV species were simultaneously
1604 identified in 33 (68.75%) positive samples. DNA from PLHV-1, -2, and -3 was found in free-
1605 living wild boars of all ages, but not in fetuses, even though they were born from a sow that
1606 was positive for all three viruses.

1607 **Conclusion:** The results show that these viruses are endemic to the population of feral pigs,
1608 found in the Brazilian region evaluated, and as well as in domesticated pigs.

1609 **Keywords:** *Sus scrofa*; swine; PLHV; PTLD; feral pig; biological invasion

1610

1611 1. Introduction

1612 Porcine lymphotropic herpesviruses (PLHVs) are classified into the viral species *Suid*
1613 *gammaherpesvirus 3* (PLHV-1), *Suid gammaherpesvirus 4* (PLHV-2), and *Suid*
1614 *gammaherpesvirus 5* (PLHV-3) in the *Herpesviridae* family, *Gammaherpesvirinae* subfamily,
1615 and *Macavirus* genus [1]. The subfamily has transformative potential and preferential
1616 association with lymphocytes or lymphoid tissue, and many members of this subfamily are
1617 frequently associated with lymphoproliferative disorders [1,2,3]. In addition, PLHV is
1618 frequently detected in domestic and feral pigs with persistent infection of B lymphocytes [4].

1619 PLHV-1 is associated with post-transplant lymphoproliferative disease (PTLD) in
1620 miniature pigs undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation due to the
1621 accentuated increase in PLHV-1 genomic copies in these animals [5]. Furthermore, sequence
1622 analysis and gene expression of PLHV-1 during PTLD in pigs indicated active infection by the
1623 virus, which may be involved in the etiology of this lymphoproliferative disease [6]. However,
1624 these results are from experimental studies, and there is no knowledge of clinical diseases
1625 caused by natural infections with PLHV [3].

1626 Globally, epidemiological studies of PLHV have been conducted in swine (Suidae
1627 family, Cetartiodactyla order), such as domestic pigs (*Sus scrofa domestica*, Linnaeus, 1758),
1628 wild boars (*Sus scrofa* Linnaeus, 1758), bearded pigs (*Sus barbatus* Müller, 1838), and hairy
1629 babirusa (*Babyrousa babyrussa* Linnaeus, 1758) [4,7,8]. In Brazil, only one study involving
1630 PLHV in domestic swine has been conducted [9]. However, the epidemiology of PLHV in wild
1631 boars has not yet been investigated.

1632 Wild boars are originally distributed across Europe, Asia, and northern Africa. In Brazil,
1633 the occurrence of free-living species has been recorded since 1980, especially in southern Brazil
1634 [10,11]. The rapid dispersion of wild boars to other Brazilian regions is a concern because of
1635 the environmental, economic, and health problems caused by invasive species [11].
1636 Considering the dispersion capacity, the history of wild boar invasion in Brazil, and especially
1637 the proximity to pig farms, this study investigated the presence of PLHV DNA in biological
1638 samples of free-living wild boars circulating in a Brazilian geographical region with a high
1639 density of commercial pig farms.

1640 **2. Materials and methods**

1641 *Sample collection*

1642 The management of wild boars in this study was performed by exotic wildlife controller
1643 agents properly authorized by the Brazilian Institute of Environment and Renewable Natural
1644 Resources (IBAMA) and registered in the Federal Technical Register of Potentially Pollutive
1645 Activity (CTF/APP). To follow all guidelines for care and use of animals, this study was
1646 submitted to the Ethics Committee on Animal Experiments of the Universidade Estadual de
1647 Londrina and approved under identification number 22831.2017.40.

1648 The lungs of 50 free-living wild boars were sampled in the Northern (6 males, 10
1649 females) and Campos Gerais (15 males, 19 females) regions of Paraná state from 2017 to 2019.
1650 After capturing, animal weight was estimated for further categorization into ages (0–20 kg,
1651 piglets/infant individuals; 21–40 kg, juvenile individuals; 41–60 kg, subadults; and > 60 kg,
1652 adults) [12]. The animals sampled in this study had weights ranging from 3 to 200 kg, the infant
1653 individuals weighed between 3 to 20 kg, juvenile individuals generally weighed 30 kg, while
1654 adults had weights ranging from 70 to 200 kg. No subadult wild boars were captured.

1655 Additionally, lung and spleen fragments were obtained from six fetuses, which were
1656 collected by hysterectomy *post mortem* from a pregnant female wild boar. The age of the fetuses
1657 was estimated according to their size in millimeters, as previously described [13]. The fetuses
1658 were approximately 150 mm in size; hence, the estimated age was approximately 65 days of
1659 gestation. Tissue fragment samples were collected and stored at –80 °C for further analysis.

1660 *DNA extraction and molecular analysis*

1661 Tissue samples were mechanically disrupted using a MagNa Lyser Instrument (Roche
1662 Diagnostics®, Mannheim, Germany), homogenized in 0.01 M phosphate-buffered saline (PBS,
1663 10% w/v) at pH 7.2, and clarified by centrifugation at 2,000 × *g* for 10 min.

1664 For nucleic acid extraction, 500 μ L of tissue suspensions were pretreated with
1665 proteinase K and subjected to a combination of phenol/chloroform/isoamyl alcohol and
1666 silica/guanidine isothiocyanate techniques [14,15]. The extracted nucleic acids were eluted in
1667 50 μ L UltraPure™ diethylpyrocarbonate (DEPC)-treated water (Invitrogen™ Life
1668 Technologies, Carlsbad, CA, USA) and stored at -80 °C. Sterile ultrapure nuclease-free water
1669 was used as a negative control for nucleic acid extraction and the following procedures.

1670 A PCR assay with consensus primers (pan-herpesviruses) for partial amplification of
1671 the herpesvirus DNA polymerase gene [16] was used to survey the presence of the PLHV
1672 genome. To classify the PLHV strains detected into species, the positively tested samples of
1673 PLHV DNA were further subjected to single-round PCR assays with specific primers for the
1674 partial amplification of the DNA polymerase genes of PLHV-1 (213-S/215-AS, 393 bp) [7,17],
1675 PLHV-2 (208-S/212-AS, 334 bp) [7,17], and PLHV-3 (886s/886as, 148 bp) [4].

1676 *Sequencing analysis*

1677 Sequencing analysis confirmed the specificity of PCR products. One amplified product
1678 for each viral species (PLHV-1, PLHV-2, and PLHV-3) was purified using the PureLink®
1679 Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit (Invitrogen® Life Technologies,
1680 Carlsbad, CA, USA). DNA was quantified using a Qubit® Fluorometer (Invitrogen® Life
1681 Technologies, Eugene, OR, USA) and subjected to nucleotide sequencing in an ABI3500
1682 Genetic Analyzer sequencer with the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied
1683 Biosystems, Foster City, CA, USA) using the same primer pairs used for the species-specific
1684 PCR.

1685 The quality of the sequences obtained was evaluated using the Phred software
1686 (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>), and consensus sequences were obtained using
1687 the CAP3 software (<http://doua.prabi.fr/software/cap3>). The similarities of the products were
1688 compared to the reference and other sequences deposited in public databases (GenBank,

1689 National Institute of Health, Bethesda, MD, USA) using BLAST software
1690 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Sequences were aligned using the CLUSTALW
1691 program (version 1.4), and the similarity percentage was obtained using BioEdit software
1692 v7.0.26. The phylogenetic tree based on nucleotide sequences was built using MEGA X
1693 software by the maximum likelihood method and p-distance model, with a bootstrap of 1,000
1694 replicates using the Akaike information criterion (AIC). For the classification of virus
1695 sequences, pairwise identity was performed using the Sequence Demarcation Tool (SDT) v1.2
1696 software using CLUSTALW.

