



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

WAGNER BORGES RODRIGUES

**PERFIL DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA DIARREIA VIRAL
BOVINA EM UMA UNIDADE DE CRIAÇÃO DE BEZERRAS
LEITEIRAS**

WAGNER BORGES RODRIGUES

**PERFIL DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA DIARREIA VIRAL
BOVINA EM UMA UNIDADE DE CRIAÇÃO DE BEZERRAS
LEITEIRAS**

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

Orientadora: Profa. Dra. Alice Fernandes Alfieri

Londrina
2014

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

R696p Rodrigues, Wagner Borges.
Perfil da infecção pelo vírus da diarreia viral bovina em uma unidade de criação de bezerras leiteiras / Wagner Borges Rodrigues. – Londrina, 2014.
55 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, 2014.
Inclui bibliografia.

1. Diarreia em bovino – Teses. 2. Bovino de leite – Vírose – Teses. 3. Bovino de leite – Doenças – Teses. 4. Reação em cadeia de polimerase – 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

WAGNER BORGES RODRIGUES

**PERFIL DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA
EM UMA UNIDADE DE CRIAÇÃO DE BEZERRAS LEITEIRAS**

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

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Celso Koetz Junior
Universidade Norte do Paraná – UNOPAR

Prof. Selwyn Arlington Headley
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 28 de fevereiro de 2014.

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 (Área de Concentração: Sanidade Animal) pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, sob orientação da Profa. Dra. Alice Fernandes Alfieri

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

1. CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico / MCT
2. CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior / MEC
3. FAP/PR: Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná / SETI
4. FINEP: Financiadora de Estudos e Projetos / MCT

DEDICO

A minha mãe Edna Rodrigues
Aos meus irmãos Léia e William
Aos meus sobrinhos Eric e Marco Aurélio
E a minha avó materna Maria da Consolação

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela vida, pela saúde e pela oportunidade de realizar esse trabalho.

À minha amada mãe por todo seu amor, carinho, apoio e esforços dedicados a minha formação. Obrigado por ser essa mãe maravilhosa.

Aos meus queridos orientadores Prof^a. Alice e Prof^o. Amauri pela orientação, pela oportunidade e por confiarem no meu trabalho na residência e agora no mestrado.

Aos membros da banca de qualificação Prof^a Karina Keller Marques da Costa Flaiban Prof^o Selwyn Arlington Headley por aceitarem o convite e pelas importantes considerações.

Aos membros da banca de defesa Prof^o Celso Koetz Junior e Prof^o Selwyn Arlington Headley pela disponibilidade e por aceitarem o convite

A todo corpo docente do programa de Residência em Medicina Veterinária Preventiva e da pós-graduação em Ciência Animal pela formação científica.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de Mestrado.

À Elis Lorenzetti e Juliane Ribeiro pelo carinho, pelos ensinamentos, pelos esclarecimentos das dúvidas constantes por sempre se preocuparem comigo. Obrigado pela atenção e pela amizade.

À Flávia Possatti pela parceria no mestrado pela amizade, pelo carinho, por também sempre cuidar de mim, pelos conselhos e pelos desabafos.

À Brígida K. de Alcântara, Ana Paula da Silva e ao Victor Henrique S. de Oliveira pelos momentos de descontração, pelos bons finais de semana na NY e pelas nossas reuniões gastronômicas que sempre foram as melhores. Obrigado pela amizade.

À Michele Lunardi por todo carinho, pela confiança, por toda descontração durante o trabalho. Aprendi muito e me diverti com você, obrigado por me receber tão bem no grupo Papilomavírus.

Aos amigos Alberto Sakata e Pâmela Sakata e Valeksa por serem tão queridos e atenciosos comigo. Obrigado pelos momentos de Jogos, Lanches no Arnaldo's e Chá das 5.

À Cristiane pelo amor de mãe, obrigado pela sua presença na minha vida desde o dia em que cheguei a Londrina no meu estágio curricular. Obrigado por me acolher nos corredores do DMPV, por se preocupar e cuidar de mim.

À Dégila da Costa Cruz, pela parceira, apoio, confiança, obrigado por sempre elevar minha estima, por me incentivar a crescer como pessoa e profissional, por se importar e acreditar em mim. E muitíssimo obrigado por me apresentar amigos tão queridos como a Cynthia Fraga, o Flávio Souza e o Vitor Hugo Oliveira.

À Cynthia Fraga pelos momentos engraçados, pelos programas caseiros de fim de semana, por todo carinho e atenção. Sua amizade foi crucial pra mim nesse ano que passou. Obrigado!

Aos queridos e divertidos Flavio Souza e Vitor Hugo Oliveira, pelo companheirismo. Obrigado por alegrar meus dias.

À Fernanda Dieckman pelo bom-humor, por ser tão divertida e por sempre me fazer bem desde os tempos da residência. Obrigado pelo carinho e amizade.

Aos meus amados e eternos amigos do Tocantins, no qual jamais poderia deixar de agradecer. Júnior Silva, João Marcos P. Coelho, Douglas Adanikis, Jaislane Braz, Taiã Ribeiro, Kelly Maia, Lindalva Eufrázio, Adriano Malaquis e Tonny. Obrigado pelo amor de vocês mesmo a milhas de distância, pelo apoio, por acreditarem em mim e por sempre manterem contato. Meu eterno e profundo obrigado.

*“...-Que quer dizer cativar?
-É algo quase sempre esquecido - disse a raposa. Significa “criar laços”
...Se tu me cativas, minha vida será como que cheia de sol...
Tu te tornas eternamente responsável por aquilo que cativas.”*

O pequeno Príncipe

RODRIGUES, W.B. **Perfil da infecção pelo vírus da diarreia viral bovina em uma unidade de criação de bezerras leiteiras.** 2014. 55 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2014.

RESUMO

O perfil da infecção pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV) foi avaliado em uma unidade de criação de bezerras leiteiras localizada na região Oeste do estado do Paraná, Brasil. A unidade de criação recebia bezerras, sem raça definida, provenientes de pequenos rebanhos leiteiros em sistema de produção familiar. As bezerras chegavam à unidade com 2 a 5 dias de idade e eram mantidas em baias coletivas com capacidade para até 25 animais. Excetuando-se o controle compulsório de brucelose e tuberculose o manejo sanitário em cada rebanho de origem não era monitorado. Como a infecção pelo BVDV pode ocasionar o nascimento de animais persistentemente infectados (PI) e nenhum dos rebanhos empregava qualquer medida sanitária para o controle dessa infecção o BVDV foi selecionado como modelo de estudo. Com o objetivo de avaliar a frequência da infecção pelo BVDV nos animais mantidos na unidade foram conduzidos dois experimentos independentes sendo um longitudinal e outro transversal. Em ambos os estudos a identificação de viremia pelo BVDV foi realizada pela técnica de RT-PCR a partir da amplificação da região não traduzida (5'UTR) do genoma viral em amostras de sangue. No estudo longitudinal, um grupo de 59 bezerras foi monitorado nos dias 1, 26 e 74 com o objetivo de identificar bezerras PI. Na primeira avaliação todos os animais ($n=59$) foram amostrados e nas avaliações subsequentes apenas os animais positivos, ou transitoriamente infectados (TI), nos exames anteriores. No estudo transversal, realizado 44 dias após a conclusão do estudo longitudinal, a infecção pelo BVDV foi monitorada por meio da avaliação de 82 bezerras que ingressaram na unidade de criação após o início do estudo anterior. No estudo longitudinal o RNA do BVDV foi identificado no sangue de 22 (37,3 %), 11 (18,6 %) e 3 (5,1 %) bezerras na primeira, segunda e terceira coletas, respectivamente. Das 82 bezerras incluídas no estudo transversal a viremia pelo BVDV foi identificada em 39 (47,6%) amostras de sangue. O sequenciamento e análise filogenética dos produtos da RT-PCR identificaram os subgenótipos BVDV-1a e 1b nos animais PI e TI. Os resultados tanto do estudo longitudinal quanto do transversal demonstram que a introdução e permanência de animais PI com o BVDV em unidades de criação de bezerras é responsável pela manutenção da alta proporção de animais virêmicos (TIs) e disseminação da infecção. Paralelamente, os resultados desse estudo sugerem ainda que, assim como a pecuária leiteira de alta produção, também a pequena produção familiar pode ser impactada com essa importante infecção viral.

Palavras-chave: BVDV. Bovinos. RT-PCR. PI. Subgenótipos.

RODRIGUES, W.B. **Infection profile of bovine viral diarrhea virus in a dairy calf rearing unit.** 2014. 55 p. Dissertation (Master's Degree in Animal Science) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2014.

ABSTRACT

The profile of bovine viral diarrhea virus (BVDV) infection was evaluated in a dairy calf rearing unit located in the West region of Paraná state, Brazil. The rearing unit received mixed breed female calves from 45 small dairy herds of household production. Calves arrived at the unit with 2-5 days of age and were kept a collective barn with up to 25 animals. Except for the compulsory control of brucellosis and tuberculosis the health management in each herd was not monitored. Since the BVDV infection might cause the birth of persistently infected (PI) calves and no of the dairy herds has been vaccinated for the control and prevention of this virus, the BVDV infection was chosen as a study model. In order to assess the frequency of BVDV infection in the animals kept in the unit, two independent experiments, one longitudinal and other cross-sectional were conducted. In both surveys, a RT-PCR assay was performed that targeted untranslated region (5'UTR) of BVDV genome in blood samples of calves to identify BVDV viremia. In the longitudinal study a group of 59 calves was monitored on day 1, 26, and 74 in order to identify PI calves. In the first evaluation all calves ($n=59$) were sampled. In the subsequent evaluations only positive or transiently infected animals identified during previous examinations were surveyed. In the cross-sectional study, performed 44 days after the conclusion of the longitudinal study, BVDV infection was assessed through evaluation of new calves ($n=82$) arrived at the rearing unit during the previous study. In the longitudinal study the BVDV RNA was identified in the blood samples of 22 (37.3%) 11 (18.6%), and 3 (5.1%) calves in the first, second, and third collections, respectively. The BVDV RNA was detected by RT-PCR in blood samples of 39 (47.6%) calves included in the cross-sectional study. Nucleotide sequencing and phylogenetic analysis of the *amplicons* identified the BVDV-1a and -1b subgenotypes in PI and TI calves. The results of both longitudinal and cross-sectional study demonstrate that the introduction and retention of PI animals with BVDV in a calf rearing unit is responsible for maintaining the high proportion of viremic animals and the spread of infection. Additionally, the results of this study show that as in high Brazilian producing dairy herds the BVDV infection also can be a health concern in household production dairy herds.

Keywords: BVDV. Cattle. RT-PCR. PI. Subgenotypes.

