



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

RODRIGO ALEJANDRO ARELLANO OTONEL

**DIVERSIDADE MOLECULAR DO VÍRUS DA DIARREIA
VIRAL BOVINA IDENTIFICADO EM ANIMAIS
PERSISTENTEMENTE INFECTADOS PROVENIENTES DE
UM REBANHO LEITEIRO**

Londrina
2011

RODRIGO ALEJANDRO ARELLANO OTONEL

**DIVERSIDADE MOLECULAR DO VÍRUS DA DIARREIA
VIRAL BOVINA IDENTIFICADO EM ANIMAIS
PERSISTENTEMENTE INFECTADOS PROVENIENTES DE
UM REBANHO LEITEIRO**

Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Área de Concentração: Sanidade Animal) da Universidade Estadual de Londrina.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Alice Fernandes Alfieri

Londrina
2011

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

O88d Otonel, Rodrigo Alejandro Arellano.

Diversidade molecular do vírus da diarreia viral bovina
identificado em animais persistentemente infectados
provenientes de um rebanho leiteiro / Rodrigo
Alejandro Arellano Otonel. – Londrina, 2011.

xiv, 63 f. : il.

Orientador: Alice Fernandes Alfieri.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de
Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal, 2011.

Inclui bibliografia.

1. Diarreia em bovino – Teses. 2. Virus de RNA – Filogenia – Teses. 3.
Bovino de leite – Doenças – Teses. 4. Bovino – Infecções – Teses. 5. Víruses
em animais – Teses. 6. Virologia veterinária – Teses. I. Alfieri, Alice Fernandes.
II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias.
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 619:636.2

RODRIGO ALEJANDRO ARELLANO OTONEL

**DIVERSIDADE MOLECULAR DO VÍRUS DA DIARREIA VIRAL
BOVINA IDENTIFICADO EM ANIMAIS PERSISTENTEMENTE
INFECTADOS PROVENIENTES DE UM REBANHO LEITEIRO**

Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Área de Concentração: Sanidade Animal) da Universidade Estadual de Londrina.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Maria Helena Pelegrinelli Fungaro
UEL – Londrina – PR

Prof. Dr. João Luis Garcia
UEL – Londrina – PR

Prof^a. Dr^a. Alice Fernandes Alfieri
UEL – Londrina – PR

Londrina, 25 de março de 2011.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Virologia Animal, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (Área de Concentração: Sanidade Animal), sob orientação da Prof^a. Dr^a. 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**

DEDICATÓRIA

Dedico a meus pais Oscar e Marcela e meus avós Oscar (“Tata”) e Graciela (“Chela”); Antônio (“Abuelo” *in memoriam*) e Yvonne (“Ivom”).

AGRADECIMENTOS

À Deus primeiramente sem dúvida nenhuma.

Ao meu Anjo da Guarda que sempre esteve ao meu lado me protegendo.

Aos meus pais e meus avós pela educação que me deram, por sempre acreditarem e torcerem por mim. Afinal eu sou o que sou por causa deles.

À toda minha família que sempre torceu por mim.

Aos meus orientadores pela confiança que depositaram em mim e pelas orientações e ensinamentos.

Ao pessoal do laboratório pelo companherismo, ajuda, paciência e amizade.

Ao meus amigos que sempre torceram por mim e pelos momentos de diversão durante os vários churrascos que foram feitos ao longo desse período.

À minha namorada pela paciência, compreensão e por sempre estar ao meu lado.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação e dos laboratórios do DMVP por toda ajuda.

Ao CNPq pela bolsa de estudos concedida.

Muito Obrigado!

*“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um tem o direito de
fazer mudanças, recomeçar, e, fazer um novo fim”*

“A vida nos dá, a cada dia, uma nova folha em branco para tentarmos tudo outra vez”

Legrand

OTONEL, R. A. A. **Diversidade molecular do vírus da diarreia viral bovina identificado em animais persistentemente infectados provenientes de um rebanho leiteiro.** 2011. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal, Área de Concentração: Sanidade Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

RESUMO

Vírus da diarreia viral bovina (BVDV) é um importante patógeno de bovinos em todo o mundo que causa impacto econômico substancial sobre as indústrias de carne e laticínios. O BVDV é um vírus RNA fita simples, que tem uma capacidade única para causar infecções persistentes nos fetos expostos no início de seu desenvolvimento intrauterino. A grande diversidade de tipos e subtipos de estirpes de BVDV selvagem reflete em conseqüências práticas sobre as formas de apresentação clínica, epidemiologia, diagnóstico e controle da doença. O objetivo deste estudo foi descrever a diversidade de subgenotipos de BVDV em animais persistentemente infectados (PI) identificados em um rebanho de bovinos leiteiros aberto, de alta produção. A propriedade era localizada no estado do Paraná, região sul do Brasil, com um bom manejo nutricional e sanitário, incluindo a vacinação semestral com uma vacina inactivada para o controle da infecção de BVDV. O rebanho era composto por 692 animais predominantemente da raça Holandesa. Em primeiro lugar, para a identificação dos animais PI, o soro de todos os animais foram analisados por RT-PCR usando primers para amplificar parte das regiões 5' não-traduzida (5'UTR) e N^{pro} do genoma do BVDV. Os animais positivos nesta primeira análise e mais aqueles que nasceram no intervalo entre a primeira e a segunda coleta de amostras de sangue, foram analisadas novamente pela técnica de RT-PCR. No primeiro RT-PCR foram identificados 29 bovinos com BVDV infecção transitória. A segunda análise pela RT-PCR identificou três animais, duas vacas e uma bezerra, com infecção persistente e de uma bezerra provavelmente PI. As análises filogenéticas das sequências dos amplicons revelaram que os três animais PI foram infectados por diferentes subgenotipos de BVDV (BVDV-1a, BVDV-1b, e BVDV-1d). No entanto, a subgenotipo BVDV-1a que compõe a vacina foi identificado no rebanho. Este estudo revelou que, em um rebanho bovino leiteiro aberto, regularmente vacinado com uma vacina inativada, podem ser encontrados animais infectados com o PI subgenotipos diferentes BVDV. Estes resultados aumentam a discussão sobre a imunidade contra a infecção pelo BVDV e da eficiência das vacinas utilizadas para o controle da diarreia viral bovina em rebanhos aberto com animais PI.

Palavras-chave: Bovinos. BVDV. Animais PI. Genotipagem. 5'UTR. N^{pro}.

OTONEL, R. A. A. **Molecular diversity of bovine viral diarrhoea virus identified in persistently infected animals from a dairy herd.** 2011. 63 f. Dissertation (Master's Degree in Animal Science) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

ABSTRACT

Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) is an important worldwide cattle pathogen that causes substantial economic impact on both the beef and dairy industries. The BVDV is a single-stranded RNA virus that has a unique capacity to cause persistent infections in fetuses exposed early in their intrauterine development. The great diversity of types and subtypes of BVDV wild-type strains reflects in practical consequences on forms of clinical presentation, epidemiology, diagnosis, and disease control. The aim of this study was to describe the diversity of BVDV subgenotypes in persistent infected (PI) animals identified in a highly productive open dairy cattle herd. The farm was located in the Parana state, south region of Brazil, and had good nutritional and health management including biannual vaccination with inactivated vaccine for the BVDV infection control. The herd was composed by 692 animals predominantly of Holstein breed. Firstly, for the identification of PI animals the blood serum of all animals were analyzed by RT-PCR assay using primers to partially amplify the 5' untranslated region (5'UTR) and N^{pro} region of the BVDV genome. The positive animals in this first analysis and those that were born in the interval between the first and second blood sample collection were further analyzed by RT-PCR assay. In the first evaluation were identified 29 animals with BVDV transient infection. The second RT-PCR analysis identified three animals, two cows and one calf, with BVDV persistent infection and one putative PI calf. The phylogenetic analyses of the amplicon sequences revealed that the three PI animals were infected by different BVDV subgenotypes (BVDV-1a, BVDV-1b, and BVDV-1d). The subgenotype BVDV-1a, included in the vaccine composition, was identified in the herd. This study demonstrated PI animals infected with different BVDV subgenotypes in an open dairy cattle herd, regularly vaccinated with an inactivated vaccine against BVDV. These results increase the discussion about the immunity against the BVDV infection and the efficiency of the vaccines used for the control of the bovine viral diarrhoea in open herds with PI animals.

Keywords: Bovine. BVDV. PI animals. Genotyping. 5'UTR. N^{pro}.

LISTA DE FIGURAS

1 REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1** – Árvore filogenética reconstruída a partir da sequência genômica da região 5'UTR de um representante de cada subgenótipo do BVDV disponível em banco de dados público (Genebank) 22
- Figura 2** – Filogenia e classificação dos *Pestivirus* demonstrada na árvore filogenética reconstruída por Peterhans et al. (2010)..... 23

3 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

- Figura 1** – Phylogenetic tree showing typing of BVDV-1 strains in 5'UTR region. The isolate from Dead Calf can not be grouped in subgenotype BVDV-1c branch because of low bootstrap score (60). The other isolates were grouped branch indicates with high bootstrap score The tree was prepared using 240 nucleotides of evaluated BVDV strains plus the reference strains of BVDV-1 NADL (M31182), Singer (L32875), F (AF298085), 16-111(AF298056), Trangie Y546 (AF049222), Bega (AF049221), Osloss (M96687), UEL1/BR (EF406123); BVDV-2 strain 890 (GI:902376) and Soldan(GI:2071979), using neighbor-joining algorithm with Kimura 2-parameters. Phylogenetic groups are labeled according to Vilcek et al. (2001) and Flores et al. (2002). Statistical confidence values calculated using Mega v.4.1.software with 1000 replicates. 44
- Figura 2** – Phylogenetic tree showing typing of BVDV-1 strains in N^{pro} region. The isolate from Dead Calf can be grouped in subgenotype BVDV-1a branch with high bootstrap score. The tree was prepared using 397 nucleotides of evaluated BVDV, using neighbor-joining algorithm with Kimura 2-parameters. Phylogenetic groups are labeled according to Vilcek et al. (2001) and Flores et al. (2002). Statistical confidence values calculated using Mega v.4.1.software with 1000 replicates. 45
- Figura 3** – PI cow1. The arrow indicates the animal..... 46
- Figura 4** – PI Calf. The arrow indicates the animal..... 46

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Proteínas constituintes do vírus da diarreia viral bovina.....	19
Quadro 2 – Espécies virais reconhecidas e propostas no gênero <i>Pestivirus</i>	20
Quadro 3 – Subgenótipos do BVDV-1 identificados em alguns países.....	21

SUMÁRIO

1 REVISÃO DE LITERATURA	12
REFERÊNCIAS	24
2 OBJETIVOS	32
2.1 OBJETIVO GERAL	32
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
3 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO	33
3.1 DIVERSITY OF BOVINE VIRAL DIARRHEA SUBGENOTYPES IN A VACCINATED DAIRY CATTLE HERD WITH PERSISTENTLY INFECTED ANIMALS	33
4 CONCLUSÕES	51
APÊNDICES	52
APÊNDICE A - Lista de Reagentes	53
APÊNDICE B - Soluções e Tampões	54
APÊNDICE C - Kits	57
APÊNDICE D - Protocolo de Técnicas.....	58
ANEXOS	61
ANEXO A - Árvore filogenética da região 5'UTR, idêntica à demonstrada no artigo para publicação em formato tradicional retangular	62
ANEXO B - Árvore filogenética da região N ^{pro} , idêntica à demonstrada no artigo para publicação em formato tradicional retangular	63

1 REVISÃO DE LITERATURA

Vírus da diarreia viral bovina (*bovine viral diarrhea virus* - BVDV) é a denominação de um grupo heterogêneo de vírus da família *Flaviviridae*, gênero *Pestivirus*. O BVDV é um patógeno de importância econômica mundial afetando, principalmente, os ruminantes. Fazem parte do mesmo gênero o vírus da peste suína clássica (*classical swine fever virus* - CSFV) e o vírus da doença da fronteira dos ovinos (*border disease virus* - BDV) (BECHER et al., 2003).

A primeira observação registrada da doença, diarreia viral bovina (*bovine viral diarrhea* - BVD), data de 1946 quando uma nova doença transmissível em bovinos foi observada no estado de New York, EUA (OLAFSON et al., 1946) e no Canadá (CHILDS, 1946). Esta doença foi caracterizada por leucopenia, febre, apatia, diarreia, anorexia, erosões gastrointestinais e hemorragias. O agente etiológico viral foi isolado em 1957 e denominado BVDV (LEE; GILLESPIE, 1957). Uma doença semelhante foi relatada alguns anos mais tarde, afetando menos animais por rebanho, porém, com uma taxa de mortalidade maior, que não foi transmitida experimentalmente, a qual passou a ser denominada de Doença das Mucosas (*Mucosal disease* – MD) (RAMSEY; CHIVERS, 1953). Uma doença com a mesma apresentação clínica foi descrita por vários grupos de pesquisadores no final de 1950 na Alemanha (LIESS et al., 1996). Por meio da técnica de vírus neutralização verificou-se que se tratava do mesmo vírus (GILLESPIE et al., 1961; KNIAZEFF et al., 1961).

Posteriormente, foi demonstrado que o BVDV era antígenicamente relacionado ao CSFV, na época denominado vírus da cólera suína (DARBYSHIRE, 1962), e também ao BDV (PLANT et al., 1973).

Em 1973, o termo pestivírus, foi criado para este grupo de vírus (HORZINEK, 1973), que foram classificados como um gênero da família *Togaviridae* (FENNER, 1976). Naquele tempo os flavivírus também foram classificados como gênero da família *Togaviridae*. Porém, com os avanços na caracterização molecular dos flavivírus, revelaram-se diferenças fundamentais na estrutura molecular, na estratégia de replicação e na organização genética entre eles e outros membros da família *Togaviridae* (RIDPATH, 2010). Com isso os flavivírus foram alocados em uma nova família, a *Flaviviridae*, que continha inicialmente um gênero, *Flavivirus* (WESTAWAY et al., 1985).

A publicação da sequência genômica da estirpe NADL do BVDV revelou que esses pestivírus tinham maiores semelhanças na organização genômica, expressão gênica

e na estratégia de replicação com os membros da família *Flaviviridae* do que com a família *Togaviridae* (COLLETT et al., 1988). Isto levou à reclassificação dos pestivírus, em 1991, como um novo gênero da família *Flaviviridae* (FRANCKI et al., 1991).