1697 3. Results

1698 *Identification of PLHV in wild boars*

1699 Forty-eight of the 50 lung samples analyzed were positive for PLHV DNA. According
1700 to the virus species, 48 (96%), 28 (56%), and 22 (44%) samples were positive for PLHV-1,
1701 PLHV-2, and PLHV-3 DNA, respectively. PLHV-1 alone was detected in only 15 out of 48
1702 (31.25%) samples. Conversely, 33 out of 48 (68.75%) sampled lungs showed mixed detection
1703 of at least two PLHV species. The PLHV-1 and PLHV-2 combination was most frequently
1704 observed (28/48, 58.3%), while PLHV-1 and PLHV-3 were simultaneously detected in 22/48
1705 (45.8%) animals. Triple infections were detected in 17 out of 48 (35.4%) of the wild boars,
1706 including in the dam of the fetuses evaluated. However, PLHV-1, PLHV-2, and PLHV-3 DNA
1707 were not amplified from any of the fetal lung and spleen samples. Table 1 lists the details
1708 regarding the locations where the wild boar were captured, age category, PLHV DNA detection,
1709 and GenBank accession numbers from each nucleotide sequence.

1710 *Comparative nucleotide analysis*

1711 Sequencing analysis confirmed the specificity of the amplicons for the three PLHV
1712 species (PLHV-1, PLHV-2, and PLHV-3). The wild boar-derived PLHV strains were named
1713 PLHV-1/BRA-UEL/PR-WB53/2018 (GenBank accession number: MW192776), PLHV-
1714 2/BRA-UEL/PR-WB6/2017 (GenBank accession number: MW192777), and PLHV-3/BRA-
1715 UEL/PR-WBA53/2018. Comparison of the three PLHV strains detected in this study, with
1716 reference sequences of PLHVs and other gammaherpesviruses available in GenBank, showed
1717 that each strain grouped into different clades according to the nucleotide sequences
1718 representative of each viral species (PLHV-1, PLHV-2, and PLHV-3) with bootstrap values of
1719 99% and 100% (Fig. 1).

1720 The PLHV strains in the present study showed a high percentage of nucleotide similarity
1721 with several gammaherpesvirus strains (Fig. 2). Comparative analysis between the PLHV

1722 strains showed that the PLHV-1/BRA-UEL/PR-WB53/2018 strain had 100% nucleotide
1723 identity with the other three PLHV-1 sequences available in GenBank, including European
1724 PLHV strains (GenBank accession numbers: AF118399 and NC_038264) [7] and a Brazilian
1725 strain (GenBank accession number: MN873041) [9]. The PLHV-2/BRA-UEL/PR-WB6/2017
1726 strain also showed 100% nucleotide identity with the PLHV-2 reference strain (GenBank
1727 accession number: NC_038265), European strains (GenBank accession numbers: AY170314,
1728 AF118401, and AF191043), and Brazilian strains (GenBank accession number: MN873042)
1729 [4,7,17,9]. Finally, the strain PLHV-3/BRA-UEL/PR-WBA53/2018 also showed 100%
1730 nucleotide identity with European (GenBank accession numbers: AY170315 and AY170316)
1731 [4] and Brazilian (PLHV-3/BRA-UEL268/2016) [9] strains.

1732 4. Discussion

1733 The results of this study demonstrate that the three PLHV species circulate in wild boar
1734 populations in Brazil; it was found that there is a high rate of being tested positive for PLHV
1735 among animals. Previous studies have suggested that high frequencies of PLHV infections are
1736 expected in domestic and feral pigs, with values close to 95% [4,7,17]. However, no
1737 epidemiological studies on PLHV have focused on Brazilian free-living wild boars. This is the
1738 first study conducted in Brazil to investigate PLHV infections in free-living wild boars.

1739 Although the percentage of animals that were tested positive for each species of PLHV
1740 varied, PLHV-1 was consistently the most frequent viral species found, followed by PLHV-2
1741 and PLHV-3. Other studies have shown a higher percentage of domestic pigs and wild boar
1742 being tested positive for both PLHV-1 and PLHV-3 [18] or PLHV-1 and PLHV-2 [19] in
1743 domestic pigs; studies have also noted that there is a higher detection rate of PLHV-2 in feral
1744 pigs [17]. High rates of mixed infections with at least two species of PLHV have also been
1745 reported in other studies [9,17,18].

1746 Studies have shown that domestic pigs in the first weeks of life are negative for PLHV
1747 [9,20]. The two PLHV-negative wild boars in this study were infant and juvenile individuals
1748 weighing 7.5 and 30 kg, respectively. It is known that free-living animals gain less weight than
1749 farm animals because of the lack of genetic improvement and specialized diet. Thus, in nature,
1750 underweight animals may already be old enough to have been challenged by the horizontal
1751 transmission of microorganisms and develop an infection.

1752 The negative result for PLHV DNA in fetuses descending from a mother that tested
1753 positive for PLHV-1, PLHV-2, and PLHV-3, allows us to hypothesize that vertical transmission
1754 before the second third of the gestation period may not occur. In an experimental study
1755 conducted by Tucker et al. [21] involving four PLHV-positive sows, only 1 (3%) out of 33

1756 piglets derived from cesarean sections were positive for PLHV DNA in spleen tissue.
1757 Therefore, experimental studies involving a large number of animals in combination with
1758 different laboratory techniques, such as quantitative PCR, should be performed to validate the
1759 hypothesis that vertical cross-placental transmission of PLHV is infrequent, even in free-living
1760 wild boars.

1761 Sequence analysis showed that the PLHV-1, PLHV-2, and PLHV-3 species found in
1762 Brazilian free-living wild boars were 100% nucleotide identical to PLHV strains from domestic
1763 pigs from the same geographical region [9]. These results demonstrate that these viral species
1764 circulate in domestic and wild pig populations, as reported previously [17], with domestic pigs
1765 being a significant reservoir of lymphotropic herpesvirus [18]. The PLHV strains in the present
1766 study also showed a high percentage (100%) of nucleotide identity with strains from Europe
1767 [4,7]. These results corroborate those of previous studies based on comparison of the conserved
1768 region (DNA polymerase gene) of the PLHV genome [8]; furthermore, other regions of the
1769 genome can be used for in-depth virus characterization.

1770 Most of the samples (68%) were collected from a region (Campos Gerais) with a high
1771 density of commercial pigs. The presence of wild boars close to pig farms has drawn attention
1772 to the possible spread of viral agents to commercial pigs. Although PLHV species are probably
1773 non-pathogenic, they target lymphoid tissues and cells for viral replication [19]. Thus, the
1774 circulation of PLHV may represent a risk to animal health and may have a negative impact on
1775 production as it is not known whether *Macavirus* can favor infections by other pathogens or if
1776 other cofactors are necessary for pathogenic expression [19].

1777 Pig farming is an important segment of agribusiness in Brazil, which is the fourth largest
1778 pork producer in the world [22]. The country has adopted strict biosecurity standards to
1779 guarantee the health of this production chain [23]. In contrast, the expansion of free-living wild
1780 boar populations throughout the national territory is concerning. These animals can act as

1781 reservoirs for various microorganisms that can be transmitted to domestic pigs [24]. Monitoring
1782 the occurrence of any species of microorganisms in free-living wild boars is an important
1783 surveillance action that can improve biosecurity for national pig production. With regard to
1784 PLHV, it is very difficult to keep a commercial pig herd free of these viruses. The main reasons
1785 are i) the horizontal transmission [20]; ii) the capacity of PLHV to establish a state of latency
1786 in infected individuals that allows the virus to spread and infect other susceptible individuals
1787 after reactivation [3]; iii) the high rate of infected herds [9, 25]; and iv) the possibility that wild
1788 boars can also act as disseminators of PLHV.

1789 In Brazil, the rapid expansion of wild boars to non-colonized areas has accelerated
1790 translocation and introduction for hunting or meat production, and cross-breeding with free-
1791 ranging domestic pigs [26]. Thus, the fact that wild boars are free to move throughout almost
1792 the entire national territory [11] increases the possibility of contact with Brazilian commercial
1793 pig herds. This circulation can make this invader a potential source of transmission of PLHVs
1794 to commercial pig herds and influence the prevalence of infections caused by these viruses.

1795 This study supports the hypothesis that PLHV-1, -2, and -3 infections are endemic in
1796 free-living wild boars, which is similar to what has been reported in domestic pigs in Brazil.
1797 There is no evidence that natural PLHV infections in domestic and feral pigs are accompanied
1798 by clinical signs. However, monitoring the presence of PLHVs, or any other microorganisms,
1799 in wild boars has epidemiological and biosecurity importance as these animals may act as
1800 reservoirs and potential carriers of pathogens to domestic pigs.

1801 **Conflicts of Interest:** All authors have no potential conflicts of interest.