LISTA DE FIGURAS

1 REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1** – Organização das proteínas estruturais e não-estruturais do genoma do BVDV reconstruída por Neill (2013)..... 19
- Figura 2** – Dinâmica da infecção pelo BVDV ncp/cp em vacas gestantes e não gestantes 23

4 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

- Figura 1** – Phylogenetic tree demonstrating the typing of BVDV-1 strains by the 5'UTR indicates that the TI calf-UEL6-BR/11 and PI calf-UEL7-BR/11 isolates grouped in the subgenotype BVDV-1a. The other isolates TI calf-UEL8-BR/11 and PI calf-UEL9-BR/11 grouped within subgenotype BVDV-1b. The PI and TI calves are indicated by red and blue diamonds, respectively 42

LISTA DE QUADROS

1 REVISÃO DE LITERATURA

Quadro 1 – Distribuição mundial dos Pestivírus.....	17
Quadro 2 – Subgenótipos do vírus da diarreia viral bovina identificados no Brasil.....	21

LISTA DE TABELAS

4 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

Table 1 – BVDV RNA detection by RT-PCR in blood samples of calves in a longitudinal study carried out in a dairy calf rearing unit in Parana State, Brazil	43
Table 2 – BVDV subgenotypes identified in the longitudinal study in transiently and persistently infected animals of a dairy calf rearing unit	43

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	VÍRUS DA DIARRHEIA VIRAL BOVINA.....	16
2.2	SINAIS CLÍNICOS.....	23
2.3	DIAGNÓSTICO	24
2.4	VACINAÇÃO E CONTROLE.....	25
2.5	REFERÊNCIAS.....	26
3	OBJETIVOS	33
3.1	OBJETIVO GERAL.....	33
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
4	ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO: INFECTION PROFILE OF BOVINE VIRAL DIARRHEA VIRUS IN A DAIRY CALF REARING UNIT	34
4.1	INTRODUCTION	36
4.2	MATERIALS AND METHODS	37
4.3	RESULTS	39
4.4	DISCUSSION	40
4.5	REFERENCES	43
5	CONCLUSÃO	46
	APÊNDICES	47
	APÊNDICE A – Lista de reagentes.....	48
	APÊNDICE B – Soluções e tampões	49
	APÊNDICE C – Kits	51
	APÊNDICE D – Protocolo de técnicas.....	52

1 INTRODUÇÃO

Estudos sorológicos demonstram que a infecção pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV) está amplamente disseminada nos rebanhos bovinos leiteiros e de corte em todo o território brasileiro. Com frequência, a infecção tem sido relacionada com distúrbios da reprodução tais como mortalidades embrionárias e fetais, natimortalidade, defeitos congênitos e nascimento de animais fracos e com peso corporal abaixo da média da raça. Porém, outras formas clássicas de manifestação clínica como a forma aguda, caracterizada por úlceras e erosões em mucosas, as formas respiratória, hemorrágica e a Doença das Mucosas também já foi descrita no Brasil.

O BVDV constitui duas espécies (BVDV-1 e BVDV-2) do gênero *Pestivirus*, família *Flaviviridae*. Por possuir genoma RNA de fita simples, mutações são relativamente frequentes em cepas de BVDV. Até o momento já foram descritos 18 subgenotipos em cepas de BVDV-1 e dois subgenotipos em cepas de BVDV-2. Ambas as espécies de BVDV já foram descritas nos rebanhos brasileiros, assim como os subgenotipos 1a, 1b, 1d, 2a e 2b.

O BVDV, em circunstâncias específicas relativas ao status imunológico e período gestacional da vaca e na dependência da cepa viral, após a infecção fetal pode ocasionar o nascimento de animais persistentemente infectados (PI). Animais PI constituem o evento epidemiológico mais importante na infecção pelo BVDV uma vez que são o elo principal da cadeia epidemiológica da infecção. Animais PI eliminam o BVDV por todas as secreções e excreções por toda a vida e são os principais responsáveis pela disseminação e manutenção da infecção no rebanho. Nos programas de controle e profilaxia da infecção uma das principais condutas é a identificação e eliminação de animais PI dos rebanhos.

Rebanhos bovinos leiteiros e os de cria na pecuária de corte, quando considerados abertos, a aquisição de fêmeas para reposição de animais para a reprodução é um fato relativamente frequente. Rebanhos abertos são mais susceptíveis à infecção pelo BVDV, principalmente pelo fluxo de animais e a possibilidade de aquisição de animais PI, ou até mesmo em período de infecção aguda. Com isso, além de facilitar a entrada do vírus no rebanho, há ainda a possibilidade de que diferentes espécies de BVDV e mesmo que cepas virais de diferentes subgenotipos circulem simultaneamente no mesmo rebanho.

Mais recentemente, com o objetivo de melhorar a genética de rebanhos bovinos leiteiros, várias cooperativas de produtores têm implantado unidades de criação de bezerras e novilhas. Bezerras provenientes de vários rebanhos são recebidas na unidade de

criação com 2 a 5 dias de idade onde são criadas e devolvidas aos seus respectivos proprietários como novilhas prenhes. Quando um manejo sanitário rígido é implantado tanto nas unidades de criação quanto nos rebanhos fornecedores de bezerras o conceito é válido, pois proporciona incrementos quantitativos e qualitativos (genética) de rebanhos de pequenos produtores.

Porém, o médico veterinário sanitarista deve considerar que o perfil e a realidade sanitária de cada rebanho podem divergir consideravelmente na dependência do manejo instituído em cada um deles. Sem dúvida o risco sanitário em unidades de criação de bezerras é grande.

No presente estudo o BVDV foi utilizado como modelo para avaliar o risco de introdução e de disseminação de infecção viral em uma unidade de criação de bezerras localizada na região oeste do estado do Paraná.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA

O vírus da diarreia viral bovina (*bovine viral diarrhea virus* – BVDV) é um membro do gênero *Pestivirus*, família *Flaviviridae*, cuja infecção pode se apresentar tanto de forma subclínica quanto clínica. Na dependência da cepa viral infectante, idade e condição fisiológica os animais infectados podem apresentar sinais clínicos variados incluindo doença entérica, respiratória, falhas reprodutivas e Doença das Mucosas em bezerros PI (BAKER, 1995).

Atualmente há duas espécies de BVDV reconhecidas (BVDV-1 e BVDV-2) que juntamente com o vírus da peste suína clássica (*classical swine fever virus* - CSFV) e o vírus da Doença da Fronteira (*border disease virus* - BDV) de ovinos constituem as quatro espécies reconhecidas no gênero *Pestivirus* (BECHER; THIEL, 2011).

Além das espécies de *Pestivirus* reconhecidas pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV), novos pestivírus denominados “atípicos” têm sido descritos no mundo e estes isolados incluem um pestivírus atípico isolado de girafa no Quênia (BECHER *et al.*, 2003), um vírus isolado de antílope nos Estados Unidos da América (VILCEK *et al.*, 2005) e outro isolado em um surto de miocardite em suínos na Austrália denominado vírus Bungowannah (KIRKLAND *et al.*, 2007) (Quadro 1).

Um novo pestivírus atípico, inicialmente denominado vírus HoBi-like tem sido identificado no Brasil, Itália e Tailândia (BAUERMAN *et al.* 2013). Este pestivírus, atualmente considerado emergente, foi inicialmente identificado a partir de um lote de soro fetal bovino importado do Brasil (SCHIRRMIEIER *et al.*, 2004). Análises antigênicas e moleculares mostraram que o vírus HoBi-like apresenta estreita relação com o BVDV-1 e BVDV-2 (BAUERMAN *et al.*, 2012), sendo proposto

Quadro 1 – Distribuição mundial dos Pestivírus

Espécie	Status	Hospedeiro-Alvo	Distribuição	Esforços de erradicação	Vacina disponível
Vírus da peste suína clássica (CSFV)	Reconhecido pelo ICTV	Suínos	Todos os continentes	Erradicado no Canadá e nos Estados Unidos	Sim
Vírus da diarreia viral bovina 1 (BVDV-1)	Reconhecido pelo ICTV	Todos os biungulados	Todos os continentes	Erradicação em fase de conclusão na Escandinávia, em processo em várias outras regiões da Europa	Sim
Vírus da diarreia viral bovina 2 (BVDV-2)	Reconhecido pelo ICTV	Todos os biungulados	Todos os continentes	Erradicação em fase de conclusão na Escandinávia, em processo em várias outras regiões da Europa	Sim
O vírus da doença da fronteira de (BDV)	Reconhecido pelo ICTV	Principalmente pequenos ruminantes	Todos os continentes	Nenhum	Não
Pestivírus de girafa	Proposto	Girafas	África	Nenhum	Não
Pestivírus de Pronghorn	Proposto	Pronghorn antílope	América do Norte	Nenhum	Não
Pestivírus Bungowannah	Proposto	Suínos	Austrália	Nenhum	Não
Vírus HoBi-like	Proposto	Bovinos e bubalinos	América do Sul, Sudeste da Ásia, Europa	Nenhum	Não

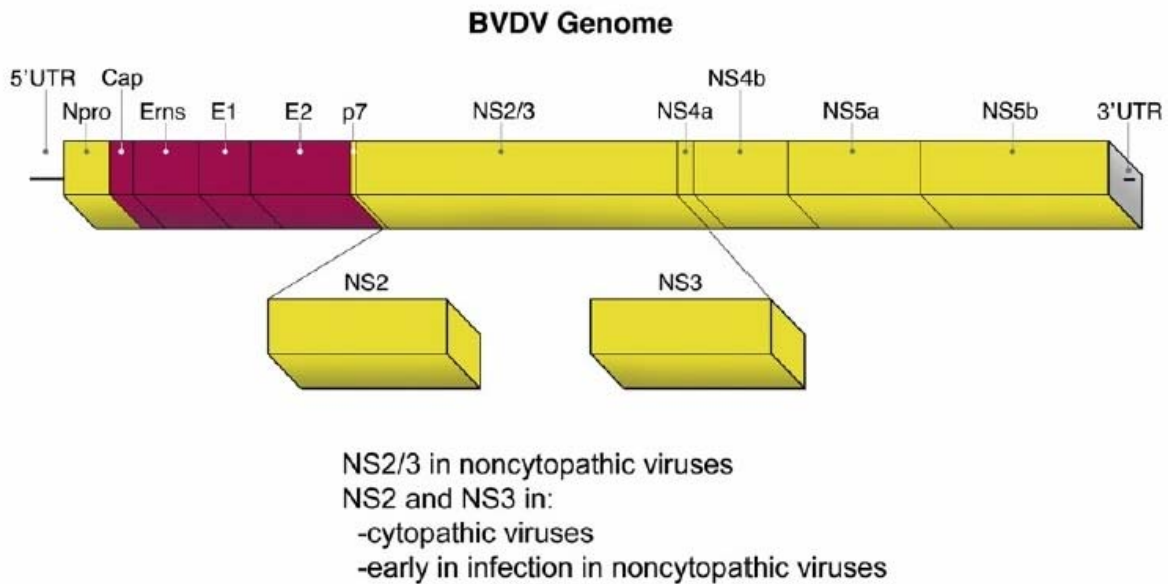
Adaptado de BAUERMAN et al., 2013, ICTV= Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus

como protótipo de uma nova espécie de pestivírus, denominada por alguns pesquisadores como BVDV-3 (LIU *et al.*, 2009).

Além disso, os sinais clínicos ocasionados pela infecção com esse novo vírus assemelham-se às formas de apresentações clínicas historicamente associadas com infecções por BVDV, que incluem doença respiratória, abortos, baixo desempenho reprodutivo, aumento da taxa de mortalidade em bezerros e o estabelecimento de infecção persistente (DECARO *et al.*, 2011; DECARO *et al.*, 2012a; DECARO *et al.*, 2013). Após a primeira detecção do vírus HoBi-like, novos isolados tem sido identificados em lotes de soro fetal bovino contaminado na Austrália, Brasil, Estados Unidos, Canadá e México (XIA *et al.*, 2011, 2013). No entanto, infecções naturais e surtos clínicos já têm sido relatados no Brasil (CORTEZ *et al.*, 2006), Tailândia (STALDER *et al.*, 2005) e na Itália (DECARO *et al.*, 2012b).