Os *Pestivirus* são partículas esféricas, com 40 a 60 nm de diâmetro, que apresentam envelope, núcleo compacto eletrodense e possuem densidade equivalente a 1.134 g/mL (MOENNIG, 1990). O BVDV possui envoltório lipoproteico derivado das membranas das células hospedeiras e seu nucleocapsídeo apresenta um genoma constituído por uma fita linear simples de RNA de polaridade positiva, numa molécula de aproximadamente 12,3 kb (12.300 nt). Por ser um vírus de RNA de fita simples, o BVDV apresenta tendência a mutação (RIBEIRO, 2009). Incorporações errôneas de nucleotídeos (nt) durante a replicação são toleradas contanto que não sejam letais aos vírus (MEYERS et al., 1991). O processo aleatório de acúmulo de mutações nos genes virais é responsável pela geração de genótipos e subgenótipos (RIBEIRO, 2009). As diferenças nos biótipos são o resultado das mutações genéticas a partir da recombinação (KUMMERER et al., 2000; RIDPATH, 2005). As numerosas mutações sofridas pelo BVDV levam à heterogeneidade, que propicia a evasão do sistema imunológico do hospedeiro (RIDPATH, 2003; KELLING, 2004).

A replicação do BVDV ocorre no citoplasma celular e o pico máximo de liberação dos vírions ocorre entre 12 e 24 h após a infecção. Cada célula é capaz de produzir de 100 a 1.000 novos vírions, e as primeiras partículas são liberadas por exocitose 10 h após a infecção (RIBEIRO, 2009).

O vírion é resistente às variações de pH de 5,7 a 9,3 e pode manter a infectividade no meio ambiente por até duas semanas. Porém, são rapidamente inativados pelo calor, solventes orgânicos, detergentes e desinfetantes comuns, como fenóis e clorexidina (MOENNIG, 1990; KELLING, 1996; RIDPATH, 2005).

O genoma do BVDV apresenta aproximadamente 3.900 códonos que contém uma grande fase aberta de leitura (*Open Reading Frame* – ORF), flanqueada por duas regiões terminais 5' e 3' não-traduzidas (*Untranslated Terminal Region* – UTR). A ORF é traduzida em uma poliproteína hipotética de 3.900 aminoácidos. Os produtos dessa poliproteína processada são clivados por proteases virais e celulares que dão origem a um número de proteínas virais que varia de 11 a 13 (MEYERS; THIEL, 1996). A composição genética básica dos pestivírus é de 32% A (adenina), 22% U (uracila), 26% G (guanina) e 20% C (citosina) (DENG; BROCK, 1992).

Entre as proteínas virais codificadas pela ORF destacam-se; i) uma autoprotease não-estrutural N-terminal (N^{pro}); ii) uma proteína que forma um componente

estrutural do capsídeo (C); iii) três glicoproteínas do envelope (E^{ms} , E1 e E2); iv) as proteínas não-estruturais NS2-3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B (CORIA et al., 1983). A função das proteínas codificadas pelo BVDV está descrita no quadro 1 adaptado de Ridpath (2010).

A genotipagem é o agrupamento com base na comparação de sequências genômicas. Não existem regras bem estabelecidas que regem a taxonomia para que se possa determinar se dois genomas são genótipos diferentes. (RIDPATH, 2010).

A diferenciação entre os genótipos BVDV 1 e 2 foi baseada em considerações práticas (distribuição geográfica, variação antigênica ou variações na virulência) (RIDPATH, 2005). O primeiro relato da divisão das estirpes de BVDV em dois diferentes genótipos foi baseado na comparação da região 5' UTR (PELLERIN et al., 1994; RIDPATH et al., 1994). Estudos anteriores, de reação cruzada empregando anticorpos monoclonais, indicavam considerável variação entre as estirpes de BVDV, porém, não era possível gerar nenhum padrão de agrupamento de vírus com base nessas variações (BOLIN et al., 1991; DONIS et al., 1991; EDWARDS et al., 1991). Enquanto isso, a análise de hibridização e comparação de sequências de nt sugeriu que a região 5' UTR era altamente conservada em comparação com outras partes do genoma (LEWIS et al., 1991; RIDPATH; BOLIN, 1991; RIDPATH et al., 1993). As sequências dessa região foram avaliadas por vários grupos utilizando a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), desenvolvida para detectar a ampla gama de estirpes de BVDV ou diferenciar BVDV de CSFV ou BDV (HOFMANN et al., 1994; VILCEK, 1994). Paralelamente a essas pesquisas, uma forma altamente virulenta de BVD, denominada Síndrome Hemorrágica foi relatada no Canadá e Estados Unidos (CARMAN et al., 1998).

A análise filogenética das estirpes de BVDV isoladas de animais que sofriam de síndrome hemorrágica mostrou a formação de um agrupamento separado das estirpes de BVDV comumente utilizadas, naquela época, para a produção de vacinas, testes diagnósticos e em investigações (PELLERIN et al., 1994; RIDPATH et al., 1994). Esse grupo recém reconhecido do BVDV foi designado genótipo BVDV II, e o grupo contendo as estirpes utilizadas anteriormente foi denominado genótipo BVDV I. Os nomes desses dois genótipos foram posteriormente modificados para BVDV-1 e BVDV-2 em conformidade com as convenções taxonômicas em uso para outros vírus (HEINZ et al., 2000). Além das quatro espécies reconhecidas dos *Pestivirus*, BVDV-1, BVDV-2, BDV e CSFV, atualmente outras espécies têm sido propostas descritas no quadro 2. A figura 1 mostra a distribuição dos *Pestivirus* na árvore filogenética segundo Peterhans et al. (2010).

Em 2004, um novo pestivírus foi isolado de soro fetal bovino proveniente do Brasil (SCHIRRMEIER et al., 2004). Posteriormente, outros isolados de BVDV identificados na América do Sul e no sudeste Asiático, com base em análises filogenéticas, foram agrupados com este novo pestivírus (STALDER et al., 2005; STAHL et al., 2007). Estes isolamentos foram provenientes de soro fetal bovino, bubalinos e bovinos persistentemente infectados (STAHL et al., 2007). A similaridade na apresentação clínica com BVDV-1 e BVDV-2 a capacidade de estabelecer infecção persistente em bovinos tem levado alguns pesquisadores a sugerir que este grupo de vírus seja referido como BVDV-3 (LIU et al., 2009).

A separação, em duas espécies (BVDV-1 e BVDV-2), foi primeiramente baseada na análise filogenética e subsequente caracterização das estirpes virais das duas espécies demonstrando diferenças antigênicas (RIDPATH et al., 2000). O significado prático dessas diferenças antigênicas foi evidenciado por falhas vacinais e em sistemas de diagnósticos baseados na estirpe BVDV 1 para o controle e detecção de estirpes virais pertencentes ao BVDV 2 (DEREGT, 2005).

Além das duas espécies de BVDV, os mesmos indícios que levaram à separação em genótipos 1 e 2, levaram as estirpes virais à separação em subgenótipos. Para isso, costuma-se analisar três regiões do genoma constituídas pela 5'-UTR (RIDPATH et al., 1994; VILCEK et al., 2001; WOLFMEYER et al., 1997); proteína N^{pro} (BECHER et al., 1997; VILCEK et al., 2001); e proteína E2 (BECHER et al., 1999; TAJIMA et al., 2001). Estas análises, especialmente nas regiões 5'-UTR e N^{pro}, revelaram agrupamentos em subgenótipos dentro das espécies BVDV-1 e BVDV-2, sendo até o momento descritos 11 subgenótipos em BVDV-1 (BVDV-1a - BVDV-1k; Fig. 2) (VILCEK et al., 2001) e dois em BVDV 2 (BVDV-2a e BVDV-2b) (FLORES et al., 2005). Subgenótipos adicionais do BVDV 1 têm sido identificados em isolamentos de BVDV em bovinos na África do Sul e Suíça, mas ainda não foram atribuídos nomes (KABONGO et al., 2003; KABONGO; VAN VUUREN, 2004; BACHOFEN et al., 2008). Os subgenótipos ainda não são aceitos pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus, no entanto, eles são amplamente utilizados em estudos envolvendo a epidemiologia molecular do BVD (FALCONE et al., 2003; TAJIMA et al., 2001).

As estirpes de BVDV podem ainda ser classificadas em dois biótipos. A segregação em biótipo é baseada na capacidade de indução de efeito citopático (ECP) caracterizado por alterações microscópicas visíveis (vacuolização e lise) em cultivos *in vitro* de células epiteliais (KELLING, 1996). A infecção *in vitro* de células permissivas com

estirpes citopáticas (CP) resulta na ativação da caspase e indução de apoptose ocorrendo a destruição da estrutura celular (GRUMMER et al., 2002). Já as infecções com estirpes não-citopáticas (NCP), *in vitro*, decorrem do aumento da regulação da proteína Bcl-2 antiapoptótica consequentemente na supressão da iniciação da morte celular (BENDFELDT et al., 2003). No entanto, os biotipos se comportam diferentemente *in vivo*. As estirpes NCP apresentam tropismo por leucócitos, órgãos linfóides e pelo trato respiratório, enquanto as estirpes CP estão restritas ao trato digestório (HAMERS et al., 2001).

A grande maioria das estirpes do BVDV isoladas no campo são NCP enquanto que as estirpes CP são menos frequentes e isoladas, principalmente, de casos clínicos de MD (DEREGT; LOEWEN, 1995). Acredita-se que as estirpes CP surgem a partir de estirpes NCP por meio de um evento de mutação que resulta na clivagem da proteína viral NS2/3 em duas proteínas, NS2 e NS3. O evento mutacional mais frequentemente observado que resulta na mudança do biotipo é a inserção de pequenos fragmentos de material genético no genoma de uma estirpe viral NCP. As inserções podem ser decorrentes de processos de recombinação com outro BVDV ou com a célula hospedeira infectada (BECKER, 2000). Citopatologia *in vitro* não tem correlação com a virulência *in vivo*. A forma clinicamente grave da infecção aguda pelo BVDV está associada a estirpes NCP (CARMAN et al., 1998; RIDPATH et al., 2006).

Vacas prenhes infectadas com estirpes NCP do BVDV, tanto pelo BVDV-1 quanto pelo BVDV-2, antes do desenvolvimento da imunocompetência fetal (120 dias de gestação) podem gerar bezerros que são imunotolerantes e persistentemente infectados (PI) pelo BVDV (LIEBLER-TENORIO, 2005). As estirpes CP do BVDV não são capazes de causar esse tipo de infecção (GROOMS, 2004). Nessa fase da gestação, o sistema imunológico do feto é imaturo e as proteínas virais são reconhecidas erroneamente como próprias. O animal PI torna-se imunologicamente tolerante ao BVDV e o próprio animal mantém o vírus no rebanho (DUBOVI, 1998). Embora PIs sejam imunotolerantes ao BVDV, são imunocompetentes a outros antígenos (BROCK, 1995) e desenvolvem resposta imunológica contra estirpes virais heterólogas do BVDV (BAKER, 1995). Essa característica tem extrema importância em programas de controle e, por esta razão, a maioria das vacinas vivas modificadas de BVDV utilizam estirpes virais CP (RIDPATH, 2010).

Os animais PI são a principal fonte de manutenção e transmissão da infecção nos rebanhos pois, embora pareçam saudáveis, geralmente eliminam o vírus em altos títulos constantemente nas secreções e excreções (RIDPATH; FLORES, 2007). Geralmente sucumbem à MD após superinfecção com o biotipo CP homólogo ao NCP persistente

(BROWNLIE et al., 1985; HOUE, 1993; BAKER, 1995). A MD ocorre, na maioria dos casos, entre os seis meses e os dois anos de idade, e é caracterizada por diarreia profusa, às vezes sanguinolenta, frequentemente seguida de erosões na mucosa digestiva, e geralmente é fatal (BAKER, 1995).

O BVDV encontra-se amplamente difundido em rebanhos bovinos de corte e de leite em todo o mundo. Análises de estirpes de BVDV-1 originadas de vários países europeus mostraram que diferentes subgenotipos predominam em diferentes regiões geográficas (Quadro 3).

Análises realizadas em estirpes selvagens de BVDV-2 isoladas na Europa confirmam que essa espécie de vírus, identificada inicialmente no Canadá e EUA, encontra-se também disseminada pelo continente europeu. O BVDV-2 já foi descrito na Alemanha (WOLFMAYER et al., 1997); Bélgica (COUVREUR et al., 2002); Itália (PRATELLI et al., 2001); Reino Unido (WAKELEY et al., 2004); França (VILCEK et al., 2001); Eslováquia (VILCEK et al., 2002) e Áustria (VILCEK et al., 2003).

Programas de controle e erradicação da infecção pelo BVDV sem o uso de vacinas têm sido implementados em alguns países europeus. Esses programas baseiam-se na identificação de rebanhos infectados e certificação de rebanhos livres, seguidos do descarte dos animais PI dos rebanhos positivos (LINDBERG; ALENIUS, 1999).

Os primeiros programas sistemáticos destinados a erradicar a BVD foram introduzidos em 1993-1994, na Dinamarca, Finlândia, Noruega e Suécia. Em geral, estes programas começaram com adesão voluntária e, posteriormente, foram institucionalizados pela legislação sanitária (MOENNIG et al., 2005). Em 1997, a Áustria seguiu com um programa regional que foi estendido a todo o país em 2004 (MOENNIG et al., 2005). Os esforços no controle sistemático também foram implementados de forma variável em outras partes da Europa, como nas Ilhas Shetland, onde BVDV foi erradicado (SYNGE et al., 1999), na Bretanha e na França (JOLY et al., 2005), nos Países Baixos (MOEN et al., 2005), na Alemanha (MOENNIG et al., 2005) e regiões de Roma e da Itália (FERRARI et al., 1999; LUZZAGO et al., 2004). Embora as vacinas estão disponíveis em todos esses países, todos os programas, exceto para a Alemanha, são baseados em abordagens sem vacinação. As únicas abordagens que têm sido bem sucedidas na redução do impacto da infecção pelo BVDV em maior escala são aqueles que colocam ênfase na biossegurança, em geral, e controle dos contatos diretos dos animais, em especial, com ou sem o uso complementar de vacinas. (MOENNIG et al., 2005). A região norte da Alemanha já havia introduzido, em 1988, um regime de compensação dos animais PI abatidos. Esta conduta foi acompanhada pela

certificação dos rebanhos individuais que estavam livres de animais PI. No entanto, em 1992, devido a reinfecções, a vacinação sistemática foi recomendada em rebanhos que tinham sido declarados livres do BVDV (HOUE et al., 2006).