1802 **Animal Rights Statement:** identification number of Ethics approval 22831.2017.40

1803 **Acknowledgments:** The authors thank the following Brazilian Institutes for financial support:
1804 The National Council of Technological and Scientific Development (CNPq), the Brazilian

1805 Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES), the Financing of
1806 Studies and Projects (FINEP), and the Araucaria Foundation (FAP/PR). A.F.A. and A.A.A. are
1807 recipients of CNPq Fellowships. Dall Agnol, A.M. is a recipient of the INCT-Leite/CAPES
1808 fellowship (grant number 88887.495081/2020-00). G.S.P. is a recipient of the CAPES
1809 fellowship.

1810 **5. References**

- 1811 1 ICTV. Herpesviridae 2011. [https://talk.ictvonline.org/ictv-](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/dsdna-viruses-2011/w/dsdna_viruses/91/herpesviridae)
1812 [reports/ictv_9th_report/dsdna-viruses-2011/w/dsdna_viruses/91/herpesviridae](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/dsdna-viruses-2011/w/dsdna_viruses/91/herpesviridae).
1813 Accessed 2020 Dec 23.
- 1814 2. Brinkmann MM, Schulz TF. Regulation of intracellular signalling by the terminal
1815 membrane proteins of members of the Gammaherpesvirinae. *J Gen Virol*.
1816 2006;87(5):1047–74.
- 1817 3. Mettenleiter TC, Ehlers B, Müller T, Yoon K, Teifke JP. Herpesviruses. In:
1818 Zimmerman JJ, Karrike LA, Ramirez A, Schwartz K J., Stevenson GW, Zhang J,
1819 editors. *Diseases of Swine*. Eleventh, Pondicherry, India: Wiley-Blackwell; 2019, 548–
1820 75.
- 1821 4. Chmielewicz B, Goltz M, Franz T, Bauer C, Brema S, Ellerbrok H, et al. A novel
1822 porcine gammaherpesvirus. *Virology*. 2003;308 (2):317–29.
- 1823 5. Huang CA, Fuchimoto Y, Gleit ZL, Ericsson T, Griesemer A, Scheier-Dolberg R, et al.
1824 Posttransplantation lymphoproliferative disease in miniature swine after allogeneic
1825 hematopoietic cell transplantation: Similarity to human PTLN and association with a
1826 porcine gammaherpesvirus. *Blood* 2001;97(5):1467–73.
- 1827 6. Goltz M, Ericsson T, Patience C, Huang CA, Noack S, Sachs DH, et al. Sequence
1828 analysis of the genome of porcine lymphotropic herpesvirus 1 and gene expression
1829 during posttransplant lymphoproliferative disease of pigs. *Virology*. 2002;294(2):383–93.
- 1830 7. Ehlers B, Ulrich S, Goltz M. Detection of two novel porcine herpesviruses with high
1831 similarity to gammaherpesviruses. *J Gen Virol*. 1999;80(4):971–8.
- 1832 8. Ehlers B, Lowden S. Novel herpesviruses of Suidae: Indicators for a second genogroup
1833 of artiodactyl gammaherpesviruses. *J Gen Virol*. 2004;85(4):857–62.

- 1834 9. Dall Agnol AM, Leme RA, Suphoronski SA, Oliveira TES, Saporiti V, Headley SA, et
1835 al. Porcine lymphotropic herpesvirus DNA detection in multiple organs of pigs in
1836 Brazil. *Braz J Microbiol.* 2020;51(4):2145–2152.
- 1837 10. Deberdt A, Scherer S. O javali asselvajado: ocorrencia e manejo da especie no Brasil.
1838 *Nat Conserv.* 2007;5(2):31–44.
- 1839 11. Pedrosa F, Salerno R, Padilha FVB, Galetti M. Current distribution of invasive feral
1840 pigs in Brazil: Economic impacts and ecological uncertainty. *Nat Conserv.*
1841 2015;13(1):84–7.
- 1842 12. Hebeisen C, Fattebert J, Baubet E, Fischer C. Estimating wild boar (*Sus scrofa*)
1843 abundance and density using capture-resights in Canton of Geneva, Switzerland. *Eur J*
1844 *Wildl Res.* 2008;54(3):391–401.
- 1845 13. Evans HE, Sack WO. Prenatal Development of Domestic and Laboratory Mammals:
1846 Growth Curves, External Features and Selected References. *Anat Histol Embryol.*
1847 1973;2(1):11–45.
- 1848 14. Alfieri AA, Parazzi ME, Takiuchi E, Médici KC, Alfieri AF. Frequency of group A
1849 rotavirus in diarrhoeic calves in Brazilian cattle herds, 1998-2002. *Trop Anim Health*
1850 *Prod.* 2006;38(7-8):521–6.
- 1851 15. Boom R, Sol CJA, Salimans MMM, Jansen CL, Wertheim-Van Dillen PME, Van Der
1852 Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol.*
1853 1990;28(3):495–503.
- 1854 16. Vandevanter DR, Warrener P, Bennett L, Schultz ER, Coulter S, Garber RL, et al.
1855 Detection and analysis of diverse herpesviral species by consensus primer PCR. *J Clin*
1856 *Microbiol.* 1996;34(7):1666–71.
- 1857 17. Ulrich S, Goltz M, Ehlers B. Characterization of the DNA polymerase loci of the novel

- 1858 porcine lymphotropic herpesviruses 1 and 2 in domestic and feral pigs. *J Gen Virol.*
1859 1999;80(12):3199–205.
- 1860 18. McMahon KJ, Minihan D, Campion EM, Loughran ST, Allan G, McNeilly F, et al.
1861 Infection of pigs in Ireland with lymphotropic γ -herpesviruses and relationship to
1862 postweaning multisystemic wasting syndrome. *Vet Microbiol.* 2006;116(1-3):60–68.
- 1863 19. Franzo G, Drigo M, Legnardi M, Grassi L, Menandro ML, Cecchinato M, et al.
1864 Porcine Gammaherpesviruses in Italian Commercial Swine Population: Frequent but
1865 Harmless. *Pathogens* 2021;10(47):0–5.
- 1866 20. Brema S, Lindner I, Goltz M, Ehlers B. Development of a recombinant antigen-based
1867 ELISA for the sero-detection of porcine lymphotropic herpesviruses.pdf. vol. 15, p.
1868 357–364, 2008.
- 1869 21. Tucker AW, McNeilly F, Meehan B, Galbraith D, McArdle PD, Allan G, et al.
1870 Methods for the exclusion of circoviruses and gammaherpesviruses from pigs.
1871 *Xenotransplantation* 2003;10(4):343–8.
- 1872 22. Embrapa. Maiores produtores mundiais de carne suína. Central de Inteligência de Aves
1873 e Suínos 2020. <https://www.embrapa.br/suinos-e-aves/cias/estatisticas/suinos/mundo>.
1874 Accessed 2020 Dec 18.
- 1875 23. ABPA. Brazilian Association of Animal Protein. Annual report 2020. 2020.
- 1876 24. Meng XJ, Lindsay DS. Wild boars as sources for infectious diseases in livestock and
1877 humans. *Phil Trans R Soc B.* 2009;364(1530):2697–707.
- 1878 25. Meng XJ. Emerging and Re-emerging Swine Viruses. *Transbound Emerg Dis.*
1879 2012;59(1):85–102.
- 1880 26. Rosa CA Da, Wallau MO, Pedrosa F. Hunting as the main technique used to control

1881 wild pigs in Brazil. *Wildl Soc Bull.* 2018;42(1):111–8.