A organização do genoma dos pestivírus consiste em uma molécula de vírus RNA fita simples, polaridade positiva, com aproximadamente 12.3 mil pares de base (pb). O genoma apresenta uma única fase aberta de leitura (*Open Reading Frame* – ORF) que codifica todas as proteínas virais, flanqueada por duas regiões não-traduzidas 5' e 3' (UTRs) com 360 a 390 e 200 a 240 nucleotídeos (nt), respectivamente (RIDPATH, 2010a). A ORF é traduzida em uma longa poliproteína, que é clivada em 12 proteínas individuais à medida que é traduzida na seguinte ordem: N^{pro} uma autoprotease não-estrutural N-terminal, uma proteína que forma um componente estrutural do capsídeo (C), três glicoproteínas do envelope (E^{ms}, E1 e E2) e as proteínas não-estruturais NS2/NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B (MEYERS; THIEL, 1996) (Figura 1).

Figura 1 – Organização das proteínas estruturais e não-estruturais no genoma do BVDV reconstituída por NEILL, 2013.



O vírion é esférico e mede em torno de 40 a 60 nm de diâmetro. O nucleocapsídeo icosaédrico é revestido externamente por um envelope derivado das membranas da célula hospedeira, o que torna o vírus suscetível à inativação por solventes orgânicos e detergentes. Além disso, o vírion é resistente a variações de pH 5,7 a 9,3 e pode manter a infectividade no meio ambiente por até duas semanas. Porém, as partículas virais são rapidamente inativadas pelo calor, solventes orgânicos, detergentes e desinfetantes comuns, como fenóis e clorexidina (RIDPATH, 2005).

Como o BVDV é um vírus RNA, mutações ocorrem facilmente, o que leva a variações moleculares, antigênicas e de patogenicidade da cepa viral infectante. Por causa das frequentes mutações no RNA viral durante a replicação, o BVDV pode existir como *quasi-species*, que são diferentes, mas, estreitamente relacionados entre si (TAJIMA *et al* 2004).

As diferenças entre as espécies de BVDV podem ser encontradas por todo genoma viral e não estão restritas a uma única região (LIU *et al.*, 2010). Entretanto, o segmento 5'UTR é mais comumente utilizado para a detecção e caracterização molecular do BVDV porque possui áreas altamente conservadas que são alvo para amplificação pela reação da polimerase em cadeia precedida de transcrição reversa (RT-PCR) (BOOTH *et al.*, 2013). A proteína não-estrutural N^{pro}, exclusiva do gênero *Pestivirus*, também tem sido utilizada para caracterização de prováveis novos pestivírus (KUTA *et al.*, 2013).

As duas espécies reconhecidas do BVDV (BVDV-1 e BVDV-2) foram inicialmente diferenciadas com base em estudos filogenéticos (RIDPATH *et al.*, 1994). Posteriormente estudos com o objetivo de caracterizar antigenicamente cepas virais de ambas as espécies também demonstraram diferença (PELLERIN *et al.*, 1994). O BVDV-1 representa a maioria dos vírus protótipos vacinais e das cepas de referência, enquanto o BVDV-2 foi identificado há duas décadas em surtos de BVDV agudo grave associado à síndrome hemorrágica na América do Norte (RIDPATH *et al.*, 2000).

Embora não reconhecidos pelo ICTV, análises filogenéticas revelaram subgenótipos nas duas espécies de BVDV, com ao menos 18 subgenótipos para BVDV-1 (1a-1r) (GAO *et al.*, 2013; YESILBAG *et al.*, 2014) e dois subgenótipos em BVDV-2 (2a-2b) (FLORES *et al.*, 2002). A importância clínica da classificação das cepas de BVDV-1 e BVDV-2 em subgenótipos ainda é uma questão em discussão. Diferentes subgenótipos predominam em países como Inglaterra e País de Gales (STRONG *et al.*, 2013), Argentina (PECORA *et al.*, 2014), Áustria (ROSSMANITH *et al.*, 2014), Estados Unidos e Austrália (RIDPATH *et al.*, 2010b) e estudos tem demonstrado diferenças antigênicas entre subgenótipos utilizando painéis de anticorpos monoclonais (BOLIN; RIDPATH, 1998; BACHOFEN *et al.*, 2008).

No Brasil estudos têm demonstrado que a infecção pelo BVDV está amplamente difundida nos rebanhos bovinos e que as cepas brasileiras do vírus apresentam variabilidade antigênica marcante (BOTTON *et al.*, 1998a; BOTTON *et al.*, 1998b; CANAL *et al.*, 1998, FLORES *et al.*, 2000). Análises filogenéticas indicam a presença do vírus das duas espécies no rebanho brasileiro com predomínio para os subgenótipos BVDV-1a, 1b e 1d (VILCEK *et al.*, 2004; OTONEL *et al.*, 2014) além da presença também dos subgenótipos BVDV-2a, 2b (FLORES *et al.*, 2002; BIANCHI *et al.*, 2011) (Quadro 2).

Quadro 2 – Subgenotipos do vírus da diarreia viral bovina identificados no Brasil

Referência	Estado *	Genotipos				
		1a	1b	1d	2a	2b
Vilcek <i>et al.</i> (2004)	NI			*		
Cortez <i>et al.</i> (2006)	RS, MG, MT, PR, SP	*	*		*	*
Lunardi <i>et al.</i> (2008)	PR		*			
Bianchi <i>et al.</i> (2011)	RS	*			*	*
Dias <i>et al.</i> (2012)	MG		*			
Flores <i>et al.</i> (2012)	RS					*
Otonel <i>et al.</i> (2014)	PR	*	*	*		

(*) PR (Paraná); RS (Rio Grande do Sul); MG (Minas Gerais); MT (Mato Grosso) SP (São Paulo); NI (Não informado)

De acordo com a capacidade de produzir efeito citopático em cultivo celular, os isolados de BVDV podem ser classificados em biotipos citopáticos (cp) e não-citopáticos (ncp). A grande maioria dos vírus de campo são ncp; amostras cp são isoladas, quase que exclusivamente, de animais acometidos por Doença das Mucosas (BROWNLIE, 1990; BAKER, 1995).

A Doença das Mucosas é uma forma grave do BVDV invariavelmente fatal, estabelecida quando um animal PI, infectado com uma cepa de BVDV ncp, é superinfectado com uma cepa de BVDV cp antigenicamente semelhante (PETERHANS *et al.*, 2010). O BVDV cp que determina a Doença das Mucosas geralmente se origina do BVDV ncp do próprio animal PI devido a um evento de mutação que resulta na clivagem da proteína viral NS2/3 gerando as proteínas NS2 e NS3 (LATTWEIN *et al.*, 2012).

A recombinação com o RNA mensageiro da célula hospedeira, mutações pontuais, translocação e duplicação de genes são frequentemente observadas em eventos que resultam na mudança dos biotipos (BECKER, 2000). Análise genética de uma grande variedade de cepas cp demonstra que o aumento da produção da proteína não-estrutural NS3 é a característica comum mais importante de todas as cepas de BVDV cp caracterizadas até o momento (MEYERS; THIEL, 1996).

No entanto, os biotipos se comportam diferentemente *in vivo*. As cepas ncp apresentam tropismo por leucócitos, órgãos linfoides e pelo trato respiratório, enquanto as cepas cp possuem predileção pelo trato digestório (HAMERS *et al.*, 2001). Citopatologia *in vitro* não tem correlação com a virulência *in vivo*. A forma clinicamente grave da infecção

aguda pelo BVDV está associada às cepas ncp (CARMAN *et al.*, 1998; RIDPATH *et al.*, 2006).

A diferença entre os biotipos cp e ncp é evidente na resposta imune inata contra infecção viral que é ativa desde o início da gestação. O interferon tipo 1 (IFN-1) é fundamental na defesa antiviral do sistema imune inato que está ativo antes do sistema imune adaptativo atuar por meio do disparo de uma defesa antígeno específica. O biotipo ncp de BVDV não induz a produção de IFN-1 em vários tipos de cultura de células ao passo que infecções com biotipo cp facilmente induzem a produção de IFN-1 (PETERHANS *et al.*, 2003).

Uma vez que o IFN-1 é um antiviral presente no início do desenvolvimento fetal, o bloqueio da resposta imune inata, provocada por uma cepa de BVDV ncp pode contribuir para o estabelecimento de infecção persistente (CHARLESTON *et al.*, 2001).

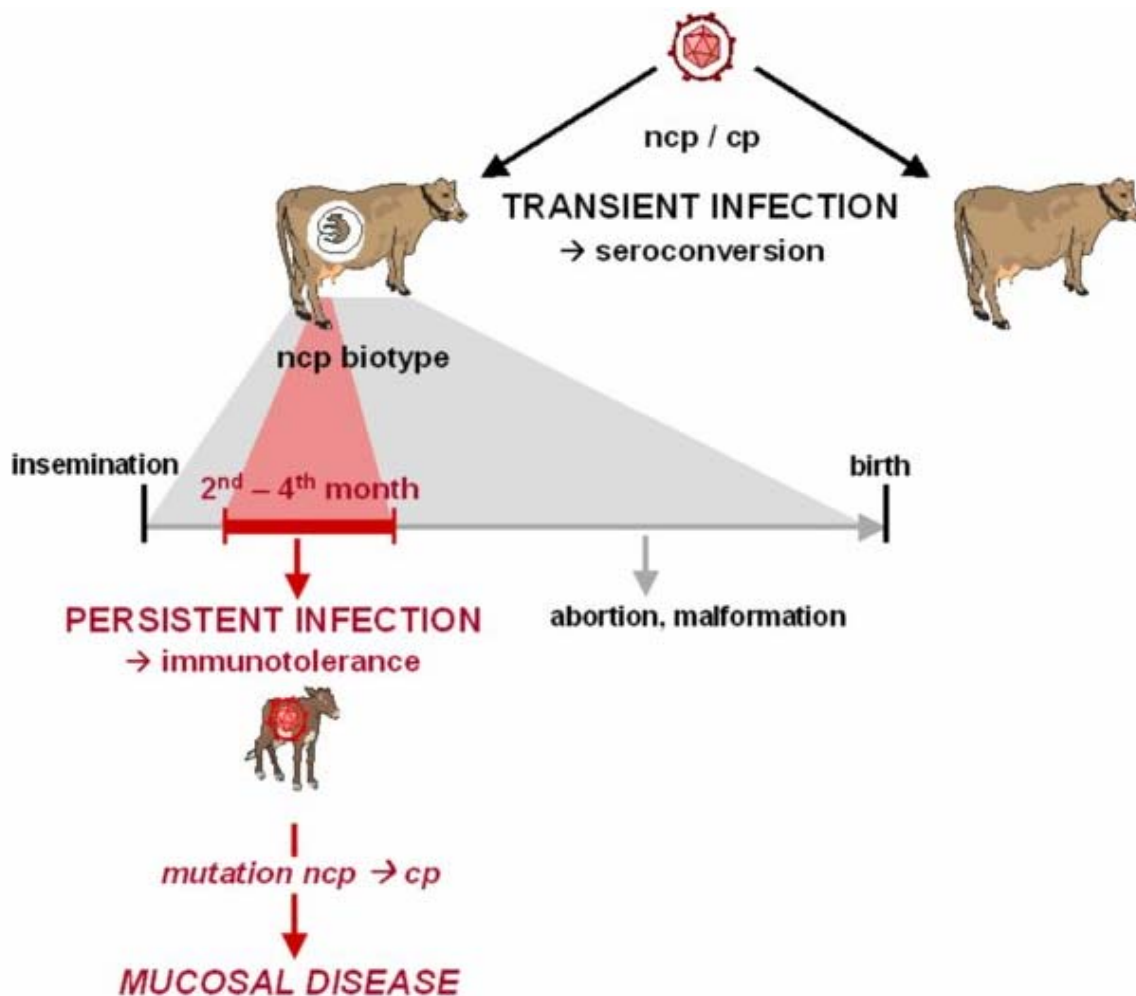
A infecção de animais soronegativos com BVDV de ambos os biotipos induz infecção transitória (aguda) subclínica ou com sintomas clínicos brandos (LANYON *et al.*, 2014). O vírus pode ser eliminado pela resposta imune humoral e celular que irá proteger o animal de novas infecções. Enquanto a infecção de animais imunocompetentes geralmente leva a soro-conversão e eliminação da infecção viral, a infecção apenas com o BVDV ncp de fêmeas prenhes entre 40 e 120 dias de gestação pode levar a infecção persistente do feto. O sistema imune do feto nesse período gestacional ainda é imaturo e não consegue estabelecer uma resposta imune adaptativa contra o vírus (KELLING *et al.*, 2013).