No Brasil, a primeira caracterização genotípica de isolados de BVDV foi realizada por Canal et al. (1998), que também demonstrou tanto a presença do BVDV-1 como a do BVDV-2 no país. A primeira identificada como BVDV-2 foi a estirpe Soldan, isolada de um bezerro com diarreia sanguinolenta em 1991, no Rio Grande do Sul (RIBEIRO, 2009). Estudos posteriores, com outros isolados brasileiros de BVDV-2 demonstraram baixa reatividade sorológica cruzada frente às amostras de BVDV-1 (GIL et al., 1998). A análise de uma sequência do gene da proteína não-estrutural NS3, em um estudo filogenético, revelou que os BVDV-2 brasileiros são geneticamente distintos dos BVDV-2 norte-americanos e europeus, constituindo um subgenotipo a parte, denominado provisoriamente de BVDV-2b (FLORES et al., 2002). Cortez et al. (2005) analisando outros isolados brasileiros encontrou oito que foram classificados como BVDV-1a, três como BVDV-1b, dois como BVDV-2a e quatro como BVDV-2b. Nosso grupo de pesquisa identificou um BVDV-1b associado a um surto agudo e fatal de BVD em um rebanho bovino de corte (LUNARDI et al., 2008).

No Brasil, muitas estirpes foram isoladas, mas há carência de informações para melhor caracterização antigênica ou genotípica dos isolados nacionais (CORTEZ et al., 2005). Não há dúvidas de que o acúmulo de dados sobre a genotipagem dos isolados de campo de BVDV contribuirá para a melhor compreensão da evolução desse vírus e da epidemiologia molecular da infecção. A definição dos genótipos mais prevalentes também apresenta impacto positivo no desenvolvimento de métodos de diagnósticos mais sensíveis e específicos e, principalmente, no desenvolvimento de vacinas mais eficazes no controle da infecção.

Quadro 1 – Proteínas constituintes do vírus da diarreia viral bovina

Proteína	Tamanho (kd)	Atributos	Função
N ^{pro}	20	Exclusiva do gênero <i>Pestivirus</i> Altamente conservada Sequência frequentemente utilizada nas comparações filogenéticas	Autoprotease Suprime a resposta imune do hospedeiro
C (Capsídio)	14	Conservada	Forma o núcleo-capsídeo do vírion
E ^{ms}	48	Exclusiva o gênero <i>Pestivirus</i> Glicosilada Encontrado na partícula infecciosa viral e separada na forma solúvel Detecção de alvos para os testes baseados em antígenos	Proteína integrante da membrana viral Atividade de ribonuclease de forma solúvel suprimindo a resposta imune do hospedeiro Possui menor epítipo neutralizante
E1	25	Glicosilada	Proteína integrante da membrana viral
E2	53	Glicosilada Sistema immune – Geração de anticorpos contra E2 após vacinação com vacina inativada ou viva modificada. Sequência com maior polimorfismo entre todas as proteínas virais	Proteína integrante da membrana viral . Possui epítopos neutralizantes dominantes
p7	7	Necessária para a produção de vírus infeccioso, mas não para replicação do RNA	Desconhecida
NS2/3	80	Altamente conservada Detecção de alvos para os testes baseados em antígeno Proteína não-estrutural imunodominante Anticorpos gerados contra a proteína após vacinação com vacina viva modificada, mas não com vacina inativada Vírus citopáticos quando clivada em NS2 e NS3	RNA helicase Serina protease Autoclivagem com formação de proteína não-estrutural a partir da poliproteína viral
NS4a	7.2	Hidrofóbica	Cofator da serina protease
NS4b	38	Hidrofóbica	Componente da replicase
NS5a	55	Fosforilada	Componente da replicase
NS5b	81		RNA polimerase RNA-dependente

Fonte: Adaptado de Ridpath (2010)

Quadro 2 – Espécies virais reconhecidas e propostas no gênero *Pestivirus*

Espécies reconhecidas	Distribuição Geográfica	Hospedeiros
BVDV-1	Mundial, chegando a erradicação em algumas regiões européias	Ruminantes selvagens e domésticos; coelhos e suínos
BVDV-2	Mundial, embora mais prevalente na América do Norte e do Sul; quase erradicado em algumas regiões européias	Ruminantes selvagens e domésticos; coelhos e suínos
CSFV	Erradicado nos EUA e Canadá	Bovinos; suínos e ovinos
BDV	Mundial	Ovinos; caprinos; suínos; bovinos e ruminantes selvagens
<i>Espécies Propostas</i>		
<i>Girafe</i>	Quênia	Girafa (Avalos-Ramirez et al., 2001)
<i>HoBi-like</i> (BVDV-3)	América do Sul e Sudoeste da Ásia	Bovinos (Schirrmeyer et al., 2004)
<i>Pronghorn</i>	EUA	Antílope (Vilcek et al., 2005)
<i>Bungowannah</i>	Austrália	Suínos (Kirkland et al., 2007)
<i>Tunisian sheep virus</i> (TSV)	Tunísia	Ovinos (Liu et al., 2009)

Fonte: Adaptado de Ridpath (2010)

Quadro 3 – Subgenótipos do BVDV-1 identificados em alguns países.

País	Subgenótipo*	Referência
Europa		
Alemanha	a,b,c,d,f,g	Tajima et al. (2001)
Áustria	b,d,f,g,h	Vilcek et al. (2001)
Dinamarca	b,d,e	Utenthal et al. (2005)
Eslovenia	b,d,f,g	Toplak et al. (2004)
Espanha	b,c,h	Arias et al. (2003)
França	a,b,c,d,l	Jackova et al. (2008)
Italia	a,b,d,e,f,h	Falcone et al. (2003); Ciulli et al. (2008)
Reino Unido	a,b,i	Vilcek et al. (1999)
Suíça	a,b,d	Stahl et al. (2005)
Ásia		
Japão	a,b,c,j	Matsuno et al. (2007)
Índia	b	Mishra et al. (2004)
Oceânia		
Austrália	a,c	Mahony et al. (2005)
América do Norte		
Canadá	a,b	Pellerin et al. (1994)
EUA	a,b	Fulton et al. (2005)
América do Sul		
Argentina	a,b	Jones et al. (2001)
Brasil	a,b,d	Cortez et al. (2005); Vilcek et al. (2004)
Chile	a,b	Stahl et al. (2009)
Peru	b	Stahl et al. (2009)

*subgenótipos predominantes estão em negrito

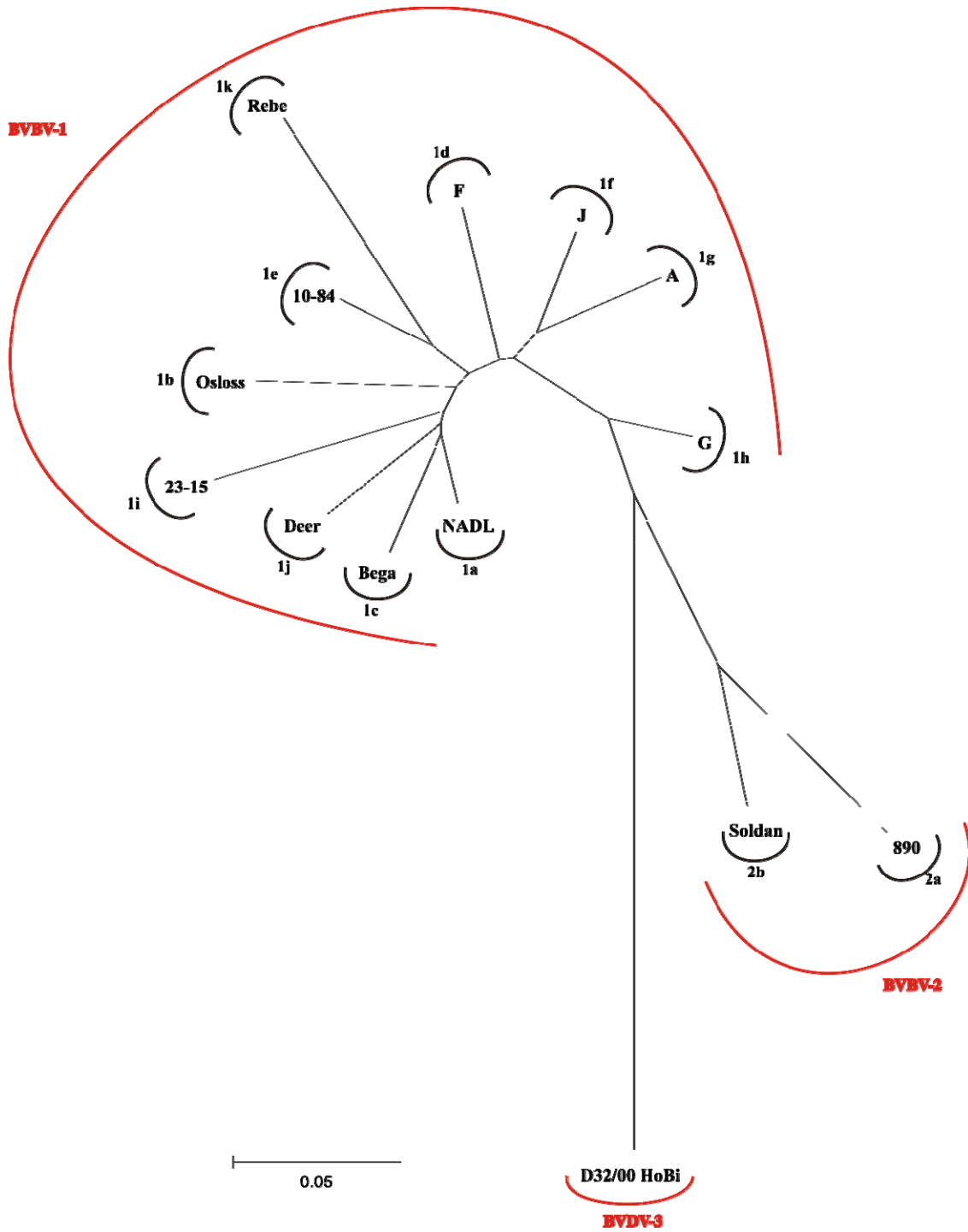


Figura 1 – Árvore filogenética reconstruída a partir da sequência genômica da região 5'UTR de um representante de cada subgenotipo do BVDV disponível em banco de dados público (Genebank)

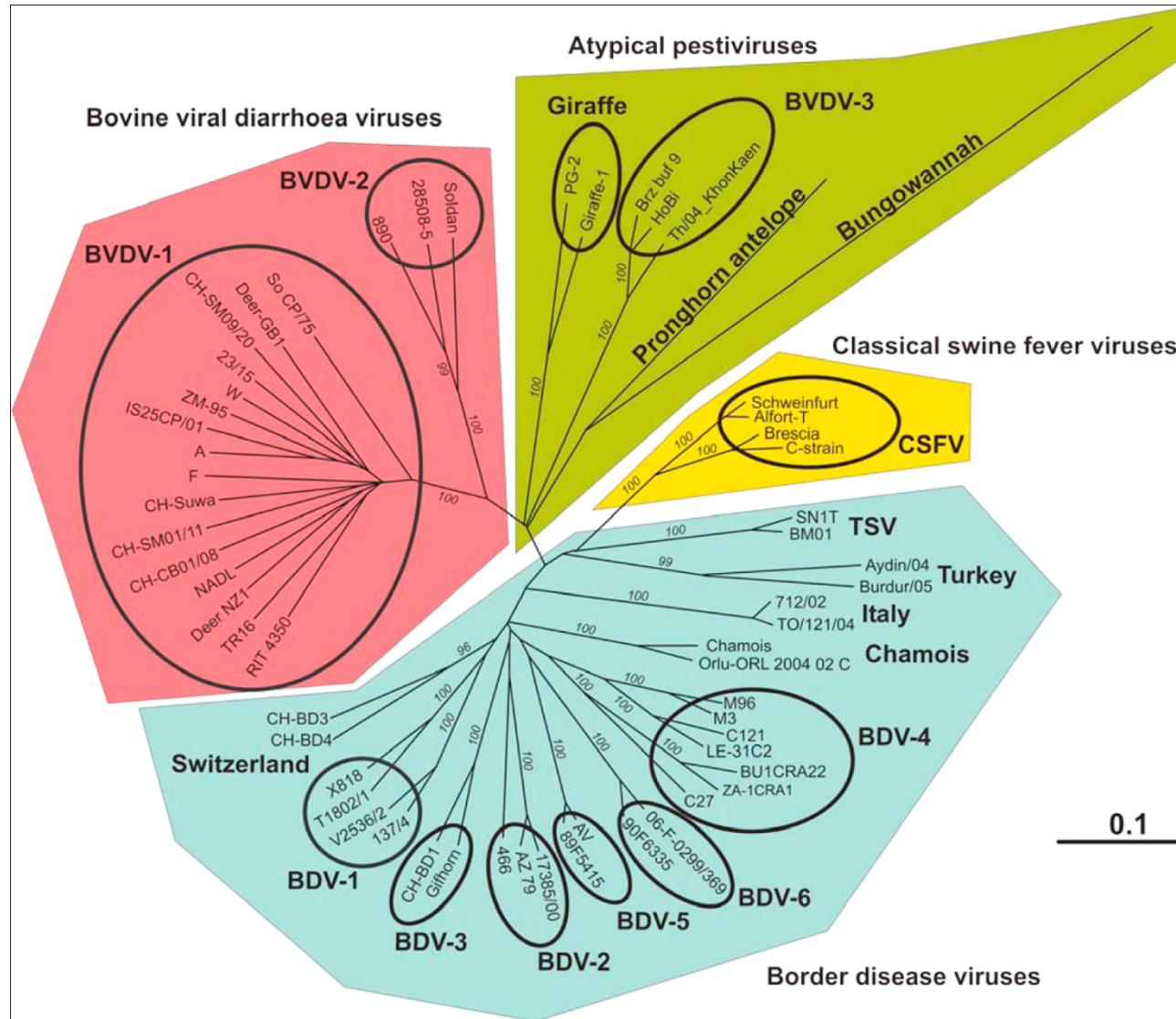


Figura 2 – Filogenia e classificação dos *Pestivirus* demonstrada na árvore filogenética reconstruída por Peterhans et al. (2010).