1882 **Table 1:** Porcine lymphotropic herpesvirus (PLHV-1, PLHV-2, and PLHV-3) DNA detection
 1883 in 50 wild boars from the northern and the Campos Gerais regions of the state of Paraná, Brazil.

| Wild boar | Origin | Age category | PLHV-1 | PLHV-2 | PLHV-3 |
|-----------------|---------------|--------------|--------|--------|--------|
| A1 | Campos Gerais | Adult | + | + | - |
| A2 | Campos Gerais | Adult | + | - | - |
| A3 | Campos Gerais | Infant | + | + | - |
| A4 | Campos Gerais | Infant | + | - | - |
| A5 | Campos Gerais | Juvenile | + | - | - |
| A6 ^a | Campos Gerais | Infant | + | + | - |
| A7 | Campos Gerais | Infant | + | - | - |
| A8 | Campos Gerais | Infant | + | + | - |
| A9 | Campos Gerais | Infant | + | - | - |
| A10 | Campos Gerais | Infant | + | + | + |
| A12 | Campos Gerais | Adult | + | - | - |
| A13 | Campos Gerais | Adult | + | + | - |
| A14 | Campos Gerais | Adult | + | - | + |
| A15 | Campos Gerais | Juvenile | + | + | - |
| A16 | Campos Gerais | Adult | + | - | - |
| A17 | Campos Gerais | Juvenile | - | - | - |
| A18 | Campos Gerais | Juvenile | + | + | - |
| A19 | Campos Gerais | Adult | + | - | - |
| A20 | Campos Gerais | Juvenile | + | + | - |
| A21 | Campos Gerais | Juvenile | + | + | + |
| A22 | Campos Gerais | Juvenile | + | + | + |
| A23 | Campos Gerais | Adult | + | + | + |

| | | | | | |
|-----|---------------|----------|---|---|---|
| A24 | Campos Gerais | Adult | + | + | + |
| A25 | Campos Gerais | Adult | + | + | + |
| A26 | Campos Gerais | Juvenile | + | + | - |
| A27 | Campos Gerais | Juvenile | + | + | + |
| A28 | Campos Gerais | Adult | + | + | + |
| A29 | Campos Gerais | Adult | + | + | + |
| A30 | Campos Gerais | Juvenile | + | + | + |
| A33 | Campos Gerais | Infant | + | + | + |
| A34 | Campos Gerais | Adult | + | + | + |
| A35 | Campos Gerais | Adult | + | + | - |
| A36 | Campos Gerais | Adult | + | + | - |
| A37 | Campos Gerais | Adult | + | - | - |
| A40 | Northern | Infant | + | - | + |
| A41 | Northern | Infant | + | - | + |
| A42 | Northern | Infant | + | - | - |
| A43 | Northern | Infant | - | - | - |
| A44 | Northern | Infant | + | - | - |
| A45 | Northern | Infant | + | - | - |
| A46 | Northern | Infant | + | - | - |
| A47 | Northern | Adult | + | + | + |
| A48 | Northern | Adult | + | - | + |
| A49 | Northern | Adult | + | + | + |
| A50 | Northern | Adult | + | - | - |
| A51 | Northern | Infant | + | - | - |
| A52 | Northern | Infant | + | + | + |

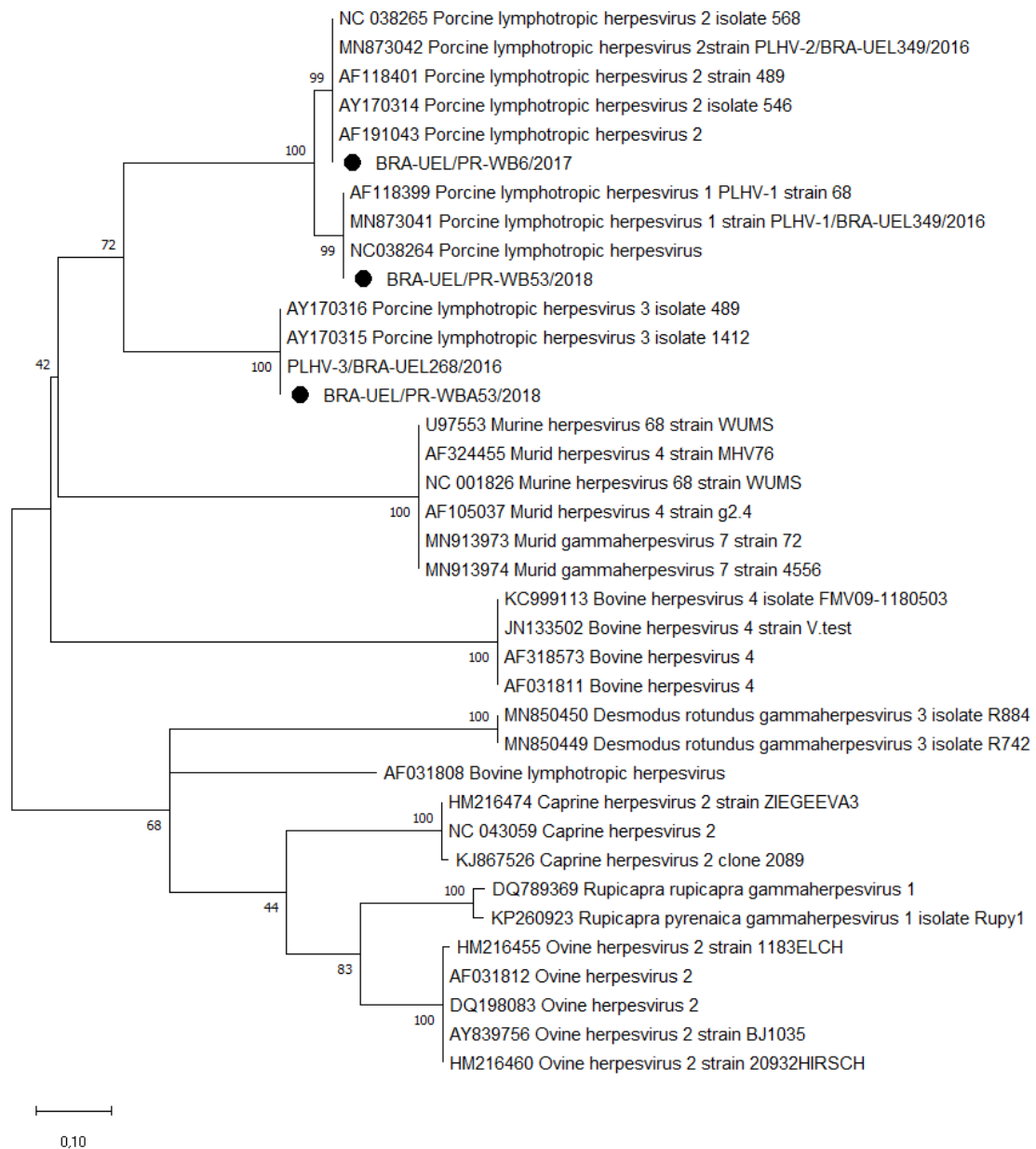
| | | | | | |
|---------------------|----------|----------|----|----|----|
| A53 ^{b, c} | Northern | Infant | + | + | + |
| A54 | Northern | Infant | + | + | + |
| A55 | Northern | Juvenile | + | - | + |
| Total | | | 48 | 28 | 22 |

1884 (+) presence; (-) absence.