A figura 2 apresenta os principais eventos resultantes da infecção por ambos os biótipos de BVDV cp/ncp em vacas gestantes e não-gestantes.

A maioria dos animais PIs são assintomáticos e desempenham um papel importante na epidemiologia da infecção, pois não são facilmente detectáveis e eliminam o vírus ao longo de suas vidas continuamente em grandes quantidades em secreções e excreções o que garante a disseminação permanente do vírus nos rebanhos bovinos e dificulta os esforços no controle da infecção (HOUE, 1995).

Embora animais PIs sejam imunotolerantes ao BVDV, são imunocompetentes a outros antígenos (BROCK, 1995) e desenvolvem resposta imunológica contra cepas virais heterólogas do BVDV (BAKER, 1995). Essa característica tem grande importância em programas de controle e, por esta razão, a maioria das vacinas com vírus atenuado de BVDV utiliza cepas virais cp. Entretanto, infecções no final da gestação podem levar ao aborto, malformação fetal, nascimento de bezerros normais e imunocompetentes (RIDPATH, 2010a).

Figura 2 – Dinâmica da infecção pelo BVDV ncp/cp em vacas gestantes e não-gestantes PETERHANS *et al.*, 2010.



2.2 SINAIS CLÍNICOS

A variedade de sinais clínicos na infecção pelo BVDV depende do tipo de cepa viral, idade, status imune e reprodutivo dos animais, além de infecções secundárias com outros agentes. Embora o termo “diarreia” seja proeminente no nome, enfermidade entérica, doença respiratória em bezerros, síndrome hemorrágica, patologias cutâneas, imunossupressão, perdas reprodutivas como infertilidade temporária, mortalidade embrionária, aborto ou mumificação fetal, malformações, natimortalidade ou nascimento de bezerros fracos e inviáveis são comumente relatados na infecção pelo BVDV (BAKER, 1995). Malformações congênitas são produzidas pela infecção por BVDV entre 100 e 150 dias de gestação e incluem: hipoplasia cerebelar, hidrocefalia, bragnatismo, hipotricose, microcefalia entre outras (GROOMS, 2004).

O BVDV é linfotrópico e infecções agudas podem resultar em imunossupressão predispondo ao aumento da infecção por outros agentes infecciosos (RIDPATH *et al.*, 2010c). As células do sistema imune inato e adaptativo são afetadas pelo BVDV e leucopenia ocorre na maioria dos animais infectados de forma aguda (MULLER-DOBLIES *et al.*, 2004). De forma geral, cepas virais mais virulentas induzem maiores declínios na contagem de leucócitos do que cepas de baixa virulência. Linfopenia e neutropenia são as principais anormalidades hematológicas encontradas (KELLING *et al.*, 2002).

2.3 DIAGNÓSTICO

O isolamento viral em cultura de células tem sido a prova padrão no diagnóstico da doença, porém é uma técnica laboriosa que requer grande tempo para a conclusão dos resultados. A detecção de antígenos por ELISA de captura (ACE) e imunohistoquímica (IHC) e a reação da polimerase em cadeia precedida de transcrição reversa (RT-PCR) tem ganhado destaque em contraste com o isolamento viral. Os testes de IHC e ACE realizados em biopsia de pele tornaram-se amplamente utilizados e podem ser aplicados para a detecção de animais PIs como métodos de triagem (ZIMMER *et al.*, 2004, FULTON *et al.*, 2009). As biopsias de pele podem ser realizadas em animais jovens que foram negativos para o isolamento viral e/ou que foram negativos para os testes de ELISA onde ocorre neutralização viral pelos anticorpos maternos (RIDPATH *et al.*, 2002).

As técnicas moleculares ganharam uso generalizado como método de diagnóstico de rotina na infecção pelo BVDV. A RT-PCR é específica e sensível e pode detectar baixas concentrações do vírus em *pool* de tecidos, amostras de sangue, soro ou leite, tornando esta uma forma econômica de detectar a infecção viral em estratégias de triagem em rebanhos (DRISKELL; RIDPATH, 2006). Porém, nenhum destes testes pode diferenciar a infecção aguda da infecção persistente. Por isso, dois testes positivos de amostras biológicas obtidas com intervalo de três semanas, são necessários para o diagnóstico de um animal PI (RIDPATH, 2010a).

Testes sorológicos podem ser utilizados para demonstrar a infecção pelo BVDV, porém não são capazes de diferenciar anticorpos induzidos por vacinas daqueles de infecção natural ou como resultado da transferência de anticorpos maternos (DEZEN *et al.*, 2013). O teste sorológico pode ser utilizado para avaliar a eficácia de uma vacina e pode ser utilizado em animais sentinelas para determinar se houve exposição do rebanho ao BVDV

(DIAS *et al.*, 2010). O teste de vírus-neutralização é o ensaio sorológico geralmente utilizado para determinar os títulos de anticorpos neutralizantes específicos contra o BVDV (SALIKI; DUBOVI, 2004).

2.4 CONTROLE E VACINAÇÃO

As principais medidas para o controle da infecção pelo BVDV consistem na eliminação das fontes da infecção e, com isso limitam a transmissão viral de indivíduos infectados para animais susceptíveis. O animal PI é o principal reservatório do BVDV, embora animais transitoriamente infectados (TI) possam, em menor proporção, serem fontes de infecção. O desenvolvimento e a implantação de programas sanitários que identificam os animais PI são importantes para o sucesso de medidas de controle. Durante o desenvolvimento de um programa de prevenção e controle de BVDV, três aspectos devem ser considerados: i) identificação e eliminação de animais PIs; ii) aumento da imunidade por meio da vacinação; e iii) implantação de medidas de biossegurança (BROCK, 2003; LINDBERG, 2003).

A vacinação é efetiva em reduzir os sinais clínicos da infecção causada pelo BVDV, no entanto, não elimina o vírus da população bovina. O controle pela vacinação é comprometido pela heterogeneidade observada nas cepas do BVDV e mais importante, a difícil remoção dos animais PIs dos rebanhos bovinos (FULTON, 2003).

A proteção contra a infecção fetal varia após a vacinação e pode ser influenciada pelo uso de vacinas inativadas ou vacinas com vírus atenuado, pelo momento do desafio e pelo grau de homologia entre as cepas virais vacinais e as cepas de desafio, de campo e/ou selvagens (GROOMS *et al.*, 2007). As primeiras vacinas produzidas continham apenas cepas de BVDV-1. Porém com o melhor conhecimento da diversidade antigênica, vacinas com vírus atenuado e vacinas inativadas contendo ambas as cepas de BVDV-1 e -2 estão disponíveis (RIDPATH *et al.*, 2013).

Tanto a resposta imune humoral quanto a celular são efetivas contra a infecção com o BVDV. A resposta imune humoral é fácil de mensurar e a vírus-neutralização é o teste comumente utilizado para avaliar os títulos de anticorpos e a imunidade do rebanho. Em infecções naturais os títulos de anticorpos são detectáveis de 2 a 3 semanas após a infecção e podem persistir entre 10 a 12 semanas após a exposição. Nos casos de uso de vacinas com vírus atenuado, a resposta imune humoral é direcionada principalmente contra as proteínas virais E2 e NS2/3, ao contrário das vacinas inativadas para as quais a resposta

imune é direcionada mais especificamente contra a proteína viral E2 (HOWARD *et al.*, 1992; RIDPATH, 2013).

Muitos países europeus iniciaram programas de controle e erradicação para o BVDV. Os países Escandinavos têm chegado próximo da eliminação do BVDV na sua população de bovinos. A comunidade Europeia tem fornecido evidências de que o controle e erradicação podem ser bem sucedidos (STAHL *et al.*, 2012). No entanto, a concepção de um programa de erradicação pode ser dificilmente aplicada a outras regiões do mundo. Programas para o controle ou erradicação podem ser cuidadosamente elaborados. Porém, informações como o tipo de exploração pecuária, densidade da população animal e o potencial contato com fontes reservatórios silvestres e outros fatores tais como a variação entre as cepas de BVDV circulantes podem influenciar a implantação e o controle de um programa de erradicação contra o BVDV (WALZ *et al.*, 2010).

No Brasil, mais estudos sobre a caracterização antigênica e molecular de novos isolados são necessários para a implantação de medidas de controle mais efetivas contra a infecção. Testes de diagnóstico específicos e sensíveis como a RT-PCR podem ser empregados para a detecção de animais PIs em rebanhos com histórico de infecção pelo BVDV, ou testes sorológicos de animais sentinelas com o intuito de verificar o status do rebanho frente à exposição viral. A implantação de programa de controle e erradicação contra a infecção ainda é uma realidade distante do rebanho bovino brasileiro devido à característica endêmica da infecção em várias regiões geográficas brasileiras, a grande movimentação de animais no país e à densidade populacional dos animais, uma vez que o rebanho bovino comercial brasileiro é o maior do mundo. O desenvolvimento de vacinas com cepas virais isoladas no país ou até mesmo em regiões específicas do país, sem dúvida, seria de grande importância como medida de controle da infecção, uma vez que os isolados brasileiros apresentam acentuadas diferenças antigênicas e moleculares com os isolados virais Norte Americanos e Europeus.

2.5 REFERÊNCIAS

BACHOFEN, C.; STALDER, H.; BRAUN, U.; HILBE, M.; EHRENSPERGER, F.; PETERHANS, E. Co-existence of genetically and antigenically diverse bovine viral diarrhoea viruses in an endemic situation. **Vet Microbiol**, v. 131, n. 1-2, p. 93-102, 2008.

BAUERMANN, F.V.; FLORES, E.F.; RIDPATH, J.F. Antigenic relationships between Bovine viral diarrhoea virus 1 and 2 and HoBi virus: possible impacts on diagnosis and control. **J Vet Diagn Invest**, v. 24, n. 2, p. 253-61, 2012.