REFERÊNCIAS

- ARIAS, P. et al. Genetic heterogeneity of bovine viral diarrhoea viruses from Spain. *Veterinary Microbiology*, v.96, p.327-336, 2003.
- AVALOS-RAMIREZ, R. et al. Evidence for the presence of two novel pestivirus species. *Virology*, v.286, n.2, p.456-65, 2001.
- BAKER, J. C. The clinical manifestations of bovine viral diarrhea infection. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v.11, n.3, p.425-445, 1995.
- BACHOFEN, C. et al. Co-existence of genetically and antigenically diverse bovine viral diarrhoea viruses in an endemic situation. *Veterinary Microbiology*, v.131, n.1-2, p.93-102, 2008.
- BECHER, P. et al. Phylogenetic analysis of pestiviruses from domestic and wild ruminants. *Journal of General Virology*, v.78, p.1357-1366, 1997.
- BECHER, P. et al. Genetic diversity of pestiviruses: identification of novel groups and implication for classification. *Virology*, v.262, p.64-7, 1999.
- BECHER, P. et al. Genetic and antigenic characterization of novel pestivirus genotypes: implications for classification. *Virology*, v.311, n.1, p.96-104, 2003.
- BECKER, Y. Evolution of viruses by acquisition of cellular RNA or DNA nucleotide sequences and genes: an introduction. *Virus Genes*, v.21, n.1-2, p.7-12, 2000.
- BENDFELDT, S.; GRUMMER, B.; GREISER-WILKE, I. No caspase activation but overexpression of Bcl-2 in bovine cells infected with noncytopathic bovine virus diarrhoea virus. *Veterinary Microbiology*, v.96, p.313-326, 2003.
- BOLIN, S. R.; LITLEDIKE, E. T.; RIDPATH, J. F. Serologic detection and practical consequences of antigenic diversity among bovine viral diarrhea viruses in a vaccinated herd. *American Journal of Veterinary Research*, v.52, p.1033-1037, 1991.
- BOTTON, S. A. et al. Antigenic characterization of Brazilian isolates of bovine viral diarrhea virus (BVDV) with monoclonal antibodies and by cross-neutralization. *Brazilian Journal Medical Biological Research*, v.31, p.1429-1438, 1998.
- BROCK, K. V. Diagnosis of bovine viral diarrhea virus infections. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v.11, p.549-561, 1995.
- BROWNLIE, J.; CLARKE, M. C.; HOWARD, C. J. Clinical and experimental mucosal disease – defining a hypothesis for pathogenesis. In: HARKNESS, J. W. (Ed.). *Pestivirus Infections of Ruminants*. Brussels: CEC, 1985. p.147-156.
- CANAL, C. W. et al. Detection of antibodies to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and characterization of genomes of BVDV from Brazil. *Veterinary Microbiology*, v.63, p.85-97, 1998.

- CARMAN, S. et al. Severe acute bovine viral diarrhoea in Ontario, 1993–1995. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.10, p.27–35, 1998.
- CHILDS, T. X. Disease of cattle. *Canadian Journal of Veterinary Research*, v.10, p.316–9, 1946.
- CIULLI, S. et al. Genetic typing of bovine viral diarrhoea virus: evidence of an increasing number of variants in Italy. *New Microbiologica*, v.31, p.263-271, 2008.
- COLLETT, M. S.; ANDERSON, D. K.; RETZEL, E. Comparisons of the pestivirus bovine viral diarrhoea virus with members of the flaviviridae. *The Journal of General Virology*, v.69, p.2637–43, 1988.
- CORIA, M. F.; SCHMERR, M. J. F.; MCCLURKIN, A. W. Characterization of the major structural proteins of purified bovine viral diarrhoea virus. *Archives of Virology*, v.76, p.336, 1983.
- CORTEZ, A. et al. Genetic characterization of Brazilian bovine viral diarrhoea virus isolates by partial nucleotide sequencing of the 5'-UTR region. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.26, p.211-216, 2005.
- COUVREUR, B. et al. Genetic and antigenic variability in bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates from Belgium. *Virus Research*. v.85, p.17-28, 2002
- DARBYSHIRE, J. Agar gel diffusion studies with a mucosal disease of cattle. II. A serological relationship between a mucosal disease and swine fever. *Research in Veterinary Science*, v.3, p.123–8, 1962.
- DENG, R.; BROCK, K. V. Molecular cloning and nucleotide sequence of a pestivirus genome, noncytopathic bovine viral diarrhoea virus strain SD-1. *Virology*, v.191, p.867, 1992.
- DEREGT, D. Introduction and history. In: GOYAL, S. M.; RIDPATH, J. F. (Ed.) *Bovine viral diarrhoea virus: diagnosis, management and control*. Ames (IA): Blackwell Publishing, 2005. p. 3–34.
- DEREGT, D.; LOEWEN, K. G. Bovine viral diarrhoea virus - biotypes and disease. *The Canadian Veterinary Journal*, v.36, p.371-378, 1995.
- DONIS, R. O.; CORAPI, W. V.; DUBOVI, E. J. Bovine viral diarrhoea virus proteins and their antigenic analyses. *Archives of Virology Supplementum*, v.3, p.29–40, 1991.
- DUBOVI, E. J. Bovine viral diarrhoea virus. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE HERPESVÍRUS BOVINO E O VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA, Santa Maria, *Anais...* 1998. p.1-19.
- EDWARDS, S.; MOENNIG, V.; WENSVOORT, G. The development of an international reference panel of monoclonal antibodies for the differentiation of hog cholera virus from other pestiviruses. *Veterinary Microbiology*, v.29, p.101–108, 1991.
- FALCONE, E. et al. Genetic heterogeneity of bovine viral diarrhoea virus in Italy. *Veterinary Research Communications*, v.27, p.485–494, 2003.

- FENNER, F. Classification and nomenclature of viruses. Second report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Intervirology*, v.7, n.1–2, p.1–115, 1976.
- FERRARI, G. et al. Bovine virus diarrhoea (BVD) control programme in an area in the Rome province (Italy). *Veterinary Microbiology*, v.64, p.237–245, 1999.
- FLORES, E. F. et al. Phylogenetic analysis of Brazilian bovine viral diarrhoea virus type 2 (BVDV-2) isolates: evidence for a subgenotype within BVDV-2. *Virus Research*, v.87, p.51–60, 2002.
- FLORES, E. F. et al. A infecção pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV) no Brasil: histórico, situação atual e perspectivas. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.25, n.3, p.125–134, 2005.
- FRANCKI, R.; FAUQUET, C. M.; KNUDSON, D.; Brown, F. The fifth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Archives of Virology*, 1991.
- FULTON, R. W. et al. Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) subgenotypes in diagnostic laboratory accessions: Distribution of BVDV1a, 1b, and 2a subgenotypes. *Veterinary Microbiology*, v.111, p.35–40, 2005.
- GIL, L. H. V. G. et al. Genotypic analysis of South America isolates of bovine viral diarrhoea virus. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE HERPESVÍRUS BOVINO (TIPOS 1 E 5) E VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA, Santa Maria. *Anais...* 1998. p.177.
- GILLESPIE, J. et al. Comparison by neutralization tests of strains of virus isolated from virus diarrhoea and mucosal disease. *The Cornell Veterinarian*, v.51, p.155–9, 1961.
- GROOMS, D. L. Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhoea virus. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v.20, p.5–19, 2004.
- GRUMMER, B.; BENDFELDT, S.; GREISER-WILKE, I. Apoptosis inhibitors delay the cytopathic effect of bovine viral diarrhoea virus (BVDV). *Journal of Veterinary Medicine*, v.49, p.298–303, 2002.
- HAMERS, C. et al. Diversity among bovine pestiviruses. *The Veterinary Journal*, v.161, p.112–122, 2001.
- HEINZ, F. X.; COLLETT, M. S.; PURCELL, R. H. Genus pestivirus. In: VAN REGENMORTEL, M. H. V. et al. *Virus Taxonomy*. New York: Academic Press, 2000. p. 867–872.
- HOFMANN, M. A.; BRECHTBUHL, K.; STAUBER, N. Rapid characterization of new pestivirus strains by direct sequencing of PCR-amplified cDNA from the 5' noncoding region. *Archives of Virology*, v.139, p.217–229, 1994.
- HORIZINEK, M. C. The structure of togaviruses. *Progress in Medical Virology*, v.16, p.109–56, 1973.
- HOUE, H. Survivorship of animals persistently infected with bovine virus diarrhoea virus (BVDV). *Preventive Veterinary Medicine*, v.15, p.275–283, 1993.

- HOUE, H.; LINDBERG, A.; MOENNIG, V. Test strategies in bovine viral diarrhoea virus control and eradication campaigns in Europe. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.18, p.427–436, 2006.
- JAKOVA, A. et al. The extended genetic diversity of BVDV-1: Typing of BVDV isolates from France. *Veterinary Research Communications*, v.32, p.7-11, 2008.
- JOLY, A.; BEAUDEAU, F.; FOURICHON, C. Description and first results of a BVDV control scheme in Bretagne (Western France). *Preventive Veterinary Medicine*, v.72, p.209-213, 2005.
- JONES, L. R.; ZANDOMENI, R.; WEBER, E. L. Genetic typing of bovine viral diarrhoea virus isolates from Argentina. *Veterinary Microbiology*, v.81, p.367-375, 2001.
- KABONGO, N.; BAULE, C.; VAN VUUREN, M. Molecular analysis of bovine viral diarrhoea virus isolates from South Africa. *Journal of Veterinary Research*, v.70, p.273–9, 2003.
- KABONGO, N.; VAN VUUREN, M. Detection of bovine viral diarrhoea virus in specimens from cattle in South Africa and possible association with clinical disease. *J S Journal of the South African Veterinary Association*, v.75, n.2, p.90–3, 2004.
- KELLING, C. L. Planning bovine viral diarrhoea virus vaccination programs. *Veterinary Medicine*. v.91, p.873-877, 1996.
- KELLING, C. L. Planning bovine viral diarrhoea virus vaccination programs. *Veterinary Medicine*, v.91, p.873-877, 2003.
- KELLING, C. L. Evolution of bovine viral diarrhoea virus vaccines. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v.20, p.115-129, 2004.
- KIRKLAND, P. D. et al. Identification of a novel virus in pigs— Bungowannah virus: a possible new species of pestivirus. *Virus Research*, v.129, n.1, p.26–34, 2007.
- KNIAZEFF, A.; HUCK, R.; JARRETT, W. Antigenic relationship of some bovine viral diarrhoea-mucosal disease viruses from the United States, Great Britain and West Germany. *The Veterinary Record*, v.73, p.768–9, 1961.
- KUMMERER, B. M. et al. The Genetic basis for cytopathogenicity of pestiviruses. *Veterinary Microbiology*, v.77, p.117-128, 2000.
- LEE, K. M.; GILLESPIE, J. H. Propagation of virus diarrhoea virus of cattle in tissue culture. *American Journal of Veterinary Research*, v.18, p.952–3, 1957.
- LEWIS, T. L. et al. Detection of BVD viruses using synthetic oligonucleotides. *Archives of Virology*, v.117, p.269–278, 1991.
- LIEBLER-TENORIO, E. M. Pathogenesis. In: GOYAL, S. M.; RIDPATH, J. F. *Bovine viral diarrhoea virus*. Iowa: Blackwell Publishing, 2005. cap.7, p.121-143.

- LIESS, B. Cytopathogenicity discovery and impact in BVD research. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM BOVINE VIRAL DIARRHEA VIRUS A 50 YEAR REVIEW. Ithaca, NY. *Anais...* Ithaca, NY: Cornell University, 1996.
- LINDBERG, A. L.; ALENIUS, S. Principles for eradication of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections in cattle populations. *Veterinary Microbiology*, v.64, p.197–222, 1999.
- LIU, L. et al. Phylogeny, classification and evolutionary insights into pestiviruses. *Virology*, v.385, n.2, p.351–7, 2009.
- LUNARDI, M. et al. Outbreak of acute bovine viral diarrhoea in Brazilian beef cattle: clinicopathological findings and molecular characterization of a wild-type BVDV strain subtype 1b. *Research in Veterinary Science*, v.85, n.3, p.599-604, 2008.
- LUZZAGO, C.; FRIGERIO, M.; ZECCONI, A. BVD control program in Lecco and Como provinces (Italy): herd risk categories to modulate interventions. In: PROCEEDINGS OF THE 2ND EUROPEAN SYMPOSIUM ON BVDV CONTROL. Portugal. *Anais...* Portugal. 2004. p.100.
- MAHONY, T. J. et al. Genetic analysis of bovine viral diarrhoea viruses from Austria. *Veterinary Microbiology*, v.106, p.1–6, 2005.
- MATSUNO, K. et al. Genetic and Pathobiological characterization of bovine diarrhoea viruses recently isolated from cattle in Japan. *The Journal of Veterinary Medical Science*, v.69, p.515-520, 2007.
- MEYERS, G. et al. Insertion of cellular sequences in the genome of bovine viral diarrhoea virus. *Archives of virology Supplementum*, v. 3, p.133-142, 1991.
- MEYERS, G.; THIEL, H. J. Molecular characterization of pestivirus. *Advances in Virus Research*, v.47, p.53-118, 1996.
- MISHRA, N. et al. Genetic typing of bovine viral diarrhoea virus isolates from India. *Veterinary Microbiology*, v.104, p.207-212, 2004.
- MOEN, A.; SOL, J.; SAMPIMON, O.C. Indication of transmission of BVDV in the absence of persistently infected (PI) animals. *Preventive Veterinary Medicine*, v.72, p.93-98, 2005.
- MOENNIG, V. Pestiviruses: a review. *Veterinary Microbiology*, v.23, p.35-54, 1990.
- MOENNIG, V. et al. Implementation of two-step vaccination in the control of bovine viral diarrhoea BVD. *Preventive Veterinary Medicine*, v.72, p.109–114, 2005.
- OLAFSON, P.; MCCALLUM, A.; FOX, F. An apparently new transmissible disease of cattle. *The Cornell Veterinarian*, v.36, p.205–13, 1946.
- PELLERIN, C. et al. Identification of a new group of bovine viral diarrhoea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. *Virology*, v.203, p.260–268, 1994.
- PETERHANS, E. et al. Cytopathic bovine viral diarrhoea viruses (BVDV): emerging pestiviruses doomed to extinction. *Veterinary Research*, v.41, p.41, 2010.

PLANT, J. W. et al. Immunological relationship between border disease, mucosal disease and swine fever. *The Veterinary Record*, v.92, n.17, p.455, 1973.

PRATELLI, A. et al. Genomic characterization of pestivirus isolated from lambs and kids in southern Italy. *Journal of Virological Methods*, v.94, p.81-85, 2001.

RAMSEY, F.; CHIVERS, W. Mucosal disease of cattle. *North American Veterinary*, v.34, p.629-33, 1953.

RIBEIRO, C. P. *Avaliação da virusneutralização cruzada frente BVDV-1 e BVDV-2 no diagnóstico da diarreia viral bovina em animais naturalmente infectados*. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

RIDPATH, J. F.; BOLIN, S. R.; KATZ, J. Comparison of nucleic acid hybridization and nucleic acid amplification using conserved sequences from the 5' noncoding region for detection of bovine viral diarrhoea virus. *Journal of Clinical Microbiology*, v.31, p.986-989, 1993.