1885 Name of sequences and GenBank accession numbers: ^aPLHV-2/BRA-UEL/PR-WB6/2017

1886 (MW192777); ^bPLHV-1/BRA-UEL/PR-WB53/2018 (MW192776); ^cPLHV-3/BRA-UEL/PR-

1887 WBA53/2018

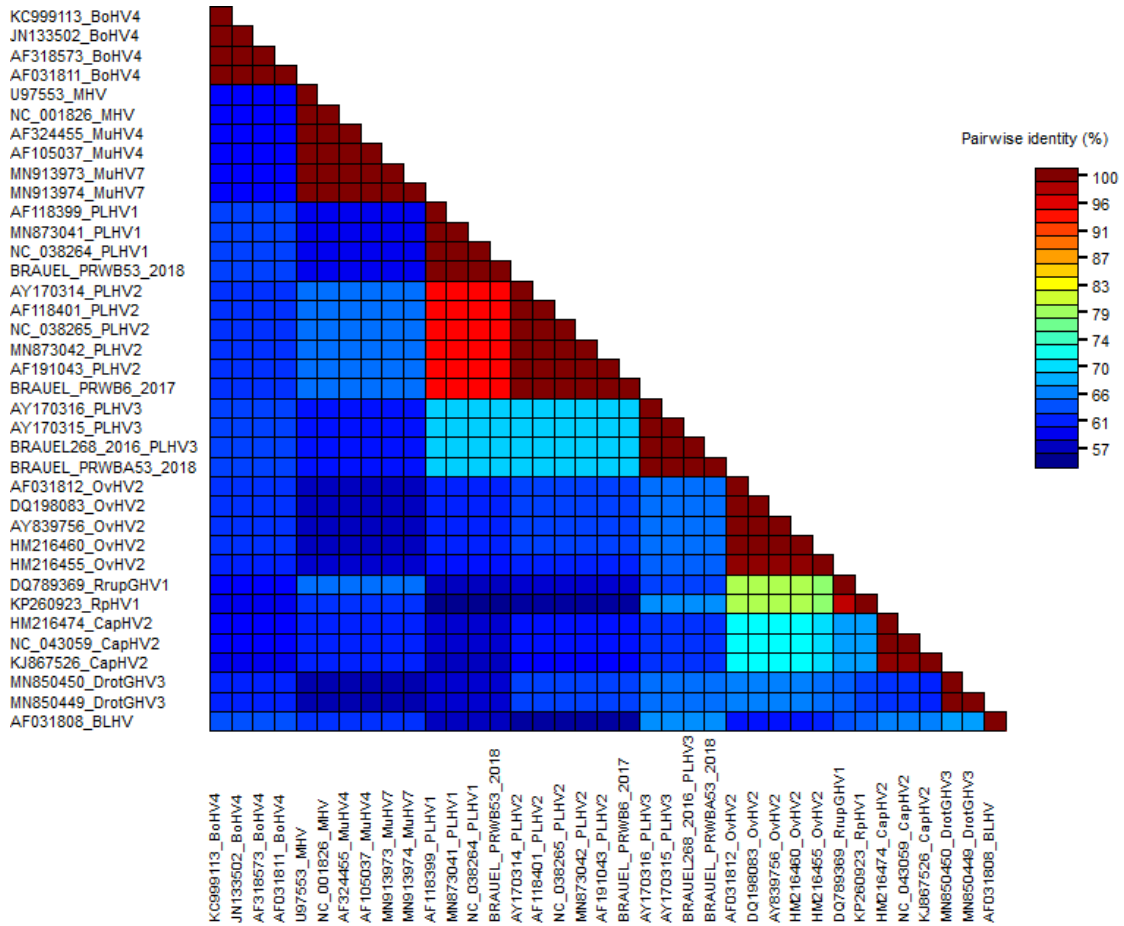


1888

1889 **Fig. 1.** Molecular phylogenetic analysis by Maximum Likelihood method. The phylogenetic
 1890 tree with 37 strains of gammaherpesviruses is based on a 104 nucleotide fragment of the DNA
 1891 polymerase gene of each strain. Three PLHV strains are from Brazilian wild boar sampled in
 1892 this study and are highlighted with a black-filled circle in the tree (PLHV-1/BRA-Uel/PR-
 1893 WB53/2018, GenBank accession number MW192777); (PLHV-2/BRA-Uel/PR-WB6/2017,
 1894 GenBank accession number MW192777); (PLHV-3/BRA-Uel/PR-WBA53/2018). The tree
 1895 was constructed using the Maximum Likelihood method and Hasegawa-Kishino-Yano model

1896 with gamma correction (I) using the Akaike information criterion (AIC). Bootstrap values were
1897 determined for 1,000 replicates. Bootstrap values >40 are indicated at the internal nodes.

1898



1899 **Fig. 2.** SDT matrix of pairwise identity scores generated by alignment of a 104 nucleotide
 1900 fragment of the DNA polymerase gene of 37 gammaherpesvirus strains. In this color-coded
 1901 distance matrix, the colored cell represents the identity between two nucleotide sequences.
 1902 Sequences were aligned by the CLUSTALW program with Sequence Demarcation Tool v1.2.

1903 7 CONCLUSÕES

- 1904 ➤ BVDV-1 e PLHV-1, PLHV-2 e PLHV-3 circulam em javalis de
1905 vida livre provenientes do estado do Paraná.
- 1906 ➤ Nos javalis de vida livre da região norte do estado do Paraná
1907 estão circulando os subgenotipos 1a e 1d do vírus BVDV-1,
1908 ambos endêmicos em rebanhos bovinos brasileiros.
- 1909 ➤ Infecção por PLHV-1 em javalis de vida livre do estado do
1910 Paraná é predominante e, animais positivos para este vírus
1911 apresentaram alta taxa de infecção mista, envolvendo duas ou
1912 três espécies de PLHV.
- 1913 ➤ Não houve transmissão vertical de PLHV-1, PLHV-2 e PLHV-3
1914 em fetos provenientes de uma mãe positiva para as respectivas
1915 espécies virais até o segundo terço de gestação.
- 1916 ➤ Os dados deste estudo permitirão que agentes que atuam em
1917 programas sanitários para o controle e profilaxia de infecções
1918 virais em suínos, como BVDV, CSFV, PLHV, entre outras,
1919 levem em consideração a circulação de BVDV e PLHV em
1920 javalis de vida livre. Além disso, servirão de apoio e incentivo
1921 na implementação de medidas de controle de javalis no Brasil

1922 8 PERSPECTIVAS

- 1923
- 1924
- 1925
- 1926
- 1927
- 1928
- 1929
- 1930
- 1931
- 1932
- 1933
- 1934
- 1935
- 1936
- 1937
- 1938
- 1939
- 1940
- 1941
- 1942
- 1943
- 1944
- 1945
- 1946
- 1947
- Estudos populacionais de javalis devem ser realizados em todos os biomas e ecossistemas brasileiros, tais como o monitoramento do *status* sanitário e a ecologia desses animais (dinâmica populacional, área de vida, velocidade de invasão, etc.). Esse monitoramento direciona a criação de medidas de controle que são estratégicas para cada situação de invasão.
 - Estudos epidemiológicos de BVDV, envolvendo o javali como hospedeiro e potencial fonte de disseminação do vírus, devem ser realizados.
 - Monitoramento de BVDV em rebanhos bovinos e suínos domésticos que apresentam possibilidade de contato com javalis de vida livre a fim de compreender o papel desses animais na disseminação de BVDV para os rebanhos.
 - Avaliação do impacto da circulação de BVDV em javalis de vida livre nos programas de vacinação para o controle e profilaxia desta importante infecção viral em rebanhos bovinos.
 - Estudos mais aprofundados dos possíveis impactos que a circulação de BVDV em javalis de vida livre podem causar em programas de monitoramento da CSFV em rebanhos suínos e em javalis de vida livre.
 - Pesquisas que envolvam a avaliação do espectro clínico da presença de BVDV e PLHV em javalis de vida livre, tais como: avaliação sorológicas e investigações microscópicas e macroscópicas dos possíveis efeitos da presença desses vírus em vários órgãos e sistemas.

1948

APÉNDICES

APÊNDICE A

1949
1950

1951

Sequências genômicas: BVDV e PLHV

1952 >MT437382.1 Bovine viral diarrhea virus 1 strain BRA-Uel/PR-A45/2017 5' UTR
1953 TGCCCATAGTAGGACTAGCATAAAGAGGGGGTAGCAGCAGTGGTGAGTTCGTTGGATGGCTTAAGCCCT
1954 GAGTACAGGGTAGTCGTCAGTGGTTCGACGCCTTGGAAATAAAGGTCTCGAGATGCCACGTGGACGAGGGC
1955 ATGCCCAAAGCACATCTTAACCTGAGCGGGGGTCGCCCAGGTAAAAGCAGTTCTAACCGACTGTTACGGA
1956 TACAGCCTGATAGGGTGTGTCAGAGGCCACTGTTCTGCTACTAAAAATCTCTGCTGTACATGGCAC

1957 >MT437383.1 Bovine viral diarrhea virus 1 strain BRA-Uel/PR-A51/2018 5' UTR
1958 ATGCCCTTAGTAGGACTAGCAAAATGAGAGGGGTACCACCAGTGGTGAGTTCATTGGATGGCTGAAGCCC
1959 TGAGTACAGGGTAGTCGTCAGTGGTTCGACACCTCGGAAAGAAGGTCTCGAGATGCCACGTGGACGAGGG
1960 CATGCCACAGCACATCTTAACCTGGACGGGGGTGCCCAGGTAAAAGCAGTTTAACTAACTGTTATGGA
1961 CACAGCCTGATAGGGTGTGTCAGAGGCCACTGCATTGCTACTAAAAATCTCTGCTGTACATGGCC