- BAUERMANN, F.V.; RIDPATH, J.F.; WEIBLEN, R.; FLORES, E.F. HoBi-like viruses: an emerging group of pestiviruses. **J Vet Diagn Invest**, v. 25, n. 1, p. 6-15, 2013.
- BAKER, J.C. The clinical manifestations of bovine viral diarrhoea infection. **Vet Clin North Am Food Anim Pract**, v. 11, n. 3, p. 425-45, 1995.
- BECHER, P.; AVALOS RAMIREZ, R.; ORLICH, M.; CEDILLO ROSALES, S.; KONIG, M.; SCHWEIZER, M.; STALDER, H.; SCHIRRMIEIER, H.; THIEL, H.J. Genetic and antigenic characterization of novel pestivirus genotypes: implications for classification. **Virology**, v. 311, n. 1, p. 96-104, 2003.
- BECHER, P.; THIEL, H.J. Pestivirus (Flaviviridae). In: TIDONA, C.A.; DARAI, G. (Eds.), **Springer Index of Viruses**, Second Ed. Springer Verlag, Heidelberg, Germany, pp. 483-488, 2011.
- 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.
- BIANCHI, E.; MARTINS, M.; WEIBLEN, R.; FLORES, E.F. Perfil genotípico e antigênico de amostras do vírus da diarréia viral bovina isoladas no Rio Grande do Sul (2000-2010). **Pesq Vet Bras**, v. 31, p. 649-655, 2011.
- BOLIN, S.R.; RIDPATH, J.F. Prevalence of bovine viral diarrhoea virus genotypes and antibody against those viral genotypes in fetal bovine serum. **J Vet Diagn Invest**, v. 10, n. 2, p. 135-9, 1998.
- BOTTON, S.A.; DA-SILVA, A.M.; BRUM, M.C.S.; WEIBLEN, R.; FLORES, E.F. Antigenic characterization of Brazilian bovine viral diarrhoea virus isolates by monoclonal antibodies and cross-neutralization. **Braz J Med Biol Res**, v. 31, p. 1429-1438, 1998a.
- BOTTON, S.A.; GIL, L.H.V.G.; SILVA, A.M.D.; FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; PITUCO, E.M.; ROEHE, P.M.; MOOJEN, V.; WENDELSTEIN, A.C. Caracterização preliminar de amostras do vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV) isoladas no Brasil. **Pesq Vet Bras**, v. 18, p. 84-92, 1998b.
- BOOTH, R.E.; THOMAS, C.J.; EL-ATTAR, L.M.; GUNN, G.; BROWNLIE, J. A phylogenetic analysis of Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) isolates from six different regions of the UK and links to animal movement data. **Vet Res**, v. 44, p. 43, 2013.
- BROCK, K.V. Diagnosis of bovine viral diarrhoea virus infections. **Vet Clin North Am Food Anim Pract**, v. 11, n. 3, p. 549-61, 1995.
- BROCK, K.V. The persistence of bovine viral diarrhoea virus. **Biologicals**, v.31, p.133-135, 2003.
- BROWNLIE, J. Pathogenesis of mucosal disease and molecular aspects of bovine virus diarrhoea virus. **Vet Microbiol**, v. 23, n. 1-4, p. 371-82, 1990.
- CANAL, C.W.; STRASSER, M.; HERTIG, C.; MASUDA, A.; PETERHANS, E. Detection of antibodies to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and characterization of genomes of BVDV from Brazil. **Vet Microbiol**, v. 63, n. 2-4, p. 85-97, 1998.

CARMAN, S.; VAN DREUMEL, T.; RIDPATH, J.; HAZLETT, M.; ALVES, D.; DUBOVI, E.; TREMBLAY, R.; BOLIN, S.; GODKIN, A.; ANDERSON, N. Severe acute bovine viral diarrhoea in Ontario, 1993-1995. **J Vet Diagn Invest**, v. 10, n. 1, p. 27-35, 1998.

CHARLESTON, B.; FRAY, M.D.; BAIGENT, S.; CARR, B.V.; MORRISON, W.I. Establishment of persistent infection with non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus in cattle is associated with a failure to induce type I interferon. **J Gen Virol**, v. 82, n. Pt 8, p. 1893-7, 2001.

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

DECARO, N.; LUCENTE, M.S.; MARI, V.; CIRONE, F.; CORDIOLI, P.; CAMERO, M.; SCIARRETTA, R.; LOSURDO, M.; LORUSSO, E.; BUONAVOGLIA, C. Atypical pestivirus and severe respiratory disease in calves, Europe. **Emerg Infect Dis**, v. 17, n. 8, p. 1549-52, 2011.

DECARO, N.; MARI, V.; PINTO, P.; LUCENTE, M.S.; SCIARRETTA, R.; CIRONE, F.; COLAIANNI, M.L.; ELIA, G.; THIEL, H.J.; BUONAVOGLIA, C. Hobi-like pestivirus: both biotypes isolated from a diseased animal. **J Gen Virol**, v. 93, n. Pt 9, p. 1976-83, 2012a.

DECARO, N.; LUCENTE, M.S.; MARI, V.; SCIARRETTA, R.; PINTO, P.; BUONAVOGLIA, D.; MARTELLA, V.; BUONAVOGLIA, C. Hobi-like pestivirus in aborted bovine fetuses. **J Clin Microbiol**, v. 50, n. 2, p. 509-12, 2012b.

DECARO, N.; LOSURDO, M.; LUCENTE, M.S.; SCIARRETTA, R.; MARI, V.; LAROCCA, V.; ELIA, G.; CAVALIERE, N.; MARTELLA, V.; FASANELLA, A.; BUONAVOGLIA, C. Persistent infection caused by Hobi-like pestivirus. **J Clin Microbiol**, v. 51, n. 4, p. 1241-3, 2013.

DEZEN, S.; OTONEL, R.A.A.; ALFIERI, A.F.; LUNARDI, M.; ALFIERI, A.A. Perfil da infecção pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV) em um rebanho bovino leiteiro de alta produção e com programa de vacinação contra o BVDV. **Pesq Vet Bras**, v. 33, p. 141-147, 2013.

DIAS, F.C.; MÉDICI, K.C.; ALEXANDRINO, B.; MEDEIROS, A.S.R.; ALFIERI, A.A.; SAMARA, S.I. Ocorrência de animais persistentemente infectados pelo vírus da diarreia viral bovina em rebanhos bovinos nos Estados de Minas Gerais e São Paulo, **Pesq Vet Bras**, v. 30, p. 933-939, 2010.

DIAS, F.C.; MÉDICI, K. C.; SOUZA, R.L.M.; ALFIERI, A. A.; SAMARA, S.I. Genetic characterization of bovine viral diarrhoea virus detected in persistently infected cattle in Southern Minas Gerais, Brazil, **Braz J Vet Res Anim Sci**, v.49, p.452-459, 2012.

DRISKELL, E.A.; RIDPATH, J.F. A survey of bovine viral diarrhoea virus testing in diagnostic laboratories in the United States from 2004 to 2005. **J Vet Diagn Invest**, v.18, p.600-605, 2006.

FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; GIL, L.H.V.G.; TOBIAS, F.L.; LIMA, M.; GARCEZ, D.C.; BOTTON, S.A. Diversidade antigênica de amostras do vírus da diarreia viral bovina isoladas

no Brasil: implicações para o diagnóstico e estratégias de imunização. **Arq Bras Med Vet Zootec**, v. 52, p. 11-17, 2000.

FLORES, E.F.; RIDPATH, J.F.; WEIBLEN, R.; VOGEL, F.S.; GIL, L.H. Phylogenetic analysis of Brazilian bovine viral diarrhoea virus type 2 (BVDV-2) isolates: evidence for a subgenotype within BVDV-2. **Virus Res**, v. 87, n. 1, p. 51-60, 2002.

FULTON, R.W.; RIDPATH, J.F.; CONFER, A.W.; SALIKI, J.T.; BURGE, L.J.; PAYTON, M.E. Bovine viral diarrhoea virus antigenic diversity: impact on disease and vaccination programmes. **Biologicals**, v. 31, n. 2, p. 89-95, 2003.

FULTON, R.W.; HESSMAN, B.E.; RIDPATH, J.F.; JOHNSON, B.J.; BURGE, L.J.; KAPIL, S.; BRAZIEL, B.; KAUTZ, K.; RECK, A. Multiple diagnostic tests to identify cattle with Bovine viral diarrhoea virus and duration of positive test results in persistently infected cattle. **Can J Vet Res**, v. 73, n. 2, p. 117-24, 2009.

GAO, S.; LUO, J.; DU, J.; LANG, Y.; CONG, G.; SHAO, J.; LIN, T.; ZHAO, F.; BELAK, S.; LIU, L.; CHANG, H.; YIN, H. Serological and molecular evidence for natural infection of Bactrian camels with multiple subgenotypes of bovine viral diarrhoea virus in Western China. **Vet Microbiol**, v. 163, n. 1-2, p. 172-6, 2013.

GROOMS DL. Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhoea virus. **Vet Clin North Am Food Anim Pract**, v.20, p. 5-19, 2004.

GROOMS, D.L.; BOLIN, S.R.; COE, P.H.; BORGES, R.J.; COUTU, C.E. Fetal protection against continual exposure to bovine viral diarrhoea virus following administration of a vaccine containing an inactivated bovine viral diarrhoea virus fraction to cattle. **Am J Vet Res**, v. 68, n. 12, p. 1417-22, 2007.

HAMERS, C.; DEHAN, P.; COUVREUR, B.; LETELLIER, C.; KERKHOFS, P.; PASTORET, P.P. Diversity among bovine pestiviruses. **Vet J**, v. 161, n. 2, p. 112-22, 2001.

HOUE, H. Epidemiology of bovine viral diarrhoea virus. **Vet Clin North Am Food Anim Pract**, v. 11, n. 3, p. 521-47, 1995.

HOWARD, C.J.; CLARKE, M.C.; SOPP, P.; BROWNLIE, J. Immunity to bovine virus diarrhoea virus in calves: the role of different T-cell subpopulations analysed by specific depletion in vivo with monoclonal antibodies. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 32, n. 3-4, p. 303-14, 1992.

KELLING, C.L.; STEFFEN, D.J.; TOPLIFF, C.L. Comparative virulence of isolates of bovine viral diarrhoea virus type II in experimentally inoculated six- to nine-month-old calves. **Am J Vet Res**, v.63, p.1379-1384, 2002.

KELLING, C.L.; TOPLIFF, C.L. Bovine maternal, fetal and neonatal responses to bovine viral diarrhoea virus infections. **Biologicals**, v. 41, n. 1, p. 20-5, 2013.

KIRKLAND, P.D.; FROST, M.J.; FINLAISON, D.S.; KING, K.R.; RIDPATH, J.F.; GU, X. Identification of a novel virus in pigs-Bungowannah virus: a possible new species of pestivirus. **Virus Res**, v. 129, n. 1, p. 26-34, 2007.

KUTA, A.; POLAK, M.P.; LARSKA, M.; ZMUDZINSKI, J.F. Predominance of bovine viral diarrhoea virus 1b and 1d subtypes during eight years of survey in Poland. **Vet Microbiol**, v. 166, n. 3-4, p. 639-44, 2013.