RIDPATH, J. F.; BOLIN, S. R.; DUBOVI, E. J. Segregation of bovine viral diarrhoea virus into genotypes. *Virology*, v.205, p.66-74, 1994.

RIDPATH, J. F.; BOLIN, S. R. Hybridization analysis of genomic variability among isolates of bovine viral diarrhoea virus using cDNA probes. *Molecular and Cellular Probes*, v.5, p.291-298, 1991.

RIDPATH, J. F. et al. Phylogenetic, antigenic and clinical characterization of type 2 BVDV from North America. *Veterinary Microbiology*, v.77, n.1-2, p.145-55, 2000.

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

RIDPATH, J. F. Classification and molecular biology. In: GOYAL, S. M.; RIDPATH, J. F. (Ed.). *Bovine viral diarrhoea virus: diagnosis, Management and Control*. Ames (IA): Blackwell Publishing, 2005. cap.3, p.65-80.

RIDPATH, J. F. et al. Multiple outbreaks of severe acute BVDV in North America occurring between 1993 and 1995 linked to the same BVDV2 strain. *Veterinary Microbiology*, v.114, n.3-4, p.196-204, 2006.

RIDPATH, J. F.; FLORES, E. F. Flaviviridae. In: FLORES, E. F. *Virologia veterinária*. Santa Maria: Editora da Universidade Federal de Santa Maria, 2007. cap. 22, p.26.

RIDPATH, J. F. Bovine viral diarrhoea virus: global status. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, v.26, n.1, p.105-21, 2010.

SCHIRRMIEIER, H. et al. Genetic and antigenic characterization of an atypical pestivirus isolate, a putative member of a novel pestivirus species. *The Journal of General Virology*, v.85, p.3647-52, 2004.

- STAHL, K. et al. Molecular epidemiology of bovine viral diarrhoea during the final phase of the Swedish BVD-eradication programme. *Preventive Veterinary Medicine*, v.72, n.1-2, p.103-8; discussion 215-9, 2005.
- STAHL, K. et al. Natural infection of cattle with an atypical 'HoBi'-like pestivirus—implications for BVD control and for the safety of biological products. *Veterinary Research*, v.38, n.3, p.517–23, 2007.
- STAHL, K. et al. Genetic diversity of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) from Peru and Chile. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.29, n.1, p.41-44, 2009.
- STALDER, H. P. et al. Genetic heterogeneity of pestiviruses of ruminants in Switzerland. *Preventive Veterinary Medicine*, v.72, n.1–2, p.37–41, 2005.
- SYNGE, B. A. et al. The control of bovine virus diarrhoea virus in Shetland. *Veterinary Microbiology*, v.64, p.223–229, 1999.
- TAJIMA, M. et al. Prevalence of genotypes 1 and 2 of bovine viral diarrhoea virus in Lower Saxony, Germany. *Virus Research*, v.76, p.31–42, 2001.
- TOPLAK, I. et al. Genetic typing of bovine viral diarrhoea virus: most Slovenian isolates are of genotypes 1d and 1f. *Veterinary Microbiology*, v.99, p.175-185, 2004.
- UTTENTHAL, A. et al. Persistent BVDV infection in mousedeer infects calves Do we know the reservoirs for BVDV?. *Preventive Veterinary Medicine*, v.72, p.87-91, 2005.
- VILCEK, S. Development of PCR tests for the detection of bovine herpesvirus-1, bovine respiratory syncytial viruses and pestiviruses. *Veterinárni Medicína*, v.39, p.687–700, 1994.
- VILCEK, S. et al. Genetic typing of bovine pestiviruses from England and Wales. *Veterinary Microbiology*, v.69, p.227-237, 1999.
- VILCEK, S. et al. Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups. *Archives of Virology*, v.146, n.1, p.99–115, 2001.
- VILCEK, S. et al. Identification of bovine viral diarrhoea virus 2 in cattle in Slovakia. *The Veterinary Record*, v.151, n.5, p.150-2, 2002.
- VILCEK, S. et al. Genetic diversity of recent bovine viral diarrhoea viruses from the southeast of Austria (Styria). *Veterinary Microbiology*, v.91, n.2-3, p.285-91, 2003.
- VILCEK, S. et al. Genetic diversity of international bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates: identification of a new BVDV-1 genetic group. *Veterinary Research*, v.35, p.609–615, 2004.
- VILCEK, S. et al. Characterization of a novel pestivirus originating from a pronghorn antelope. *Virus Research*, v.108, p.187–193, 2005.
- WAKELEY, P. R. et al. Characterisation of a type 2 bovine viral diarrhoea virus isolated from cattle in the UK. *Veterinary Microbiology*, v.102, p.19–24, 2004.

WESTAWAY, E. G.; BRINTON, M. A.; GAIDAMOVICH, S. Flaviviridae. *Intervirology*, v.24, n.4, p.183–92, 1985.

WOLFMEYER, A. et al. Genomic (5'-UTR) and serological differences among German BVDV field isolates. *Archives of Virology*, v.142, p.2049–2057, 1997.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Genotipar estirpes do BVDV identificadas em animais PI provenientes de um rebanho bovino leiteiro regularmente vacinado contra a BVD.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar os animais PI por meio da técnica RT-PCR;
- Determinar a sequência de nucleotídeos de um fragmento com 290 pb do região 5'UTR do BVDV, amplificado por RT-PCR e se necessário um fragmento com 428 da região N^{pro} do BVDV, amplificado por RT-PCR;
- Reconstruir a árvore filogenética das estirpes do BVDV identificadas em animais PI.

3 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

3.1 DIVERSITY OF BOVINE VIRAL DIARRHEA SUBGENOTYPES IN A VACCINATED DAIRY CATTLE HERD WITH PERSISTENTLY INFECTED ANIMALS

ABSTRACT

Bovine viral diarrhea virus (BVDV) is an important worldwide cattle pathogen that causes substantial economic impact on both the beef and dairy industries. The BVDV is a single-stranded RNA virus that has a unique capacity to cause persistent infections in fetuses exposed early in their intrauterine development. The great diversity of types and subtypes of BVDV wild-type strains reflects in practical consequences on forms of clinical presentation, epidemiology, diagnosis, and disease control. The aim of this study was to describe the diversity of BVDV subgenotypes in persistent infected (PI) animals identified in a highly productive open dairy cattle herd. The farm was located in the Parana state, south region of Brazil, and had good nutritional and health management including biannual vaccination with inactivated vaccine for the BVDV infection control. The herd was composed by 692 animals predominantly of Holstein breed. Firstly, for the identification of PI animals the blood serum of all animals were analyzed by RT-PCR assay using primers to partially amplify the 5' untranslated region (5'UTR) and N^{pro} region of the BVDV genome. The positive animals in this first analysis and those that were born in the interval between the first and second blood sample collection were further analyzed by RT-PCR assay. In the first evaluation were identified 29 animals with BVDV transient infection. The second RT-PCR analysis identified three animals, two cows and one calf, with BVDV persistent infection and one putative PI calf. The phylogenetic analyses of the amplicon sequences revealed that the three PI animals were infected by different BVDV subgenotypes (BVDV-1a, BVDV-1b, and BVDV-1d). The subgenotype BVDV-1a, included in the vaccine composition, was identified in the herd. This study demonstrated PI animals infected with different BVDV subgenotypes in an open dairy cattle herd, regularly vaccinated with an inactivated vaccine against BVDV. These results increase the discussion about the immunity against the BVDV infection and the efficiency of the vaccines used for the control of the bovine viral diarrhea in open herds with PI animals.

Keywords: Bovine. BVDV. PI animals. Genotyping. 5'UTR. N^{pro}

Introduction

Bovine viral diarrhea virus (BVDV) is an important worldwide cattle pathogen that has a unique capacity to cause persistent infections of fetuses exposed early in their intrauterine development. This ability gives a selective advantage to BVDV allowing continual mutation and antigenic variation within cattle populations (BROCK, 2003; PETERHANS et al., 2003).

The BVDV genome consists of a single stranded positive sense RNA of approximately 12.3 kb, with an open reading frame flanked by 5' and 3' untranslated regions (UTRs). Viral proteins encoded by the ORF constitute: i) a nonstructural N-terminal autoprotease (N^{pro}), ii) a protein that forms a structural component of the capsid (C), iii) three envelope glycoproteins (E^{ms}, E1 and E2), iv) the nonstructural proteins NS2-3, NS4A, NS4B, NS5A and NS5B (CORIA et al., 1983).

Two genotypes of BVDV (BVDV-1, and -2) are mainly recognized and could be further subdivided, and at least eleven subgenotypes of BVDV-1 (1a -1k) and two of BVDV-2 (2a and 2b) have been identified (VILCEK et al., 2001; FLORES et al., 2002). BVDV-1 remains the dominant genotype and has been found worldwide (STAHL et al., 2009). The genetic typing of BVDV has most frequently been based on comparison of partial sequences of the 5' UTR, N^{pro} or E2 regions (VILCEK et al., 2001; BECHER et al., 2003). Several studies have demonstrated biologically significant differences in antigenic determinants between the two genotypes (RIDPATH, 2005) and also between subtypes within BVDV-1 (FULTON et al., 2003). These differences may contribute to BVDV vaccine failure (ZIMMER et al., 2002; FULTON et al., 2005). Genetic diversity of BVDV isolates is therefore not only of academic interest, but has practical implications for surveillance and vaccine design (STAHL et al., 2009).

Although genetically and antigenically diverse, BVDV-1 and BVDV-2 have in common the existence as two biotypes that are differentiated according to either inducing death in cultured cells (cytopathic biotype, CP), or failure to induce cell death (non-cytopathic biotype, NCP). However, it is important to note that the cytopathogenicity of a pestivirus does not correlate with its virulence, since most virulent strains are of the NCP biotype (PETERHANS; SCHWEIZER, 2010).

Investigations involving BVDV genotyping have been conducted by several authors from around the world. Analyses of BVDV-1 isolates from many countries have shown that distinct subgenotypes predominate in different geographic regions. In Europe, the predominant BVDV subgenotypes are, in Austria (1f), Denmark (1d), France (1c), Germany (1d and 1f), Italy (1b and 1e), Slovenia (1d and 1f), Spain (1b), Swedish (1d) and UK (1a) (VILCEK et al., 2001; UTTENTALH et al., 2005; JACKOVA et al., 2008; TAJIMA et al., 2001; FALCONE et al., 2003; CIULLI et al., 2008; TOPLAK et al., 2004; ARIAS et al., 2003; STAHL et al., 2005; VILCEK et al., 1999). In Asia, while 1b and 1c are most frequently found in Japan (MATSUNO et al., 2007), 1b predominates in India (MISHRA et al., 2004). In Australia, the most common subgenotype is BVDV-1c, whereas 1a and 1b were

mostly detected in studies from Canada, USA, Argentina and Chile (PELLERIN et al., 1994; FULTON et al., 2005; JONES et al., 2001; STAHL et al., 2009). Additionally, the BVDV-2 subtype has also been found in most countries cited above.

In Brazil, BVDV-1a, -1b, -2a and -2b have been described in multiple isolates (CANAL et al., 1998; FLORES et al., 2002; CORTEZ et al., 2005; LUNARDI et al., 2008). Besides these already described subgenotypes, Vilcek et al. (2004) found BVDV-1d in a Brazilian isolated.

Exposure of cattle to BVDV may result in either acute transient or persistent infection (CANAL et al., 1998). Immunocompetence of the bovine fetus is established at approximately 125 to 150 days of gestation. An additional requirement of persistent infection is a non-lytic infection with BVDV which does not adversely affect fetal development and maturation. Therefore, transplacental infection in a susceptible pregnant animal at less than 120 days of gestation with a NCP BVDV strain may produce a persistent fetal infection (CORIA; MCCLURKIN, 1978).

Persistently infected (PI) animals may represent approximately 0.5 to 2% of the cattle population (HOUE, 1999). Animals infected in uterus may be born normal and play an important role in the epidemiology of BVDV because they can shed large amounts of virus, serving as a source of infection for susceptible animals. In the latter, the infection is transient, being eliminated by a vigorous immune response. The main clinical manifestations of transient BVDV infection are mild diarrhea, fever, and respiratory symptoms (RADOSTITS; LITTLEJOHNS, 1988), although fatal thrombocytopenia has also been reported in infections with BVDV-2 (HIBBERD et al., 1993; PELLERIN et al., 1994).

The mucosal disease (MD) occurs when a PI animal is affected by a superinfection with CP biotype homologous to the persistent NCP (BROWNLIE et al., 1985; HOUE, 1993; BAKER, 1995). This usually occurs through mutations or recombinations in the genome of NCP strain, causing the corresponding CP virus (MEYERS et al. 1992, 1996).

The aim of this study was to describe the diversity of BVDV subgenotypes in PI animals identified in a highly productive dairy cattle herd with regular vaccination program against the bovine viral diarrhea.

Materials and Methods

Herd

The farm, located in the south region of Brazil (Paraná state - 25°08'S-53°51'O), had good management practices implemented that included biannual vaccination with a commercial available inactivated vaccine for the control of the BVDV infection. The herd consisted of 692 animals and 27 were suckling calves, 43 weaned calves, 235 heifers from 8 to 14 months, 331 lactating cows, 54 dry cows and two bulls, mostly of Holstein breed. The animals were divided into 15 categories and kept separately in different units of the farm. Milk production showed variations according to the seasonality ranging from 8850 to 9500 liters/day, with an average of approximately 27.5 to 29.5 kg /day/cow of milk production. The herd besides the adequate milking, reproduction, health and nutrition management, was presenting reproductive problems causing a considerable number of early embryonic mortality.

Serum Samples

Blood from all animals was obtained by puncturing the tail or jugular. Vacutainer tubes were used with sterile needles (25x8mm) for each individual animal. After coagulation, the whole process of separation and distribution of the serum samples were performed with sterile and disposable equipment to avoid cross contamination. The samples were distributed in triplicate in microtubes and stored at -20°C. After processing all samples in the break of six months, a second blood collection was performed as outlined previously. For the second collection, only the animals from the first sampling that presented a positive result in RT-PCR were selected, plus all the animals born in the interval between the collections ($n = 72$).

While the animals were considered transiently infected (TI) when obtained a positive result only in the first evaluation, they were considered PIs when positive in the two evaluations.