1962 >MT437384.1 Bovine viral diarrhea virus 1 strain BRA-Uel/PR-A53/2018 5' UTR
1963 ATGCCCATAGTAGGACTAGCAAAATGAGAGGGGTAGCAACAGTGGTGAGTTCATTGGATGGCTGAAGCCC
1964 TGAGTACAGGGTAGTCGTCAGTGGTTCGACACCTCGGAAAGAAGGTCTCGAGATGCCACGTGGACGAGGG
1965 CATGCCACAGCACATCTTAACCTGGACGGGGGTGCCCAGGTAAAAGCAGTTTAACTAACTGTTATGGA
1966 CACAGCCTGATAGGGTGTGTCAGAGGCCACTGCATTGCTACTAAAAATCTCTGCTGTACATGGCAC

1967 > MW192776_PLHV-1/BRA-Uel/PR-WB53/2018/Dpol
1968 TCCATCATGAAGACCTGCATAAAATATCCTCAATTAAAGGAGGAGGATTATGAAACATTTTTGATTAGTT
1969 CTGGTCTGTCACTTTGTAAAAAACATATATCAGAATCTCTTCTGTCTAACCTGCTTACAACATGGC
1970 TGGCTAAGAGAAAAATGATCAGAAAGGAATTAGCAGCATGTGCTGACCCAAAGCTCAGGACAATTTTAG
1971 ATAAACAGCAGCTTGCAATTAAGGTGACATGCAATGCTGTGTATGGGTTCACTGGTGTGTCATCTGGTA
1972 TGCTGCCCTGTCTCAAGATTGCAGAGACCATAACTATGCAAGGAAGGGCCATGTTGGAAAAGACAAAAG
1973 TATTTGTAGAGAATTTAAGTCATGAGGATCTCCATTCCATCTGTAAGG

1974 > MW192777_PLHV-2/BRA-Uel/PR-WB6/2017/Dpol
1975 CTCTTCTGTGAACTTGCTCACAAACATGGCTGGCCAAGAGAAAAATGATCAGAAAGGAATTGACAGCAT
1976 GTGCTGATCCAAAGCTCAGGACAATTTTAGATAAACAGCAGCTTGCAATTAAGGTGACATGCAATGCTG
1977 TGTATGGATTCACTGGTGTGTCATCTGGTATGCTGCCATGTCTCAAGATTGCAGAGACCATCACTATGC
1978 AAGGAAGGGCCATGTTGGAAAAGACAAAAGTATTTGTAGAGAATCTGAGTCATGAAGATCTCCGTTCCA
1979 TATGTAAGGTTGGCTCTATACCTCAGTCATCAAACGTGTTTGATAAACCCCTTCAAGG

1980 >BRA-Uel/PR-WBA53/2018
1981 CAAGATTGCTGAGACGGTGACTACTCAAGGAAGAGCAATGCTGGAAAAACAAAGATATTTGTGGA
1982 AAACCTGAACCATAACAATGCTTCAAGCCATTTGCTATCCCCTAGATATTCTCTGTTACCTAAGAT
1983 GTAACCATGCCAT

1984

1985

ANEXOS

1986

1987

ANEXO

1988
1989

Aprovação do comitê de ética



Universidade
Estadual de Londrina

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA N° 144/2017

Londrina, 12 de dezembro de 2017.

Prezado (a) professor (a)

Certificamos que o projeto intitulado: "**Perfil sanitário de Javalis (*Sus scrofa*) de vida livre no Estado do Paraná.**" protocolo CEUA n°22831.2017.40 sob a responsabilidade de **Alice Fernandes Alfieri**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n° 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n° 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL), em reunião realizada em **28/11/2017**

O objetivo do projeto é avaliar os processos de invasão da espécie não nativa *Sus Scrofa* e seus morfotipos com relação ao hibridismo e aos agentes etiológicos virias, bacterianos, parasitários e protozoários, especialmente aqueles potencialmente zoonóticos, no estado do Paraná, Brasil. Grau de invasividade=4

| | |
|----------------------------|---|
| Vigência do Projeto | Dezembro/2017 a Fevereiro/2021 |
| Espécie/linhagem | Sulno / Asselvajado |
| N° de animais | 960 |
| Peso/Idade | N.D / N.D |
| Sexo | Machos e Fêmeas |
| Origem | Áreas de manejo de espécie exótica invasora <i>Sus scrofa</i> . |
| Amostras a serem coletadas | Sangue, plasma, soro, fezes, urina, swabs oral, nasal e urogenital e fragmentos de tecido musculares ou órgãos Ectoparasitas. |

Cumpra orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UEL anteriormente à execução das modificações.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessária. Sem mais para o momento, subscrevo, cordialmente.

Profa. Dra. Glaura Scantamburlo Alves Fernandes
Coordenadora da CEUA/UEL

ANEXO B

1990
1991

1992

Protocolos de técnicas

1993

1994

1. Reagentes e soluções

1995

1996

➤ Lista de reagentes

1997

1998

1. 100 mM dNTP Set, 4 x 250 µL; 25 µmol cada (100 mM dATP *Solution*, 100 mM dCTP *Solution*, 100 mM dGTP *Solution*, 100 mM dTTP *Solution*) (*Invitrogen™ Life Technologies, EUA*)

1999

2000

2001

2. 10 x PCR-Buffer (200 mM Tris-HCl, pH 8,4, 500 mM KCl) (*Invitrogen™ Life Technologies, EUA*)

2002

2003

3. 123 bp DNA Ladder (*Invitrogen™ Life Technologies, EUA*)

2004

4. 2-Mercaptoetanol (C₂H₆O₅) P.M. 78,13 (Fluka®)

2005

5. Acetona P.A. (CH₃COCH₃) P.M. 58,08 (Dinâmica®)

2006

6. Ácido acético glacial P.A. (CH₃COOH) P.M. 60,05 (Nuclear®)

2007

7. Ácido bórico (H₃BO₃) P.M. 61,83 (Sicalab®)

2008

8. Ácido clorídrico (HCl) P.M. 36,46 (Reagen®)

2009

9. Ácido etilenodiaminotetraácido sal di-sódico - EDTA P.A. (C₁₀H₁₄N₂O₈Na₂.2H₂O) P.M. 372,24 (Reagen®)

2010

2011

10. Agarose (Gibco BRL®)

2012

11. Álcool etílico absoluto (C₂H₂OH) P.M. 46,07 (Nuclear®)

2013

12. Álcool isoamílico ((CH₃)₂CHCH₂CH₂OH) P.M. 88,15 (Synth®)

2014

13. Azul de bromofenol (Sigma®)

2015

14. Cloreto de potássio P.A. (KCl) P.M. 74,56 (Reagen®)

2016

15. Cloreto de sódio P.A. (NaCl) P.M. 58,45 (Reagen®)

2017

16. Clorofórmio P.A. (CHCl₃) P.M. 119,38 (Dinâmica®)

2018

17. Dodecil sulfato de sódio - Lauril sulfato de sódio - SDS (C₁₂H₂₅NaO₄S) P.M. 288,38 (BDH)

2019

2020

18. Brometo de etídeo (C₂₁H₂₀N₃Br) P.M. 394,3 (Sigma®)

2021

19. Guanidine isothiocyanate P.M. 118,16 (Gibco BRL®)

2022

20. Hidróxido de sódio P.A. (NaOH) P.M. 40,00 (Mallinckrodt Chemicals®)

2023

- 2024 21. Hidroximetil amino metano - TRIS 99% P.M. 121,14 (Merck)
2025 22. Metanol, P.A. (CH₃OH) P.M. 32,04 (Alkimia®)
2026 23. *Platinum Taq DNA Polymerase 500 units*
2027 24. M-MLV (*Moloney murine leukemia virus*) *Reverse Transcriptase*
2028 (RT) 200 units (*Invitrogen™ Life Technologies, EUA*)
2029 25. *Silicon dioxide* (SiO₂) P.M. 60,08 (Sigma®)

2030 ➤ Soluções e Tampões

2031

2032 **A) Hidratação da sílica**

- 2033 - 6 g de sílica (O₂Si)
2034 - Adicionar 50 mL de água bidestilada
2035 - Agitar lentamente e manter em repouso durante 24 h
2036 - Por sucção, desprezar 44 mL do sobrenadante
2037 - Ressuspender a sílica em 50 mL de água bidestilada
2038 - Manter em repouso durante 5 h para sedimentar
2039 - Desprezar 44 mL do sobrenadante
2040 - Adicionar 100 µL de HCl fumegante para ajustar o pH 2,0. - Aliquotar