LANYON, S.R.; HILL, F.I.; REICHEL, M.P.; BROWNLIE, J. Bovine viral diarrhoea: Pathogenesis and diagnosis. **Vet J**, v. 199, n. 2, p. 201-209, 2014.

LATTWEIN, E.; KLEMENS, O.; SCHWINDT, S.; BECHER, P.; TAUTZ, N. Pestivirus virion morphogenesis in the absence of uncleaved nonstructural protein 2-3. **J Virol**, v. 86, n. 1, p. 427-37, 2012.

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

LIU, L.; XIA, H.; WAHLBERG, N.; BELAK, S.; BAULE, C. Phylogeny, classification and evolutionary insights into pestiviruses. **Virology**, v. 385, n. 2, p. 351-7, 2009.

LIU, L.; XIA, H.; BAULE, C.; BELAK, S.; WAHLBERG, N. Effects of methodology and analysis strategy on robustness of pestivirus phylogeny. **Virus Res**, v. 147, n. 1, p. 47-52, 2010.

LUNARDI, M.; HEADLEY, S.A.; LISBOA, J.A.; AMUDE, A.M.; ALFIERI, A.A. Outbreak of acute bovine viral diarrhoea in Brazilian beef cattle: clinicopathological findings and molecular characterization of a wild-type BVDV strain subtype 1b. **Res Vet Sci**, v. 85, n. 3, p. 599-604, 2008.

MEYERS, G.; THIEL, H.J. Molecular characterization of pestiviruses. **Adv Virus Res**, n. 47, 53-118, 1996.

MULLER-DOBLIES, D.; ARQUINT, A.; SCHALLER, P.; HEEGAARD, P.M.; HILBE, M.; ALBINI, S.; ABRIL, C.; TOBLER, K.; EHRENSPERGER, F.; PETERHANS, E.; ACKERMANN, M.; METZLER, A. Innate immune responses of calves during transient infection with a noncytopathic strain of bovine viral diarrhoea virus. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 11, n. 2, p. 302-12, 2004.

NEILL, J.D. Molecular biology of bovine viral diarrhoea virus. **Biologicals**, v. 41, n. 1, p. 2-7, 2013.

OTONEL, R.A.; ALFIERI, A.F.; DEZEN, S.; LUNARDI, M.; HEADLEY, S.A.; ALFIERI, A.A. The diversity of BVDV subgenotypes in a vaccinated dairy cattle herd in Brazil. **Trop Anim Health Prod**, v.46, n.1, p. 87-92, 2014.

PECORA, A.; MALACARI, D.A.; RIDPATH, J.F.; PEREZ AGUIRREBURUALDE, M.S.; COMBESSIES, G.; ODEON, A.C.; ROMERA, S.A.; GOLEMBA, M.D.; WIGDOROVITZ, A. First finding of genetic and antigenic diversity in 1b-BVDV isolates from Argentina. **Res Vet Sci**, v. 96, n. 1, p. 204-12, 2014.

PELLERIN, C.; VAN DEN HURK, J.; LECOMTE, J.; TUSSEN, P. Identification of a new group of bovine viral diarrhoea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. **Virology**, v. 203, n. 2, p. 260-8, 1994.

PETERHANS, E.; JUNGI, T.W.; SCHWEIZER, M. BVDV and innate immunity. **Biologicals**, v. 31, n. 2, p. 107-12, 2003.

PETERHANS, E.; BACHOFEN, C.; STALDER, H.; SCHWEIZER, M. Cytopathic bovine viral diarrhea viruses (BVDV): emerging pestiviruses doomed to extinction. **Vet Res**, v. 41, n. 6, p. 44, 2010.

PILZ, D.; ALFIERI, A.F.; LUNARDI, M.; ALFIERI, A.A. RT-PCR em pools de soros sangüíneos para o diagnóstico da infecção aguda e de animais persistentemente infectados pelo vírus da diarréia viral bovina. **Arq Bras Med Vet Zootec**, v. 59, p. 1-7, 2007.

RIDPATH, J.F.; BOLIN, S.R.; DUBOVI, E.J. Segregation of bovine viral diarrhea virus into genotypes. **Virology**, v. 205, n. 1, p. 66-74, 1994.

RIDPATH, J.F.; NEILL, J.D.; FREY, M.; LANDGRAF, J.G. Phylogenetic, antigenic and clinical characterization of type 2 BVDV from North America. **Vet Microbiol**, v. 77, n. 1-2, p. 145-55, 2000.

RIDPATH, J.F.; HIETALA, S.K.; SORDEN, S.; NEILL, J.D. Evaluation of the reverse transcription-polymerase chain reaction/probe test of serum samples and immunohistochemistry of skin sections for detection of acute bovine viral diarrhea infections. **J Vet Diagn Invest**, v. 14, n. 4, p. 303-7, 2002.

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

RIDPATH, J.F.; NEILL, J.D.; VILCEK, S.; DUBOVI, E.J.; CARMAN, S. Multiple outbreaks of severe acute BVDV in North America occurring between 1993 and 1995 linked to the same BVDV2 strain. **Vet Microbiol**, v. 114, n. 3-4, p. 196-204, 2006.

RIDPATH, J.F. Bovine viral diarrhea virus: global status. **Vet Clin North Am Food Anim Pract**, v. 26, n. 1, p. 105-21, table of contents, 2010a.

RIDPATH, J.F.; FULTON, R.W.; KIRKLAND, P.D.; NEILL, J.D. Prevalence and antigenic differences observed between Bovine viral diarrhea virus subgenotypes isolated from cattle in Australia and feedlots in the southwestern United States. **J Vet Diagn Invest**, v. 22, n. 2, p. 184-91, 2010b.

RIDPATH, J. The contribution of infections with bovine viral diarrhea viruses to bovine respiratory disease. **Vet Clin North Am Food Anim Pract**, v. 26, n. 2, p. 335-48, 2010c.

RIDPATH, J.F. Immunology of BVDV vaccines. **Biologicals**, v. 41, n. 1, p. 14-9, 2013.

ROSSMANITH, W.; JACKOVA, A.; APPEL, F.; WILHELM, E.; VILCEK, S. Analysis of BVDV isolates and factors contributing to virus transmission in the final stage of a BVDV eradication program in lower Austria. **Berl Munch Tierarztl Wochenschr**, v. 127, n. 1-2, p. 12-8, 2014.

SALIKI, JT; DUBOVI, E.J. Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhea virus infections. **Vet Clin North Am Food Anim Pract**, v.20, p.69-83, 2004.

SCHIRRMIEIER, H.; STREBELOW, G.; DEPNER, K.; HOFFMANN, B.; BEER, M. Genetic and antigenic characterization of an atypical pestivirus isolate, a putative member of a novel pestivirus species. **J Gen Virol**, v. 85, n. Pt 12, p. 3647-52, 2004.

STAHL, K.; ALENIUS, S. BVDV control and eradication in Europe--an update. **Jpn J Vet Res**, v. 60 Suppl, p. S31-9, 2012.

STALDER, H.P.; MEIER, P.; PFAFFEN, G.; WAGECK-CANAL, C.; RUFENACHT, J.; SCHALLER, P.; BACHOFEN, C.; MARTI, S.; VOGT, H.R.; PETERHANS, E. Genetic heterogeneity of pestiviruses of ruminants in Switzerland. **Prev Vet Med**, v. 72, n. 1-2, p. 37-41; discussion 215-9, 2005.

STRONG, R.; ERRINGTON, J.; COOK, R.; ROSS-SMITH, N.; WAKELEY, P.; STEINBACH, F. Increased phylogenetic diversity of bovine viral diarrhoea virus type 1 isolates in England and Wales since 2001. **Vet Microbiol**, v. 162, n. 2-4, p. 315-20, 2013.

TAJIMA, M. Bovine viral diarrhoea virus 1 is classified into different subgenotypes depending on the analyzed region within the viral genome. **Vete Microbiol**, v. 99, n. 2, p. 131-8, 2004.

VILCEK, S.; DURKOVIC, B.; KOLESAROVA, M.; GREISER-WILKE, I.; PATON, D. Genetic diversity of international bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates: identification of a new BVDV-1 genetic group. **Vet Res**, v. 35, n. 5, p. 609-15, 2004.

VILCEK, S.; RIDPATH, J.F.; VAN CAMPEN, H.; CAVENDER, J.L.; WARG, J. Characterization of a novel pestivirus originating from a pronghorn antelope. **Virus Res**, v. 108, n. 1-2, p. 187-93, 2005.

WALZ, P.H.; GROOMS, D.L.; PASSLER, T.; RIDPATH, J.F.; TREMBLAY, R.; STEP, D.L.; CALLAN, R.J.; GIVENS, M.D. Control of Bovine Viral Diarrhoea Virus in Ruminants. **J Vet Intern Med**, v. 24, p. 476-486, 2010.

XIA, H.; VIJAYARAGHAVAN, B.; BELAK, S.; LIU, L. Detection and identification of the atypical bovine pestiviruses in commercial foetal bovine serum batches. **PLoS One**, v. 6, n. 12, p. e28553, 2011.

XIA, H.; LARSKA, M.; GIAMMARIOLI, M.; DE MIA, G.M.; CARDETI, G.; ZHOU, W.; ALENIUS, S.; BELAK, S.; LIU, L. Genetic detection and characterization of atypical bovine pestiviruses in foetal bovine sera claimed to be of Australian origin. **Transbound Emerg Dis**, v. 60, n. 3, p. 284-8, 2013.

YESILBAG, K.; FORSTER, C.; OZYIGIT, M.O.; ALPAY, G.; TUNCER, P.; THIEL, H.J. AND KONIG, M. Characterisation of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates from an outbreak with haemorrhagic enteritis and severe pneumonia, **Vet Microbiol**, v. 169, n. 1-2, p.42-49, 2014.

ZIMMER, G.M, VAN MAANEN, C; DE GOEY I. The effect of maternal antibodies on the detection of bovine virus diarrhoea virus in peripheral blood samples. **Vet Microbiol**, v. 100, p.145-149, 2004.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar o perfil da infecção pelo BVDV em uma unidade de criação de bezerras leiteiras.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Amplificar o RNA do BVDV em animais virêmicos por meio da técnica RT-PCR;
- Identificar os animais transitoriamente infectados (TIs) e persistentemente infectados (PIs);
- Determinar a sequência de nucleotídeos de produtos com 288 pares de base do segmento 5'UTR do genoma do BVDV amplificados por meio da RT-PCR;
- Reconstruir a árvore filogenética das cepas do BVDV identificadas em animais PIs e TIs.