Virus Detection

RNA extraction from blood serum was performed following silica / guanidine isothiocyanate method as previously described (ALFIERI et al., 2006). Aliquots of ultrapure sterile water were included as negative control and BVDV NADL strain infected MDBK (Madin Darby bovine kidney) cells were used as positive controls in all RNA extractions. The RNA was eluted in diethylpyrocarbonate (DEPC) treated water (Invitrogen™Life Technology, Carlsbad, CA, USA).

The RT-PCR assay was performed using the set of primers 103 forward (5' TAG CCA TGC CCT TAG TAG GAC 3'), and 372 reverse (5' ACT CCA TGT GCC ATG TAC AGC 3') designed to amplify a 290 bp length amplicon from the 5'UTR region of the BVDV genome (WEINSTOCK et al., 2001), the reactions were carried out with modifications (PILZ et al., 2005). It was also used the primers pair BD1 forward (5'-TCT CTG CTG TAC ATG GCA CAT G-3'), and BD3 reverse (5'-CCA TCT ATR CAC ACA TAA ATG TGG T-3') designed to amplify a 428 bp length amplicon from part of the N^{pro} region of the BVDV genome (VILCEK et al., 2001).

The reverse transcription was performed with 9 µL of extracted RNA and 20 pmol of 372 or BD3 reverse primer that was denaturated at 97°C for 4 min and immediately transferred to ice for 5 min. Following this step, the RT-MIX solution, was added: 0.25 mM of each dNTP (Invitrogen™Life Technology, Carlsbad, CA, USA), 1x PCR-buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.4 and 50 mM KCl), 1.5 mM MgCl₂, 60 U of M-MLV reverse transcriptase enzyme (Invitrogen™Life Technology, Carlsbad, CA, USA) and ultrapure sterile water to a final volume of 20 µL. After homogenization, the solution was incubated at 42°C for 30 min followed by the enzyme inactivation at 95°C for 5 min.

For the PCR assay, 5 µL of cDNA, 20 pmol of each primer (103 and 372), 0.1 mM of each dNTP, 1x PCR-buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.4 and 50 mM KCl), 1.5 mM MgCl₂, 2.5 U Platinum® *Taq* DNA polymerase (Invitrogen™Life Technology, São Paulo, SP, BR) and ultrapure sterile water to a final volume of 50 µL were used. The reaction was performed in a thermocycler (PTC – 200, MJ Research Co, Water Town, Ma, USA), using the following time and temperature conditions for primers 103 and 372: i) a initial denaturation step at 94°C for 4 min; ii) 40 cycles at 94°C for 1 min, 59°C for 30 s and 72°C for 1 min; iii) a final extension step at 72°C for 7 min (PILZ et al., 2005), and for BD1 and BD3 primers: i) a initial denaturation step at 94°C for 2 min; ii) 40 cycles at 94°C for 1 min, 52°C for 1m and 72°C for 1 min; iii) a final extension step at 72°C for 7 min (VILCEK et al., 2001)

The RT-PCR products were submitted to electrophoresis in 2% agarose gel stained with ethidium bromide (0.5 µg/mL) in TBE buffer pH 8.4 (89 mM Tris-HCl; 89 mM boric acid; 2 mM EDTA), at constant voltage (90 V) for approximately 45 min, and visualized under UV light.

Molecular Characterization

Initially, all RT-PCR products were purified using GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, Little Chalfont, UK), quantified in Qubit™ Fluorometer (Invitrogen Life Technologies, USA) and sequenced in MegaBACE™ 1000/Automated 96 Capillary DNA Sequence, Thermo Sequenase™ II DNA Polymerase and the DYEnamic™ ET Dye Terminator Kit (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) using the 372 and 103 primers according to the manufacturer's instructions. Sequence editing was performed with Phred and CAP3 softwares (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>) and the sequences were accepted if base quality was ≥ 20 . Identity searches were verified with sequences deposited in GenBank using the BLAST software (Basic Local Alignment Search Tool - <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). A multiple and pairwise alignments were realized in CLUSTAL W (version 1.4) using MEGA package version 4.1 software (<http://www.megasoftware.net/>) and sequence identity matrix using BioEdit software version 7.0.8.0 (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>). Phylogenetic tree based on the nucleotide was obtained using neighbor-joining method on the model Kimura two-parameter, using MEGA version 4.1 software. Bootstrap support values were determined for 1000 replications. Nucleotide distance was obtained using pairwise distance calculation on the model Kimura two-parameter, using MEGA version 4.1 software

Results

In the first sampling, 29 serum samples were positive on RT-PCR assay. In the second collection, performed six months later, two out of the 29 animals retested had serum samples positive for BVDV detection. Therefore, at the first sampling, 27 animals were considered as transiently infected (TI), while two were considered as PI animals, and called PI cow1 and PI cow2.

Between the two serum collections, 72 animals were born. From them, two calves presented positive samples. A week after the second sampling, one of the positive calves died with diarrhea and was called Dead calf. Twenty days later, it was performed the second collection of the alive calf and its serum sample was once more positive on RT-PCR. However, this calf was considered PI and called PI calf which was accompanied by additional 11 months, until being slaughtered.

Phylogenetic analysis of sequenced 5'UTR amplicons from blood sera was performed using 240 bp length sequenced of all isolates, and revealed that two PI animals (PI cow 1 and PI calf) were infected with BVDV-1b. However the PI cow 2 was harboring BVDV-1d, the calf that died was infected BVDV-1a (Table 1).

The analysis of the phylogenetic tree (Fig.1) showed that the positions of the strains in clusters are supported by statistical confidence values calculated using Mega v.4.1 software with 1000 replicates.

Discussion

The present study reports the presence of PI animals infected with different subgenotypes of BVDV in a single vaccinated dairy cattle herd.

The results of RT-PCR assay in the first sampling confirmed the active circulation of BVDV in the herd at that time. At least 4.1% of the animals (29/692) were in viremia, indicating that even more animals probably were infected in the herd. Since this was a herd regularly vaccinated against BVDV, a viral circulation was unexpected.

In the second serum collection, two out of the 29 animals previously positive on RT-PCR were confirmed as PI cows. Among the 72 recently born calves, one calf was classified as PI, whereas the dead calf remained as putative PI.

Considering the total number of animals in the herd ($n = 692$), the percentages of PI animals in the first moment was 0.29%, and subsequently increased to 0.43%, due to the birth of the PI calf. The prevalence of PI animals in infected cattle herds may vary from 0.5 to 2% (Houe, 1999). In dairy calves, Fulton et al. (2006) reported prevalence of 0.4%. In Brazil, Oliveira et al. (1996) screened cattle herds with reproductive problems and found 1.2% of PI animals.

In the first sampling, none young animal was positive for BVDV infection. The two PI animals identified belonged to the category of primiparous cows. In the second collection, a PI cow's offspring was diagnosed as a PI animal (PI calf), confirming the vertical transmission of the virus (LINDBERG; HOUE, 2005). The low percentage of PI animals could be justified because the herd management did not include breeding males. However the male calves were disposed of shortly after birth. The prevalence of PI animals with the adoption of this sort of management can be reduced by 50%.

The PI cow 1 was 50.3 month old had normal development (height x weight) for the age (Fig. 3). This animal was purchased with more than 2 years old, and had a

history of three calving, two male calves (discarded) and one female calf. When the PI cow 1 was sacrificed, it was 6 months pregnant with two female fetuses. We carried out RT-PCR on the fetuses tissues and obtained positive results for BVDV in all evaluated organs. Bases on this results, one could think that if these calves had been born, the percentage of PI animals would be higher in this herd.

The PI calf was born from the PI cow1, in the interval between the collections, and was approximately 30 days old in the second sampling of the herd (Fig. 4). To prevent infection of the other susceptible animals, this calf was maintained isolated on the farm. Curiously, its body development was very similar to the other animals of similar age. With 11 months age, it was also slaughtered.

The dead calf was also approximately 30 days old in the second sampling and died a week later with profuse diarrhea.

The PI cow 2 was 37.2 months old, and was bought pregnant over a year. Since it gave birth to a male calf, which was discarded, it failed to get pregnant again. This cow died 30 days after the second sampling with clinical symptoms of acute hemorrhagic dark diarrhea and with breathing difficulty. This animal died within 48 to 72 h after the onset of clinical disease. Despite the impossibility of conducting additional laboratory tests in this animal, the clinical presentation suggests that it has developed MD.

The vast majority of studies involving gentic typing of BVDV isolates describes the diversity of genotypes found in collections of strains (wild-strains) identified in a large region or country.

Differently from observations collected in several countries in which it has been showed the presence of a prevalent viral subgenotype in specific geographic regions, our result demonstrated a great diversity in BVDV types harbored by PI animals belonging to a single dairy cattle herd.

Similar results were found by Uttentahl (2005) who evaluated 36 isolates from 31 herds in Denmark where two subtypes, BVDV-1b and BVDV-1d, were found in two calves of same age in one of the herds. Toplak et al. (2004) also found a herd with four PI animals, three with BVDV-1f and one with BVDV-1d. The investigation showed that the latter genotype was introduced in the herd by purchase from another farm that had PI animals infected with BVDV-1d strain.

Phylogenetic analysis of sequences of 5'UTR obtained from the RT-PCR amplicons, revealed that viruses from two PI animals (PI cow1 and PI calf) clustered with BVDV subgenotype 1b representatives, sharing highest similarity (96%) with the Osloss

strain and the Brazilian wild-type strain UEL1/BR (LUNARDI et al., 2008), previously detected by our group in a outbreak of acute BVD in a beef cattle herd infection. The PI cow2 BVDV strain grouped with subgenotype 1d isolates, ranging from 96 – 97 % similarity with strains 16/111 to 97% and F respectively (VILCEK et al., 2001). BVDV from the Dead calf was similarity ranged from 92 - 93% with strains Trangie Y546 (AF049222), Bega (AF049221) and 94% with strain NADL (AJ133738). Phylogenetic analysis of sequences part of N^{pro} region revealed that virus from Dead calf was similarity ranged from 82 - 83% with strains Trangie Y546, Bega and 91% with strain NADL. So with this result and together with the phylogenetic tree analysis of this virus was classified as BVDV-1a.

One reason that could justify such variability of subtypes in the herd is its characteristic of being an open herd with frequent purchase of animals from other regions and farms. In this case, both PI cow 1 and PI cow 2 were bought from other cattle herds.

In others Brazilian studies, the subtype BVDV-1b was identified in some cases (CANAL et al., 1998; CORTEZ et al., 2005; FLORES et al., 2002; LUNARDI et al., 2008). Additionally, the subtype BVDV-1d was described only once by Vilcek et al. (2004).

The result of the analysis of the sequence from Dead calf BVDV amplicon demonstrated that a third subtype, BVDV-1a, was circulating in the herd. We believed that this calf could be a PI animal. This animal was the offspring of a cow purchased from the another farm and was negative for BVDV RT-PCR, but may have been infected in early pregnancy.

In this study, the 5'UTR sequence was employed for the identification of BVDV subgenotypes involved. This comparatively short intervening sequence permits rapid and accurate acquisition of sequence data, being an excellent sequence target for initial phylogenetic analysis of BVDV (MAHONY et al., 2005). Vilcek et al. (2001) clearly demonstrated that 5'UTR based studies give meaningful phylogenetic inferences. By sequencing both 5'UTR and N^{pro} regions, the analysis of these data sets phylogenetic reconstructions yielded identical results. But the virus identified in Dead Calf left doubts as to its position on the tree due to low bootstrap score, for that reason another phylogenetic tree was reconstructed from the N^{pro} region, where the position was well defined with subgenotype BVDV-1a (Fig. 2).

The evaluated herd was vaccinated every six months with a commercial inactivated vaccine with BVDV-1a NADL strain. The fact of having found the virus BVDV-1a can be justified by the purchase of a pregnant cow who probably became infected in the herd of origin and developed a PI fetus who was born in the evaluated herd. On the other

hand, the finding of PI animals in a herd regularly vaccinated is disturbing, leading one to question whether such vaccine would help in the protection of cattle herds.

Several research groups are studying the protection provided by the vaccine containing NADL strain (BVDV-1a), inactivated or modified live, against challenges with other genotypes (CORTESE et al., 1998; KOVACS et al., 2003; GROOMS, 2004; FICKEN et al., 2006). Most studies also focus on cross protection between genotypes BVDV-1 and BVDV-2, and the results vary depending on the type of vaccine; and type, time and period of exposure of the challenge. But even in such studies, there are some interesting results that raise doubts. In the study by Bolin (2009), in the USA where genetically characterized isolates of BVDV PI calves born from dams vaccinated before breeding against BVDV with the modified-live virus vaccine contain the genotype 1, subtype 1a BVDV-NADL. The author ranked the PI in subgroups BVDV-1b and BVDV-2a, and concludes that finding the genogroup BVDV-1b in PI calves born from dams vaccinated with the genogroup BVDV-1a supports the concept that future vaccines for BVDV should contain viruses representing all viral genotypes and genogroups to be maximally effective. Ridpath (2003) also suggests that there are significant biological and clinical differences between different BVDV subgenotypes.

In Brazil, many strains were isolated, but there is little information regarding antigenic and genotypic characteristics of these national isolates (CORTEZ et al., 2005). There is no doubt that the accumulation of data on the genotyping of field isolates of BVDV contribute to a better understanding of the evolution of this virus and the molecular epidemiology of infection. The definition of the most prevalent genotypes also had a positive impact on the development of diagnostic methods more sensitive and specific, and especially in developing more effective vaccines to control infection. Our results increase the discussion on immunity against diverse viral subtypes, and speculates on the ineffectiveness of the vaccine in herds with PI animals.

This study demonstrates the importance of, against the presence of reproductive problems caused by BVDV in a herd, make use of molecular diagnostic tools for identifying PI animals that are probably part of the herd. Since the regular use of inactivated vaccines may not be effective to prevent the emergence of such animals and reduce the economic losses determined by clinical signs, the need for diagnosis is made clear.

Table 1 – Description of animals evaluated.