2041 **B) Solução L6**

- 2042 - 120 g de isotiocianato de guanidina (GUSCN)
2043 - 100 mL de TRIS-HCl 0,1 M pH 6,4
2044 - 22 mL de EDTA 0,2 M pH 8,0
2045 - 2,6 mL de Triton x-100

2046 **C) Solução L2**

- 2047 - 120 g de isotiocianato de guanidina (GUSCN)
2048 - 100 mL de TRIS-HCl 0,1 M pH 6,4

2049 **D) Tampão de amostra para eletroforese em gel de agarose**

- 2050 - 0,25 g de azul de bromofenol (0,25%)
2051 - 45 g de sacarose - sucrose (C₁₂H₂₂O₁₁) (45%)
2052 - Água bidestilada q.s.p. 100 mL 75

2053 **E) Tampão de corrida: TBE (TRIS - Ácido bórico - EDTA) 10 x []**

- 2054 - 107,78 g de TRIS (0,89 M)

- 2055 - 55,03 g de ácido bórico (0,89 M)
- 2056 - 7,45 g de EDTA (0,02 M)
- 2057 - Água bidestilada quantidade suficiente para 1 L
- 2058 **F) Fenol/clorofórmio-álcool isoamílico**
- 2059 - 25 mL de fenol saturado
- 2060 - 24 mL de clorofórmio
- 2061 - 1 mL de álcool isoamílico
- 2062 **G) SDS 10%**
- 2063 - 5 g de dodecil sulfato de sódio
- 2064 - Lauril sulfato de sódio - SDS (C₁₂H₂₅NaO₄S)
- 2065 - Água bidestilada q.s.p. 50 mL
- 2066 **H) Diluição de dNTP**
- 2067 - Solução estoque - concentração 100 mM
- 2068 - Solução uso - concentração 10 mM - 10 µL da solução estoque + 90
- 2069 µL de água ultrapura
- 2070 **I) Tampão fosfato salina (PBS)**
- 2071 137 mM de cloreto de sódio (NaCl)
- 2072 3 mM de cloreto de potássio (KCL)
- 2073 8 mM de fosfato de sódio dibásico anidro (Na₂HPO₄)
- 2074 15 mM de fosfato de potássio monobásico anidro (K₂H₂PO₄) Água
- 2075 ultrapura autoclavada q.s.p 1 L
- 2076 -pH 7,2
- 2077 **J) Oligonucleotídeos**
- 2078 324 sense -5'(atgccwtagtaggactagca 3'; onde W=A ou T, nt 108-128)
- 2079 (Invitrogen Life Technologies®)
- 2080 326 anti-sense -5'(tca act ccatgtgccatgtca 3'; onde W=A ou T, nt 375--
- 2081 395) (Invitrogen Life Technologies®) 76
- 2082 **K) Preparação dos oligonucleotídeos**
- 2083 Eluição do primer liofilizado para concentração final de 200 pmol

2084 (primer mãe)

2085 **Concentração em nm x1000 = volume em µL de água ultrapura a**
 2086 **ser acondicionada**

2087 **200 pmol**

2088 Diluição do primer mãe para concentração final de 20 pmol (primer
 2089 uso)

2090 $C_i \times V_i = C_f \times V_f$

2091 *primer sense*: **41,26 nm X 1000 = 206,3 µL** (primer mãe a 200 pmol)

2092 **200 pmol**

2093 $200 \times V_i = 20 \times 100$

2094 $V_i = 10 \mu\text{L}$

2095 Diluir 10 µL de primer mãe em 90 µL de água ultrapura para o uso

2096 *primer anti-sense*: **40,96 nm X 1000 = 204,8 µL** (primer mãe a 200 pmol)

2097 **200 pmol**

2098 $200 \times V_i = 20 \times 100$

2099 $V_i = 10 \mu\text{L}$

2100 Diluir 10 µL de primer mãe em 90 µL de água ultrapura para o uso

2101 2. Técnica de virusneutralização (protocolo adaptado de OIE, 2019)

2102 1) Os soros de teste foram inativados por 30 min a 56 °C.

2103 2) A partir de uma diluição inicial de 1:10 foi realizada a diluição
 2104 seriada na base 2 dos soros teste a até a diluição final de 1:640 em
 2105 meio de cultura D-MEM. O teste foi realizado em placas de 96
 2106 cavidades de fundo plano. Com volume final de 50 µL.

2107 3) Foram adicionados 50 µL de uma solução de vírus contendo 102
 2108 doses infecciosas 50% para cultura de tecidos (TCID50) do protótipo
 2109 BVDV-1a (cepa Singer) em cada cavidade da placa contendo soro
 2110 diluído.

2111 4) A placa foi incubada durante 1 h a 37 °C.

2112 5) Após incubação, 50 µL de uma solução de células Madin-Darby
2113 Bovine Kidney (MDBK) à uma concentração de 3×10^5 células/ mL
2114 foram adicionados a todas as cavidades da placa de microtitulação.

2115 6) A placa foi incubada a 37 °C por 96 horas, em uma atmosfera de
2116 5% de CO₂. Após a incubação, as placas foram examinadas em
2117 microscópio invertido quanto a presença de efeito citopático em cada
2118 uma das diluições de soro incluídas no teste. Para cada amostra de
2119 soro, uma cavidade é deixada sem vírus para monitorar a evidência
2120 de toxicidade da amostra de soro sobre a camada de células. Os
2121 soros controle positivo e negativo também deve ser incluído.

2122 7) O título neutralizante é considerado o recíproco da maior diluição
2123 de soro capaz de neutralizar a replicação do vírus. Amostras de soro
2124 com atividade neutralizante em diluição final $\geq 1:10$ foram
2125 consideradas positivas.

2126 3. Extração bruta e extração do ácido nucléico. Associação das técnicas
2127 fenol/clorofórmio/álcool isoamílico e sílica/isotiocianato de guanidina

- 2128 1. 1,5 g do fragmento de órgão macerado
- 2129 2. Adicionar 1000 µL de PBS
- 2130 3. Centrifugar a 3000 x g/10 min
- 2131 4. Coletar 250 µL da suspensão do fragmento de órgão
- 2132 5. Adicionar 50 µL de SDS 10 % e 10 µL de tampão de lise (Proteinase
2133 K) ao sobrenadante coletado
- 2134 6. Homogeneizar em vórtex
- 2135 7. Banho-maria 56 °C / 30 min
- 2136 8. Centrifugar 10.000 x g / 30 s
- 2137 9. Adicionar 500 µL da solução L6
- 2138 10. Adicionar 25 µL de sílica hidratada
- 2139 11. Homogeneizar em vórtex
- 2140 12. Agitar em temperatura ambiente / 30 min
- 2141 13. Centrifugar 10.000 x g / 30 s
- 2142 14. Desprezar o sobrenadante em solução contendo NaOH 10 M

- 2143 15. Adicionar 500 μ L de solução L2
- 2144 16. Homogeneizar em vórtex
- 2145 17. Centrifugar 10.000 x g / 30 s
- 2146 18. Desprezar o sobrenadante em solução contendo NaOH 10 M
- 2147 19. Adicionar 500 μ L de solução L2
- 2148 20. Homogeneizar em vórtex
- 2149 21. Centrifugar 10.000 x g / 30 s
- 2150 22. Desprezar o sobrenadante em solução contendo NaOH 10 M
- 2151 23. Adicionar 1000 μ L de etanol 70% gelado
- 2152 24. Homogeneizar em vórtex
- 2153 25. Centrifugar 10.000 x g / 30 s
- 2154 26. Desprezar sobrenadante em descarte comum
- 2155 27. Adicionar 1000 μ L de etanol 70% gelado
- 2156 28. Homogeneizar em vórtex
- 2157 29. Centrifugar 10.000 x g / 30 s
- 2158 30. Desprezar sobrenadante em descarte comum
- 2159 31. Adicionar 1000 μ L de acetona P.A. gelada
- 2160 32. Homogeneizar em vórtex
- 2161 33. Centrifugar 10.000 x g / 30 s
- 2162 34. Desprezar sobrenadante em descarte comum
- 2163 35. Secar o pellet em termo bloco à 60°C (aproximadamente 2 min)
- 2164 36. Adicionar 50 μ L de água DEPC
- 2165 37. Homogeneizar em vórtex
- 2166 38. Banho-maria 56°C / 15 min
- 2167 39. Homogeneizar em vórtex
- 2168 40. Centrifugar 13.000 x g / 4 min
- 2169 41. Recolher o sobrenadante em microtubo de 500 μ L
- 2170 42. Estocar à 4°C ou - 20°C até a utilização.