4 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO¹

INFECTION PROFILE OF BOVINE VIRAL DIARRHEA VIRUS IN A DAIRY CALF
REARING UNIT

¹ Artigo editado de acordo com as normas do periódico **Tropical Animal Health and Production** disponível em: <http://www.springer.com/life+sciences/animal+sciences/journal/11250>

INFECTION PROFILE OF BOVINE VIRAL DIARRHEA VIRUS IN A DAIRY CALF REARING UNIT

ABSTRACT

The profile of bovine viral diarrhea virus (BVDV) infection was evaluated in a dairy calf rearing unit located in the Western region of Paraná state, Brazil. The rearing unit received mixed breed female calves from 45 small dairy herds of household production. Calves arrived at the unit with 2-5 days of age and were kept a collective barn with up to 25 animals. Except for the compulsory control of brucellosis and tuberculosis the health management in each herd was not monitored. Since the BVDV infection might cause the birth of persistently infected (PI) calves and no of the dairy herds has been vaccinated for the control and prevention of this virus, the BVDV infection was chosen as a study model. In order to assess the frequency of BVDV infection in the animals kept in the unit, two independent experiments, one longitudinal and the other cross-sectional, were conducted. In both surveys was performed a RT-PCR assay for partial amplification of the untranslated region (5'UTR) of BVDV genome in blood samples of calves to identify BVDV viremia. In the longitudinal study a group of 59 calves was monitored on day 1, 26, and 74 in order to identify PI calves. In the first evaluation all calves ($n=59$) were sampled. In the subsequent evaluations only positive or transiently infected animals identified during previous examinations were surveyed. In the cross-sectional study, performed 44 days after the conclusion of the longitudinal study, BVDV infection was assessed through evaluation of new calves ($n=82$) introduced into the rearing unit after the previous study. In the longitudinal study the BVDV RNA was identified in the blood samples of 22/59 (37.3%), 11/22 (18.6%), and 3/11 (5.1%) calves in the first, second, and third serum collections, respectively. The BVDV RNA was detected by RT-PCR in blood samples of 39/82 (47.6%) calves evaluated in the cross-sectional study. Nucleotide sequencing and phylogenetic analysis of the *amplicons* identified the BVDV-1a and -1b subgenotypes in PI and TI calves. The results of both longitudinal and cross-sectional studies demonstrate that the introduction and retention of PI animals with BVDV in a calf rearing unit is responsible for maintaining the high proportion of viremic animals and the spread of infection. Additionally, the results of this study show that as in high Brazilian producing dairy herds the BVDV infection also can be a health concern in household production dairy herds.

Keywords: Cattle. BVDV. RT-PCR. Persistently infected. PI calf. Subgenotypes.

4.1 INTRODUCTION

Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) is a member of the genus *Pestivirus*, family *Flaviviridae* responsible for a number of clinical signs, including subclinical and acute infections, respiratory disease, reproductive failures, and mucosal disease (Baker 1995).

The BVDV infection causes considerable economic losses in the dairy industry, mainly attributable to reduced milk production and reproductive performance, delayed growth, increased susceptibility to other diseases, early culling, and increased mortality among young stock (Houe 2003).

The pestivirus genome is a single-stranded, positive sense RNA, which comprises two untranslated regions (UTRs) at the 5'-and 3'-ends, and one open reading frame (ORF) encoding a large polyprotein (Ridpath *et al.* 1994).

Currently, two species of BVDV are recognized by the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV 2012) BVDV-1 and -2, that together with border disease virus and classical swine fever virus constitute the four accepted species of the genus *Pestivirus*. Although not recognized by the ICTV, BVDV-1 and -2 can be further subdivided into at least 18 (BVDV-1a – 1r) (Gao *et al.* 2013; Yesilbag *et al.* 2014) and two (BVDV-2a–2b) (Flores *et al.* 2002) subgenotypes, respectively.

There are two BVDV biotypes, that are differentiated according to the ability to inducing death in cultured cells (cytopathic biotype, cp) or failing to induce cell death (noncytopathic biotype, ncp). The BVDV cp viruses arise from BVDV ncp strains by an event of mutation that results in cleavage of the non-structural viral protein NS2/3 to generate NS2 and NS3 proteins. The RNA recombination with the host cell, point mutations, translocations and gene duplication are often observed in events that result in change of biotypes (Becker 2000).

A development condition of BVDV is the persistent infection that occurs if a susceptible pregnant cow is infected with an ncp BVDV strain at 40 to 120 days of gestation. The result is that the immune system of the persistently infected (PI) animal does not recognize BVDV as a foreign antigen accepting the virus as self-antigen. These PI animals are a major source of viral spread of BVDV between herds during their entire life (Polak and Zmudzinski 2000).

The BVDV diagnostic have been focused on the detection of PI animals. The major diagnostic techniques employed are antigen detection by immunohistochemistry,

antigen capture ELISA and nucleic acid detection by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). However, these techniques might not be able to distinguish between acute and persistent infection. Therefore, two positive analyses from clinical samples collected at least three weeks apart are necessary to diagnose PI animals (Ridpath 2010).

As the birth of PI calves is the most important epidemiological event in the BVDV dissemination in cattle herds the aim of this study was to evaluate the BVDV infection profile in a dairy calf rearing unit.

4.2 MATERIALS AND METHODS

Calf Rearing Unit

The dairy calf rearing unit evaluated is located in western of Parana State, Brazil. The unit received female calves in the first week after birth from 45 small dairy herds across the region. The mixed breed calves arrived at the rearing unit with 2-5 days of age and were placed together in barn holding up to 25 animals without any segregation of the animals based on their herds origin. For about 60 days the calves were housed together in barns, where they received milk replacer. Thereafter, they were placed in another barn and weaned. The sanitary status of the origin dairy herds was unknown and no vaccine practice was performed for BVDV control infection. The only compulsory sanitary management of all dairy herds was for brucellosis and tuberculosis according to the National Program for Control and Eradication of Brucellosis and Tuberculosis (Brasil, 2001).

Study design

Longitudinal study

In the longitudinal study a total of 59 blood samples of calves between 9 to 103 days of age were evaluated on day 1, 26, and 74 by RT-PCR assays in order to detect PI animals. The methodology used to classify PIs animals was performed according to Ridpath (2010) where two consecutive tests of biological samples with a minimum interval of 3 weeks are needed to differentiate PIs and TIs infected animals. In the first evaluation all animals were sampled and subsequent evaluation was realized only the positive animals in the previous examination. The blood samples, were taken by disposable needles for each calf and

placed in Vacutainer® with ethylenediamine tetra-acetic acid (EDTA) tubes. For viral RNA extraction the leukocytes were taken of blood samples after sedimentation.

Cross-sectional study

In order to evaluate the BVDV dissemination in calf rearing unit a cross-sectional study was conducted forty-four days after conclusion of the longitudinal study. Newly acquired animals were incorporated in the calf rearing unit during the longitudinal study. The calves had 43 to 148 days of age and just one collection of blood sample was conducted from 82 animals.

RNA extraction

The RNA extraction of blood samples was performed using TRIzol™ reagent (Invitrogen™, Life Technologies, USA) according to manufacturer instructions, storage at -20°C until use.

RT-PCR amplification

The RT-PCR was performed using the panpestivirus primers (324, *forward* 5'ATG CCC WTA GTA GGA CTA GCA 3'; and 326, *reverse* 5'TCA ACT CCA TGT GCC ATG TAC 3'), designed to amplify a product with 288 base pairs (bp) from the 5'UTR of the BVDV genome (Vilcek *et al.* 1994). The RT-PCR reactions were performed as described by (Lunardi *et al.* 2008). Aliquots of ultrapure sterile water and the BVDV NADL strain were included as negative and positive control, respectively. The *amplicons* obtained were submitted to electrophoresis in 2% agarose gel in TBE buffer, stained with ethidium bromide, and visualized under UV light.

Phylogenetic analyses

The best quality RT-PCR products amplified from blood samples of calves were selected and purified using the GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK), quantified with a Qubit® Fluorometer (Invitrogen Life Technologies, Eugene, OR, USA), and sequenced in an ABI3500 Genetic

Analysed sequencer using the forward and reverse primers with the BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Sequence quality analysis was carried out using Phred software, and the contig assembly was obtained using the CAP3 software (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>). Sequence similarities were performed using the BLAST software (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), to verify the nucleotide similarity with sequences that are deposited in GenBank. The phylogenetic tree and the nucleotide matrix identity were realised using the MEGA version 6.05 and Bioedit version 7.0.5.3 software, respectively. The analyses were based on the neighbor-joining method from the Kimura 2-parameter model. Bootstrapping was statistically supported with 1,000 replicates. The referenced sequences included in this study were acquired from the National Center for Biotechnology Information, USA (GenBank) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/>).

4.3 RESULTS

In the longitudinal study the BVDV RNA was identified in the blood samples of 22/59 (37.3%), 11/22 (18.6%), and 3/11 (5.1%) calves on day 1, 26, and 74, respectively (Table 1). The positive animals in the third collection (day 74) were classified as PI and the remaining animals were designated as transiently infected (TI) (Ridpath, 2010). Sequence analyses obtained from the RT-PCR products showed that two BVDV PI calves were infected with BVDV-1b subgenotype and the other PI calf with BVDV-1a subgenotype. The BVDV subgenotypes 1a and 1b were identified in five and two TI calves, respectively (Table 2).

The phylogenetic analysis, based on the sequences obtained from the 5'UTR region of four isolates is shown in Fig. 1. This analysis demonstrated that the UEL6-BR/11 and UEL7-BR/11 strains derived from TI and PI calf, respectively, clustered with BVDV subgenotype 1a and the UEL8-BR/11 and UEL9-BR/11 strains derived also from a TI and PI calf, respectively, clustered with BVDV subgenotype 1b.

The GenBank accession numbers of the sequences obtained in this study are: TI calf-UEL6-BR/11 (KJ188146), PI calf-UEL7-BR/11 (KJ188147), TI calf-UEL8-BR/11 (KJ188148) and PI calf-UEL9-BR/11 (KJ188149).

In the cross-sectional study the BVDV RNA was identified in the blood sample of 39/82 (47.6%) calves. Nucleotide sequencing of one RT-PCR amplified product was performed and the BVDV-1b subgenotype was identified. As just one blood sample

collection was carried out in this evaluation the positive calves in this sampling were considered TI calves.

4.4 DISCUSSION

Through RT-PCR analysis of three blood samplings from 59 female calves evaluated in the longitudinal study it was possible to detect three PI animals into the dairy calf rearing unit. The prevalence of PI animals identified in the present study was 5.1% (3/59) which is consider higher than most of the surveys that have demonstrated prevalence rates varying between 0.5 and 2% of PI animals within infected herds (Houe 1999).

However, the high prevalence of PI animals may be justified due to the fact that the calves in the rearing unit originated from at least 45 distinct herds. All farms were classified as open due to buy and sell heifers and cows for replacement and the sanitary management were deficient and none conduct was adopted to control and prophylaxis of BVDV infection. Thereby, as the calves were from multiple origins the probability of a concentration of PI animals in the rearing unit was much higher.

Studies done in Brazilian cattle herds demonstrated an incidence of 1.2% of PI animals within herds with reproductive problems (Dias *et al.* 2010) and 0.29 to 0.43% of PI animals in an open dairy cattle herd, with regular BVDV vaccination program; (Otonel *et al.* 2014).

To our knowledge no study has been conducted in Brazil in order to indicate the presence of PI animals in a dairy calf rearing unit that receive animals from different herds without sanitary control. In this study the high rates of viral circulation, ranging among 37.3% (longitudinal survey) and 47.6% (cross-sectional survey), identified in blood samples of the calves is probably due to the contact with the PI calves.

The PI cattle are considered a principal reservoir or source of BVDV infection because these animals shed the virus throughout their life and ensures that BVDV is circulation in the herd. The diagnostic tests such as immunohistochemistry (IHC) (Fulton *et al.*, 2009) virus isolation, and RT-PCR are necessary to identify PI animals (Fulton *et al.* 2003; Ridpath 2010).