Animal	Age (month)	Origin	Outcome	BVDV Isolated
PI Cow1	50.3	bought from another herd	slaughtered	1b
PI Cow2	37.2	Bought from another herd	The animal presented a dark diarrhea, and probably died due to mucosal disease.	1d
PI Calf	1	Calf from the PI Cow1	Was isolated in the farm. The animal had normal development (height x weight) for the age. With 11 months/age was slaughtered.	1b
Dead Calf	1	RT-PCR negative Cow's offspring	The calf died with the 45 days of age due to diarrhea.	1a

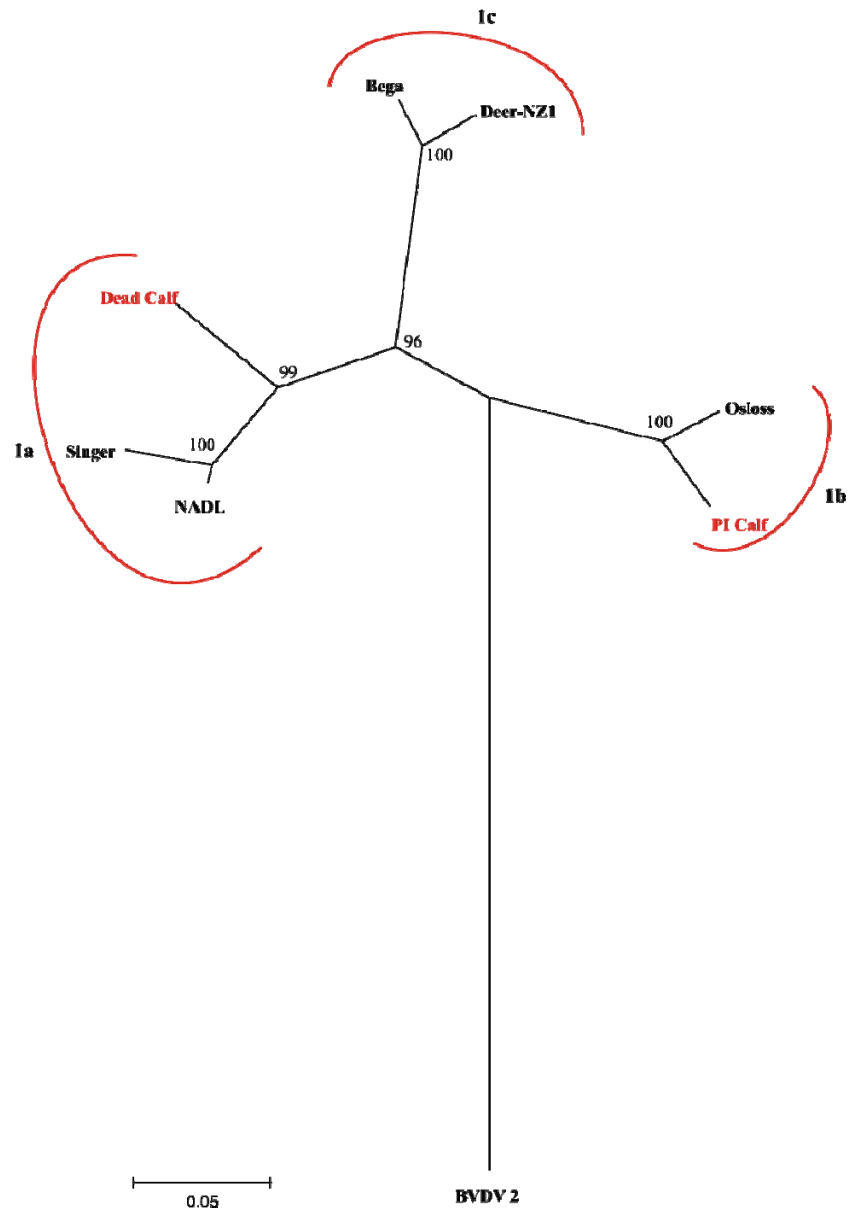


Figure 2 – Phylogenetic tree showing typing of BVDV-1 strains in N^{pro} region. The isolate from Dead Calf can be grouped in subgenotype BVDV-1a branch with high bootstrap score. The tree was prepared using 397 nucleotides of evaluated BVDV, using neighbor-joining algorithm with Kimura 2-parameters. Phylogenetic groups are labeled according to Vilcek et al. (2001) and Flores et al. (2002). Statistical confidence values calculated using Mega v.4.1.software with 1000 replicates.



Figura 3 – PI cow1. The arrow indicates the animal.



Figura 4 – PI Calf. The arrow indicates the animal.

REFERENCES

- ALFIERI, A. A. et al. Frequency of group a rotavirus in diarrhoeic calves in Brazilian cattle herds, 1998-2002. *Tropical Animal Health and Production*, v.38, p.521-526, 2006.
- ARIAS, P. et al. Genetic heterogeneity of bovine viral diarrhoea viruses from Spain. *Veterinary Microbiology*, v.96, p.327-336, 2003.
- BAKER, J. C. The clinical manifestations of bovine viral diarrhoea infection. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v.11, n.3, p.425-445, 1995.
- BECHER, P. et al. Genetic and antigenic characterization of novel pestivirus genotypes: implications for classification. *Virology*, v.311, n.1, p.96-104, 2003.
- BOLIN, S. R. et al. Genetic characterization of bovine viral diarrhoea viruses isolated from persistently infected calves born to dams vaccinated against bovine viral diarrhoea virus before breeding. *American Journal of Veterinary Research*, v.70, n.1, p.86-91, 2009.
- BROCK, K. V. The persistence of bovine viral diarrhoea virus. *Biologicals*, v.31, p.133-135, 2003.
- BROWNLIE, J.; CLARKE, M. C.; HOWARD, C. J. Clinical and experimental mucosal disease – defining a hypothesis for pathogenesis. In: HARKNESS, J. W. (Ed.). *Pestivirus Infections of Ruminants*. Brussels: CEC, p.147-156, 1985.
- CANAL, C. W. et al. Detection of antibodies to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and characterization of genomes of BVDV from Brazil. *Veterinary Microbiology*, v.63, p.85-97, 1998.
- CIULLI, S. et al. Genetic typing of bovine viral diarrhoea virus: evidence of an increasing number of variants in Italy. *New Microbiologica*, v.31, p.263-271, 2008.
- CORIA, M. F.; MCCLURKIN, A. W. Specific immune tolerance in an apparently healthy bull persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.172, p.449-51, 1978.
- CORIA, M. F.; SCHMERR, M. J. F.; MCCLURKIN, A. W. Characterization of the major structural proteins of purified bovine viral diarrhoea virus. *Archives of Virology*, v.76, p.336, 1983.
- CORTESE, V. S. et al. Protection of pregnant cattle and their fetuses against infection with bovine viral diarrhoea virus type 1 by use of a modified-live virus vaccine. *American Journal of Veterinary Research*, v.59, n.11, p.1409-13, 1998.
- CORTEZ, A. et al. Genetic characterization of Brazilian bovine viral diarrhoea virus isolates by partial nucleotide sequencing of the 5'-UTR region. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.26, p.211-216, 2005.
- FALCONE, E. et al. Genetic heterogeneity of bovine viral diarrhoea virus in Italy. *Veterinary Research Communications*, v.27, p.485-494, 2003.

FICKEN, M. D.; ELLSWORTH, M. A.; TUCKER, C. M. Evaluation of the efficacy of a modified-live combination vaccine against bovine viral diarrhoea virus types 1 and 2 challenge exposures in a one-year duration-of-immunity fetal protection study. *Veterinary therapeutics: research in applied veterinary medicine*, v.7, n.3, p. 283-94, 2006.

FLORES, E. F. et al. Phylogenetic analysis of Brazilian bovine viral diarrhoea virus type 2 (BVDV-2) isolates: evidence for a subgenotype within BVDV-2. *Virus Research*, v.87, p.51–60, 2002.

FULTON, R. W. et al. Bovine viral diarrhoea virus antigenic diversity: impact on disease and vaccination programs. *Biologicals*, v.31, p.89-95, 2003.

FULTON, R. W. et al. Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) subgenotypes in diagnostic laboratory accessions: Distribution of BVDV1a, 1b, and 2a subgenotypes. *Veterinary Microbiology*, v.111, p.35–40, 2005.

FULTON, R. W. et al. Challenge with Bovine viral diarrhoea virus by exposure to persistently infected calves: protection by vaccination and negative results of antigen testing in nonvaccinated acutely infected calves. *Canadian Journal of Veterinary Research*, v.70, n.2, p.121-7, 2006.

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

HIBBERD, R. C.; TURKINGTON, A.; BROWNLIE, J. Fatal bovine viral diarrhoea virus infection of adult cattle. *The Veterinary Record*, v.132, n.9, p.227, 1993.

HOUE, H. Survivorship of animals persistently infected with bovine virus diarrhoea virus (BVDV). *Preventive Veterinary Medicine*, v.15, p.275-283, 1993.

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

JAKOVA, A. et al. The extended genetic diversity of BVDV-1: Typing of BVDV isolates from France. *Veterinary Research Communications*, v.32, p.7-11, 2008.

JONES, L. R.; ZANDOMENI, R.; WEBER, E. L. Genetic typing of bovine viral diarrhoea virus isolates from Argentina. *Veterinary Microbiology*, v.81, p.367-375, 2001.

KOVÁCS, F. et al. The live attenuated bovine viral diarrhoea virus components of a multi-valent vaccine confer protection against fetal infection. *Veterinary Microbiology*, v.96, n.2, p.117-31, 2003.

LINDEBERG, A.; HOUE, H. Characteristics in the epidemiology of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) of relevance control. *Preventive Veterinary Medicine*. v.72, p.55-73, 2005.

LUNARDI, M. et al. Outbreak of acute bovine viral diarrhoea in Brazilian beef cattle: clinicopathological findings and molecular characterization of a wild-type BVDV strain subtype 1b. *Research in Veterinary Science*, v.85, n.3, p.599-604, 2008.

- MAHONY, T. J. et al. Genetic analysis of bovine viral diarrhoea viruses from Australia. *Veterinary Microbiology*, v.106, n.1-2, p.1-6, 2005.
- MATSUNO, K. et al. Genetic and Pathobiological characterization of bovine diarrhoea viruses recently isolated from cattle in Japan. *The Journal of veterinary medical science*, v.69, p.515-520, 2007.
- MEYERS, G. et al. Rearrangement of viral sequences in cytopathogenic pestiviruses. *Virology*, v.191, n.1, p.368-386, 1992.
- MEYERS, G.; THIEL, H. J. Molecular characterization of pestivirus. *Advances in Virus Research*, v.47, p.53-118, 1996.
- MISHRA, N. et al. Genetic typing of bovine viral diarrhoea virus isolates from India. *Veterinary Microbiology*, v.104, p.207-212, 2004.
- OLIVEIRA, L. G.; OLIVEIRA, E. A. S.; SILVA, L. H. T. Presença de pestivírus e anticorpos contra pestivírus em soros e cultivos celulares. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.48, p.513-521, 1996.
- PELLERIN, C. et al. Identification of a new group of bovine viral diarrhoea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. *Virology*, v.203, p.260-268, 1994.
- PETERHANS, E.; JUNGI, T. W.; SCHWEIZER, M. BVDV and innate immunity. *Biologicals*, v.31, p.107-111, 2003.
- PETERHANS, E.; SCHWEIZER, M. Pestiviruses: how to outmaneuver your hosts. *Veterinary Microbiology*, v.142, p.18-25, 2010.
- PILZ, D.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Comparison of different protocols for the bovine viral diarrhoea virus detection by RT-PCR in pools of whole blood and blood serum artificially contaminated. *Semina, Ciência Agrárias*, v.26, p.219-228, 2005.
- RADOSTITS, O. M.; LITTLEJOHNS, I. R. New concepts in the pathogenesis, diagnosis and control of diseases caused by the bovine viral diarrhoea virus. *The Canadian Veterinary Journal*, v.29, p.513-528, 1988.
- RIDPATH, J. F. BVDV genotypes and biotypes: practical implications for diagnosis and control. *Biologicals*, v.31, n.2, p.127-131, 2003.
- RIDPATH, J. F. Classification and molecular biology. Goyal SM, Ridpath JF, editors. *Bovine viral diarrhoea virus: diagnosis, Management and Control*. Ames (IA): Blackwell Publishing, 2005. cap.3, p.65-80.
- STAHL, K. et al. Molecular epidemiology of bovine viral diarrhoea during the final phase of the Swedish BVD-eradication programme. *Preventive Veterinary Medicine*. v.72, n.1-2, p.103-8; discussion 215-9, 2005.
- STAHL, K. et al. Genetic diversity of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) from Peru and Chile. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.29, n.1, p.41-44, 2009.

TAJIMA, M. et al. Prevalence of genotypes 1 and 2 of bovine viral diarrhoea virus in Lower Saxony, Germany. *Virus Research*, v.76, p.31–42, 2001.

TOPLAK, I. et al. Genetic typing of bovine viral diarrhoea virus: most Slovenian isolates are of genotypes 1d and 1f. *Veterinary Microbiology*, v.99, p.175-185, 2004.

UTTENTHAL, A. et al. Persistent BVDV infection in mousedeer infects calves Do we know the reservoirs for BVDV?. *Preventive Veterinary Medicine*, v.72, p.87-91, 2005.

VILCEK, S. et al. Genetic typing of bovine pestiviruses from England and Wales. *Veterinary Microbiology*, v.69, p.227-237, 1999.

VILCEK, S. et al. Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups. *Archives of Virology*, v.146, n.1, p.99–115, 2001.

VILCEK, S. et al. Genetic diversity of international bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates: identification of a new BVDV-1 genetic group. *Veterinary Research*, v.35, p.609–615, 2004.

WEINSTOCK, D.; BHUDEVI, B.; ANTHONY, E. C. Single-tube single-reverse transcriptase PCR assay for detection of bovine viral diarrhoea virus in pooled bovine serum. *Journal of Clinical Microbiology*, v.39, p.343–346, 2001.

ZIMMER, G. M. et al. Failure of foetal protection after vaccination against an experimental infection with bovine virus diarrhoea virus. *Veterinary Microbiology*, v.89, p.255-265, 2002.

4 CONCLUSÕES

1- O controle pleno da infecção pelo BVDV em rebanho bovino leiteiro considerado aberto é difícil de ser obtido.

2- Mais que um subgenótipo de BVDV pode estar infectando, simultaneamente, o mesmo rebanho bovino;

3- Existe a necessidade de mais estudos envolvendo a caracterização antigênica e genotípica de isolados de BVDV nacionais, pois o acúmulo de dados contribuirá para compreensão da evolução desse vírus e epidemiologia molecular da infecção;

4- A definição de subtipos de BVDV prevalentes no país auxiliará no desenvolvimento de métodos de diagnósticos mais sensíveis e específicos e, principalmente, na elaboração de vacinas mais eficazes para o controle da infecção.