2171 4. Técnicas moleculares: RT-PCR e PCR2172 ➤ **RT - PCR BVDV**2173 **Tabela1:** Reagentes do Mix e protocolo da RT-PCR

| Reagentes do Mix | Desnaturação | RT | PCR |
|-----------------------------|--------------|--------|---------|
| Água (DEPEC) | 2,5 µL | 0,7 µL | 34,0 µL |
| <i>Primer Forward</i> (324) | | | 1,0 µL |
| <i>Primer Reverse</i> (326) | 0,5 µL | | 1,0 µL |
| <i>Buffer 5X</i> | | 4,0 µL | |
| <i>Buffer 10X</i> | | | 5,0 µL |
| <i>Dithiothreitol</i> (DTT) | | 2,0 µL | |
| MgCl ₂ | | | 1,5 µL |
| DNTP | | 1 µL | 2,0 µL |
| M-MLV | | 0,3 µL | |
| Taq | | | 0,5 µL |
| Amostra (RNA) | 9,0 µL | | |
| cDNA | | | 5,0 µL |
| Total | 12 µL | 8,0 µL | 50,0 µL |

2174 ➤ Programas

2175 DESNATURAÇÃO

2176 70 °C / 10 min

2177 TRANSCRIÇÃO REVERSA

2178 37 °C /50 min

2179 70 °C /15 min

2180 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

| Reação | Temperatura (°C) | Tempo | Nº de Ciclos |
|----------------------|------------------|-------|--------------|
| Desnaturação inicial | 94 | 3 min | 1 |
| Desnaturação | 94 | 45 s | |
| Anelamento | 56 | 30 s | 35 ciclos |
| Extensão | 72 | 30 s | |
| Extensão final | 72 | 7 min | 1 |

2181

2182 ➤ PCR – PLHV

2183 **Tabela1:** Protocolo da PCR consensual

| Reagentes do Mix | PCR consensual | PCR específica |
|-----------------------|----------------|----------------|
| Água (DEPEC) | 31,0 µL | 33,0 µL |
| <i>Primer DFA</i> | 1,0 µL | |
| <i>Primer ILK</i> | 1,0 µL | |
| <i>Primer TGV</i> | 1,0 µL | |
| <i>Primer Foward</i> | | 1,0 µL |
| <i>Primer Reverse</i> | | 1,0 µL |
| Buffer 10X | 5,0 µL | 5,0 µL |
| MgCl ₂ | 1,5 µL | 1,5 µL |
| DNTP | 4,0 µL | 3,0 µL |
| Taq | 0,5 µL | 0,5 µL |
| Amostra (DNA) | 5,0 µL | 5,0 µL |
| Total | 50,0 µL | 45,0 µL |

2184 ➤ Programas

2185 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

| Reação | Temperatura (°C) | Tempo | Nº de Ciclos |
|----------------------|------------------|-------|--------------|
| Desnaturação inicial | 94 | 3 min | 1 |
| Desnaturação | 94 | 30 s | |
| Anelamento | 46 | 45 s | 30 ciclos |
| Extensão | 72 | 1 min | |
| Extensão final | 72 | 7 min | 1 |

2186 ➤ Eletroforese em gel de agarose 2%

2187 1. 1 g de agarose

2188 2. 50 mL *TEB buffer* (Tris 89 mM; ácido bórico 89 mM; EDTA 2 mM) pH
2189 8,4

2190 3. 25 µL de brometo de etídeo (0,5 µg / mL)

2191 4. São utilizados 8 µL do *amplicon* e 2 µL do tampão de amostra, onde a
2192 eletroforese sob voltagem (100 V) e amperagem (80 A) constantes,

2227 *Technologies, EUA)*

2228 9. Multiplicar pelo fator de diluição para determinar a concentração correta
2229 da amostra.

2230

2231 5. Sequenciamento: método Sanger

2232 ➤ Preparo de amostras

2233 As amostras e os *primers* devem estar na concentração demonstrada na
2234 tabela a seguir:

| Tamanho do fragmento (pares de base) | Concentração da amostra (ng/μL ou μg/mL) | Concentração do <i>primer</i> (pmol/μL ou μM) |
|---|---|--|
| < 300 | 2 | 5 |
| 300 – 700 | 4 | 5 |
| >700 | 10 | 10 |

2235 ➤ Mix do sequenciamento

| Reagente* | Volume |
|-------------------------------|--------|
| <i>BigDye Terminator v3.1</i> | 2,0 μL |
| Tampão 5x | 1,5 μL |
| Água ultrapura autoclavada | 0,5 μL |
| Volume final | 4,0 μL |

**BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*

2236

2237 O volume final de mix do sequenciamento é adicionado a 5 μL de amostra
2238 purificada + 1 μL de *primer*.

2239

2240

2241

2242 ➤ Ciclos de tempo e temperatura da reação de sequenciamento*

| Reação | Temperatura (°C) | Tempo | Nº de ciclos |
|----------------------|------------------|--------|--------------|
| Desnaturação inicial | 96 | 1 min | 1 |
| Desnaturação | 96 | 15 seg | 35 |
| Anelamento | 50 | 15 seg | 35 |
| Extensão | 60 | 4 min | 35 |

*Programa recomendado pela *Applied Biosystems*.

2243 ➤ Precipitação com EDTA e Etanol

- 2244 1. Adicionar 10 µL da reação de sequenciamento em uma cavidade da placa
2245 *MicroAmp® Optical 96-Well Reaction* (0,2 mL) (*Applied Biosystems*).
- 2246 2. Adicionar 2,5 µL de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) 125 mM pH
2247 8,0.
- 2248 3. Adicionar 30 µL de etanol 100%.
- 2249 4. Homogeneizar lentamente a placa.
- 2250 5. Incubar a placa por 10 min em temperatura ambiente.
- 2251 6. Centrifugar a 2720 x g durante 30 min a 20 °C.
- 2252 7. Desprezar o conteúdo da placa.
- 2253 8. Centrifugar a 2720 x g durante 1 min a 20 °C com a placa invertida sobre
2254 papel.
- 2255 9. Adicionar 100 µL de etanol 70%.
- 2256 10. Centrifugar a 2720 x g durante 1 min a 20 °C.
- 2257 11. Desprezar o conteúdo da placa.
- 2258 12. Centrifugar a 2720 x g durante 1 min a 20 °C com a placa invertida sobre
2259 papel.
- 2260 13. Cobrir a placa com papel e deixar em temperatura ambiente por 10 min.
- 2261 14. Adicionar 10 µL de formamida (HIDI).
- 2262 15. Adicionar a septa.
- 2263 16. Homogeneizar a placa em vórtex.
- 2264 17. Submeter à placa a um *spin* no *miniplate spinner*.
- 2265 18. Colocar a placa em termociclador (tampa aberta) por 95 °C por 5 min.
- 2266 19. Colocar a placa em *cooler* ou banho de gelo por 1 min.

2267 20. Após a precipitação com EDTA e etanol, a placa é inserida no
2268 sequenciador (*ABI 3500 Genetic Analyzer - Applied Biosystems*) para
2269 realizar a eletroforese capilar.

2270
2271
2272
2273
2274
2275
2276
2277
2278
2279
2280
2281
2282
2283
2284
2285
2286
2287
2288
2289
2290
2291

ANEXO C

Software

1. *Basic Local Alignment Search Tool*
(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)
2. *Bio Edit 7.2 - Creates and edits biological sequence models*
(<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>)
3. *Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA X)*
(<https://www.megasoftware.net/>)
4. *Phred software - Electropherogram quality analysis*
(<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>)
5. *CAP3 software - Sequence Assembly Program*
(<http://doua.prabi.fr/software/cap3>)
6. *SDT v1.2 - Sequence Demarcation Tool*
(<http://web.cbio.uct.ac.za/~brejnev/>)