APÊNDICES

APÊNDICE A
Lista de Reagentes

1. 100 mM dNTP Set, 4 x 250 µL; 25 µmol each (100 mM dATP Solution, 100 mM dCTP Solution, 100 mM dGTP Solution, 100 mM dTTP Solution) (Invitrogen Life Technologies®)
2. 10 x PCR-Buffer (200 mM Tris-HCl, pH 8.4, 500 mM KCl) (Invitrogen Life Technologies®)
3. 123 bp DNA Ladder (Invitrogen Life Technologies®)
4. 2-Mercapto-ethanol (C₂H₆O₅) P.M. 78,13 (Fluka®)
5. Acetona, P.A. (CH₃COCH₃) P.M. 58,08 (Dinâmica®)
6. Ácido acético glacial, P.A. (CH₃COOH) P.M. 60,05 (Nuclear®)
7. Ácido bórico (H₃BO₃) P.M. 61,83
8. Ácido clorídrico (HCl) P.M. 36,46 (Reagen®)
9. Ácido etilenodiaminotetraácido Sal di-sódico – EDTA, P.A. (C₁₀H₁₄N₂O₈Na₂2H₂O) P.M. 372,24 (Reagen®)
10. Agarose (Gibco BRL®)
11. Álcool etílico absoluto (C₂H₂OH) P.M. 46,07 (Nuclear®)
12. Álcool isoamílico ((CH₃)₂C_HC_H2CH₂OH) P.M. 88,15 (Synth®)
13. Azul de bromofenol (Sigma®)
14. Cloreto de Potássio, P.A. (KCl) P.M. 74,56 (Reagen®)
15. Cloreto de Sódio, P.A. (NaCl) P.M. 58,45 (Reagen®)
16. Clorofórmio, P.A. (CHCl₃) P.M. 119,38 (Dinâmica®)
17. Dodecil Sulfato de Sódio – Lauril Sulfato de Sódio – SDS (C₁₂H₂₅NaO₄S) P.M. 288,38 (Synth®)
18. Ethidium bromide (C₂₁H₂₀N₃Br) P.M. 394,3 (Sigma®)
19. Guanidine isothiocyanate P.M. 118,16 (Gibco BRL®)
20. Hidróxido de Sódio, P.A. (NaOH) P.M. 40,00 (Dinâmica®)
21. Hidroximetil amino metano – TRIS 99% P.M. 121,14 (Inlab®)
22. Metanol, P.A. (CH₃OH) P.M. 32,04 (Allkimia®)
23. *Platinum* Taq DNA Polymerase recombinant 500 units (
24. M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus) Reverse Transcriptase (RT) 200,000 units (Invitrogen Life Technologies®)
25. *Silicon dioxide* (SiO₂) P.M. 60,08 (Sigma®)

APÊNDICE B

Soluções e Tampões

- **Hidratação da sílica**
 - 60 g de sílica (SIGMA[®])
 - Adicionar 500 mL de água MilliQ autoclavada
 - Agitar lentamente e manter em repouso durante 24 hs
 - Por sucção, desprezar 430 mL do sobrenadante
 - Ressuspender a sílica em 500 mL de água bidestilada
 - Manter em repouso durante 5 h para sedimentar
 - Desprezar 440 mL do sobrenadante
 - Adicionar 600 µL de HCl para ajustar o pH (pH 2,0)
 - Aliquotar e autoclavar
- **Solução L6**
 - 120 g de isotiocianato de guanidina (GUSCN)
 - 100 mL de TRIS-HCl 0,1 M pH 6,4
 - 22 mL de EDTA 0,2 M pH 8,0
 - 2,6 mL de Triton x-100
- **Solução L2**
 - 120 g de tiocianato de guanidina (GUSCN)
 - 100 mL de TRIS-HCl 0,1 M pH 6,4
- **Tampão de Amostra**
 - Azul de bromofenol 0,25%
 - Sacarose – sucrose (C₁₂H₂₂O₁₁) 45%
- **Tampão de corrida: TBE (TRIS – Ácido bórico – EDTA) 10 x []**
 - 0,89 M TRIS
 - 0,89 M ácido bórico
 - 0,02 M EDTA dissodium
 - Água bidestilada 1L qsp.

pH 8,4

- **Tampão fosfato salina (PBS)**

- 137 mM cloreto de sódio (NaCl)
- 3 mM cloreto de potássio (KCl)
- 8 mM fosfato de sódio dibásico (Na₂HPO₄)
- 15 mM fosfato de potássio monobásico (K₂H₂PO₄)
- Água MilliQ autoclavada 1L q.s.p.

pH 7,2

- **Oligonucleotídeos**

-103 sense - 5' tag cca tgc cct tag tag gac 3' (nt 103–124)

Concentração - 41,26 nm; Lote 5119111 023N04 (Invitrogen Life Technologies®)

- 372 anti-sense - 5' act cca tgt gcc atg tac agc 3' (nt 392–372)

Concentração - 40,96 nm; Lote 5119111 023N03 (Invitrogen Life Technologies®)

-BD1 sense - 5' tct ctg ctg tac atg gca cat g 3' (nt 367–388)

Concentração - 20,84 nm; Lote 156213 F02 (Invitrogen Life Technologies®)

- BD3 anti-sense - 5' cca tct atr cac aca taa atg tgg t 3' (nt 797–771)

Concentração - 17,45 nm; Lote 156213 F03 (Invitrogen Life Technologies®)

- **Preparação dos oligonucleotídeos**

Eluição do primer liofilizado para concentração final de 200 pmol (primer mãe):

$\frac{\text{Concentração em nm} \times 1000}{200 \text{ pmol}} = \text{volume em } \mu\text{l de água MilliQ a ser adicionado}$

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

$C_i \times V_i = C_f \times V_f$

103 sense → $\frac{41,26 \text{ nm} \times 1000}{200 \text{ pmol}} = 206,3 \mu\text{l}$ (primer mãe a 200 pmol)

$$\rightarrow 200 \times V_i = 20 \times 100 \rightarrow V_i = 10 \mu\text{l}$$

Diluir 10 μl de primer mãe em 90 μl de água MilliQ para uso.

$$\text{- 372 anti-sense} \rightarrow \frac{40,96 \text{ nm} \times 1000}{200 \text{ pmol}} = 204,8 \mu\text{l} \text{ (primer mãe a 200 pmol)}$$

$$\rightarrow 200 \times V_i = 20 \times 100 \rightarrow V_i = 10 \mu\text{l}$$

Diluir 10 μl de primer mãe em 90 μl de água MilliQ para uso.

$$\text{- BD1 sense} \rightarrow \frac{20,84 \text{ nm} \times 1000}{200 \text{ pmol}} = 104,2 \mu\text{l} \text{ (primer mãe a 200 pmol)}$$

$$\rightarrow 200 \times V_i = 20 \times 100 \rightarrow V_i = 10 \mu\text{l}$$

Diluir 10 μl de primer mãe em 90 μl de água MilliQ para uso.

$$\text{- BD3 anti-sense} \rightarrow \frac{17,45 \text{ nm} \times 1000}{200 \text{ pmol}} = 87,25 \mu\text{l} \text{ (primer mãe a 200 pmol)}$$

$$\rightarrow 200 \times V_i = 20 \times 100 \rightarrow V_i = 10 \mu\text{l}$$

Diluir 10 μl de primer mãe em 90 μl de água MilliQ para uso.

APÊNDICE C

Kits

- Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit (GE Healthcare, Little Chalfont, UK)
- DYEnamic ET dye terminator cycle sequencing kit (GE Healthcare, Little Chalfont, UK)

APÊNDICE D
Protocolo de Técnicas

- **Extração do RNA pela técnica álcool isoamílico - sílica / isotiocianato de guanidina**
 - Adicionar 50 µL de soro em microtubo tipo eppendorf
 - Adicionar 25 µL de sílica hidratada
 - Adicionar 200 µL de solução L6
 - Homogeneizar em vórtex
 - Agitar durante 30 min em temperatura ambiente
 - Centrifugar a 10.000 x g / 30 s
 - Desprezar o sobrenadante em solução contendo NaOH 10 M
 - Adicionar 200 µL de solução L2
 - Homogeneizar em vórtex
 - Centrifugar a 10.000 x g / 30 s
 - Desprezar o sobrenadante em solução contendo NaOH 10M
 - Adicionar 200 µL de solução L2
 - Homogeneizar em vórtex
 - Centrifugar a 10.000 x g / 30 s
 - Desprezar o sobrenadante em solução contendo NaOH 10M
 - Adicionar 500 µL de etanol 70% a -20°C
 - Homogeneizar em vórtex
 - Centrifugar a 10.000 x g / 30 s
 - Desprezar o sobrenadante
 - Adicionar 500 µL de etanol 70% a -20°C
 - Homogeneizar em vórtex
 - Centrifugar a 10.000 x g / 30 s
 - Desprezar o sobrenadante
 - Adicionar 1.000 µL de acetona PA a -20°C
 - Homogeneizar em vórtex
 - Centrifugar a 10.000 x g / 2 min
 - Desprezar o sobrenadante
 - Secar o pellet em banho-maria a 56°C / 15 min

- Adicionar 50 μ L de água milliQ autoclavada
 - Homogeneizar em vórtex
 - Incubar em banho-maria à 56°C / 15 min
 - Homogeneizar em vórtex
 - Centrifugar a 10.000 x g / 2 min
 - Recolher o sobrenadante
 - Estocar a -20°C
- **Gel de agarose a 2%**
 - 1 g de agarose
 - 50 mL TEB 1 x
 - 30 μ L de brometo de etídio
- **Purificação de produto de PCR excisado do gel utilizando - *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit (GE Healthcare, Little Chalfont, UK)***
 1. Pesar o fragmento excisado do gel em microtubo de 1,5 mL.
 2. Adicionar 10 μ L do *Capture buffer type 2* para cada 10 mg de gel.
 3. Incubar o tubo a 60°C / 15 min, homogeneizando a cada 3 min.
 4. Centrifugar a 16.000 x g/30s
 5. Transferir 600 μ L da amostra com o *Capture buffer type 2* em um tubo coletor com coluna
 6. Incubar em temperatura ambiente por 1 min
 7. Centrifugar a 16.000 x g/30s
 8. Descartar o filtrado e recolocar a coluna no mesmo tubo.
 9. Adicionar 500 μ L do *Wash buffer type 1* na coluna com tubo coletor
 10. Centrifugar a 16.000 x g/30s
 11. Descartar o filtrado e transferir a coluna para um microtubo de 1,5 mL.
 12. Adicionar 30 μ L do *Elution buffer type 6*
 13. Incubar a temperatura ambiente por 1 min.
 14. Centrifugar a 16.000 x g/1 min.
 15. Estocar o DNA purificado em -20°C.

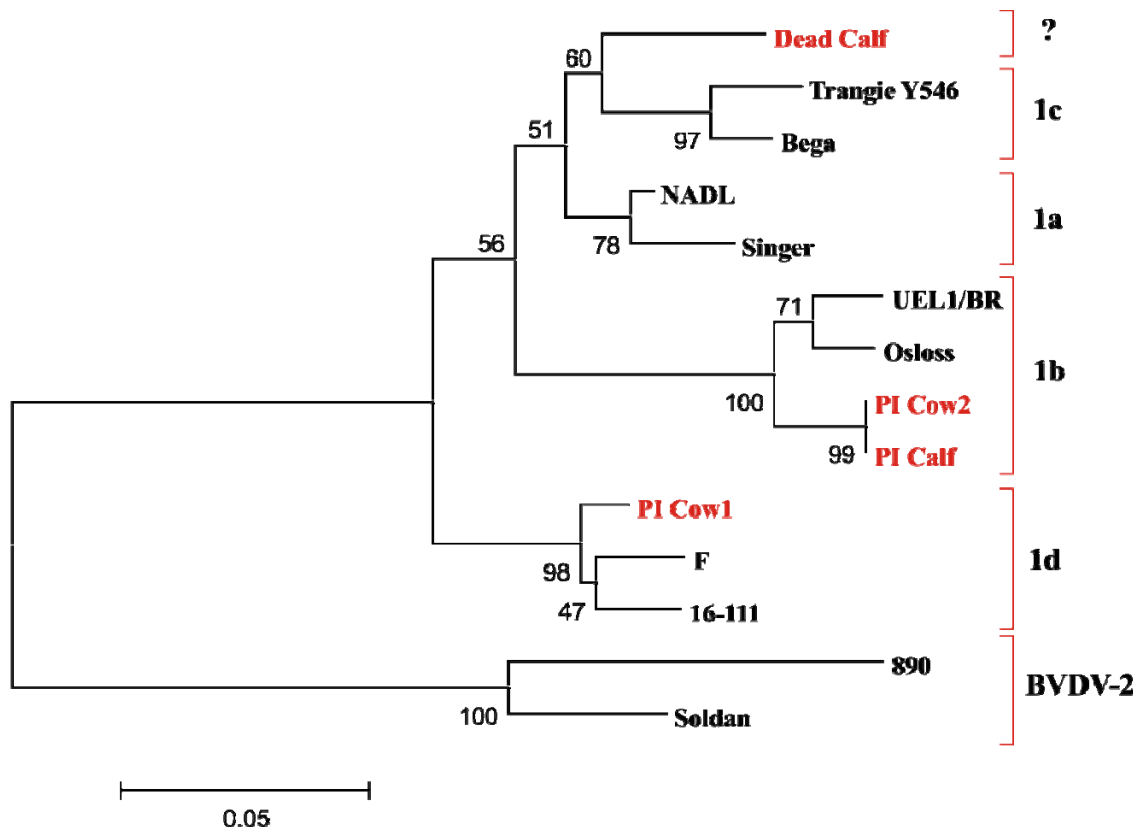
- **Quantificação de produto de PCR em QubitTM fluorometer (InvitrogenTM Life Technologies, EUA)**

1. Preparar a solução *Quant-iTTM Working Solution* diluindo o reagente *Quant-iTTM* no *Buffer Quant-iTTM*, 1:200. São necessários 200 μL desta solução por amostra e para os padrões 0 e 100.
2. Homogeneizar em vórtex.
3. No microtubo das amostras adicionar 198 μL da solução *Quant-iTTM Working Solution* a 2 μL do DNA purificado.
4. No microtubo do padrão 0 adicionar 190 μL da solução *Quant-iTTM Working Solution* a 10 μL do padrão 0.
5. No microtubo do padrão 100 adicionar 190 μL da solução *Quant-iTTM Working Solution* a 10 μL do padrão 100.
6. Homogeneizar os microtubos em vórtex por 2-3 s
7. Incubar os microtubos em temperatura ambiente por 2 min
8. Realizar a leitura usando *QubitTM fluorometer (InvitrogenTM Life Technologies, EUA)*
9. Multiplicar pelo fator de diluição para determinar a concentração correta da amostra.

ANEXOS

ANEXO A

Árvore filogenética da região 5'UTR, idêntica à demonstrada no artigo para publicação em formato tradicional retangular.



ANEXO B

Árvore filogenética da região N^{pro}, idêntica à demonstrada no artigo para publicação em formato tradicional retangular.