In this study both longitudinal and cross-sectional surveys demonstrated high rates of positive blood samples indicating widespread dissemination of BVDV infection. In the longitudinal study it was possible to monitor the status of the dairy calf rearing unit through analyses of blood samples from calves with the identification of three persistently

infected calves. This systematic analysis with at least two positive tests for BVDV is required for control measures such as remove of PI animals identified in a herd.

A second evaluation conducted through a cross-sectional study in the same calf rearing unit was performed 44 days at the longitudinal study. All female calves arrived the rearing unit at the end of the longitudinal study and by second survey, it was possible to verify the status of BVDV infection yet confirming viral circulation by the introduction of newly female calves without any sanitary control in the rearing unit.

In the cross-sectional study it was not possible to detect further PI animals because only one test was carried out. However, the high prevalence of positive animals (47.6%) could be providing an indirect evidence of the presence of additional PI calves into the unit since the PIs animals identified in the longitudinal study were no longer in the rearing unit in the period which the cross-sectional study was conducted.

The phylogenetic data suggest that PIs calves belonging to different herds were responsible for spreading two different subgenotypes of BVDV among the TI calves demonstrating that viral infection with BVDV-1a subgenotype was predominant in the blood samples evaluated.

In this study, the 5'UTR sequences were used for the identification of the BVDV subgenotypes. This short sequence permits rapid and accurate acquisition of sequence data, since it is a conserved region of the BVDV genome targets the initial phylogenetic analysis of BVDV (Mahony *et al.* 2005).

In Brazil the BVDV infection is widely distributed in beef and dairy cattle herds throughout the country and reproductive losses may be the most economically important consequence associated with BVDV infection (Dias *et al.* 2010; Dezen *et al.* 2013). The ability of BVDV to cross the placental barrier during pregnancy can cause infertility, declining conception rates, embryonic death, abortion, and stillbirth (Houe *et al.* 1993; Grooms 2004).

Analyses of BVDV isolates from many countries have shown that the diversity of subgenotypes predominate in different geographical regions (Booth *et al.* 2013). The BVDV-1a, -1b, BVDV-2a, and -2b subgenotypes are the main prevalent isolates in cattle herds of Brazil (Cortez *et al.* 2006; Dias *et al.*, 2012; Otonel *et al.* 2014).

The results of the study demonstrated that in a calf rearing unit a systematic approach such as diagnostic tests of all calves and removal of PI calves before entry into the unit is critical for the control of BVDV. Additionally, this study showed that as in high

producing dairy cattle herds, the BVDV infection also can be a health concern in household production dairy herds with unknown health status.

Figure1 – Phylogenetic tree demonstrating the typing of BVDV-1 strains by the 5'UTR indicates that the TI calf-UEL6-BR/11 and PI calf-UEL7-BR/11 isolates grouped in the subgenotype BVDV-1a. The other isolates TI calf-UEL8-BR/11 and PI calf-UEL9-BR/11 grouped within subgenotype BVDV-1b. The PI and TI calves are indicated by red and blue diamonds, respectively. The tree was prepared using 220 nucleotides of evaluated BVDV-1, BVDV-2 and HoBi-like strains, using the neighbour-joining algorithm with Kimura 2-parameters. Statistical confidence values were calculated using Mega v.6.0. software with 1,000 bootstrap replicates. The GenBank accession numbers of the sequences included in these analyses are indicated between brackets.

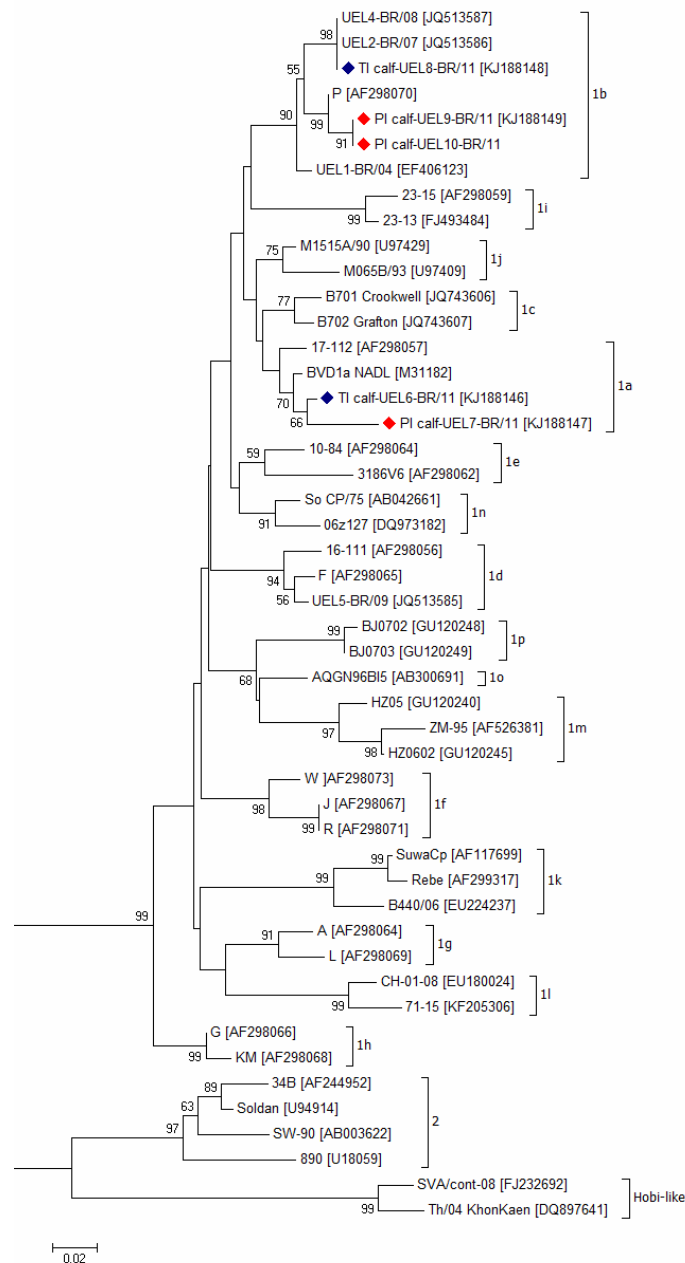


Table 1 – BVDV RNA detection by RT-PCR in blood samples of calves in a longitudinal study carried out in a dairy calf rearing unit in Parana State, Brazil

Sampling Evaluated	Nº animals	
	Evaluated	Positive
Day 1	59	22 (37.3%)
Day 26	22	11 (18.6%)
Day 74	11	3 (5.1%)

Table 2 – BVDV subgenotypes identified in the longitudinal study in transiently (TI) and persistently infected (PI) animals of a dairy calf rearing unit

Infection type	Calf	BVDV subgenotype
TI	1	1a
	2	1a
	3	1a
	4	1a
	5	1a
	6	1b
	7	1b
PI	8	1a
	9	1b
	10	1b

4.5 REFERENCES

Baker, J.C., 1995. The clinical manifestations of bovine viral diarrhoea infection, *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 11, 425-445

Becker, Y., 2000. Evolution of viruses by acquisition of cellular RNA or DNA nucleotide sequences and genes: an introduction, *Virus Genes*, 21, 7-12

Booth, R.E., Thomas, C.J., El-Attar, L.M., Gunn, G. and Brownlie, J., 2013. A phylogenetic analysis of Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) isolates from six different regions of the UK and links to animal movement data, *Vet Res*, 44, 43

Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 2, de 10 de janeiro de 2001. Estabelece o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, D.F., 11 jan. 2001. Seção 1, p. 5

Cortez, A., Heinemann, M.B., Castro, A.M.M.G.d., Soares, R.M., Pinto, A.M.V., Alfieri, A.A., Flores, E.F., Leite, R.C. and Richtzenhain, L.J., 2006. Genetic characterization of Brazilian bovine viral diarrhoea virus isolates by partial nucleotide sequencing of the 5'-UTR region, *Pesq Vet Bras*, 26, 211-216

- Dezen, S., Otonel, R.A.A., Alfieri, A.F., Lunardi, M. and Alfieri, A.A., 2013. Perfil da infecção pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV) em um rebanho bovino leiteiro de alta produção e com programa de vacinação contra o BVDV, *Pesq Vet Bras*, 33, 141-147
- Dias, F.C., Médici, K.C., Alexandrino, B., Medeiros, A.S.R., Alfieri, A.A. and Samara, S.I., 2010. Ocorrência de animais persistentemente infectados pelo vírus da diarreia viral bovina em rebanhos bovinos nos Estados de Minas Gerais e São Paulo, *Pesq Vet Bras*, 30, 933-939
- Dias, F.C., Médici, K. C., Souza, R.L.M., Alfieri, A. A., Samara, S.I., 2012. Genetic characterization of bovine viral diarrhoea virus detected in persistently infected cattle in Southern Minas Gerais, Brazil. *Braz J Vet Res Anim Sci*, 49, 452-458
- Flores, E.F., Ridpath, J.F., Weiblen, R., Vogel, F.S. and Gil, L.H., 2002. Phylogenetic analysis of Brazilian bovine viral diarrhoea virus type 2 (BVDV-2) isolates: evidence for a subgenotype within BVDV-2, *Virus Res*, 87, 51-60
- Fulton, R.W., Ridpath, J.F., Confer, A.W., Saliki, J.T., Burge, L.J. and Payton, M.E., 2003. Bovine viral diarrhoea virus antigenic diversity: impact on disease and vaccination programmes, *Biologicals*, 31, 89-95
- Gao, S., Luo, J., Du, J., Lang, Y., Cong, G., Shao, J., Lin, T., Zhao, F., Belak, S., Liu, L., Chang, H. and Yin, H., 2013. Serological and molecular evidence for natural infection of Bactrian camels with multiple subgenotypes of bovine viral diarrhoea virus in Western China, *Vet Microbiol*, 163, 172-176
- Grooms, D.L., 2004. Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhoea virus, *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 20, 5-19
- Houe, H., 1999. Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections, *Vet Microbiol*, 64, 89-107
- Houe, H., 2003. Economic impact of BVDV in dairies, *Biologicals*, 31, 137-143
- ICVT, 2012. International Committee on Taxonomy of Viruses <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?taxnode_id=20123618> Accessed in: 8 fev. 2014.
- Lunardi, M., Headley, S.A., Lisboa, J.A., Amude, A.M. and Alfieri, A.A., 2008. Outbreak of acute bovine viral diarrhoea in Brazilian beef cattle: clinicopathological findings and molecular characterization of a wild-type BVDV strain subtype 1b, *Res Vet Sci*, 85, 599-604
- Mahony, T.J., McCarthy, F.M., Gravel, J.L., Corney, B., Young, P.L. and Vilcek, S., 2005. Genetic analysis of bovine viral diarrhoea viruses from Australia, *Vet Microbiol*, 106, 1-6
- Otonel, R.A., Alfieri, A.F., Dezen, S., Lunardi, M., Headley, S.A. and Alfieri, A.A., 2014. The diversity of BVDV subgenotypes in a vaccinated dairy cattle herd in Brazil, *Trop Anim Health Prod*, 46, 87-92
- Polak, M.P. and Zmudzinski, J.F., 2000. Experimental inoculation of calves with laboratory strains of bovine viral diarrhoea virus, *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 23, 141-151
- Ridpath, J.F., Bolin, S.R. and Dubovi, E.J., 1994. Segregation of bovine viral diarrhoea virus into genotypes, *Virology*, 205, 66-74

Ridpath, J.F., Bolin, S.R. and Dubovi, E.J., 1994. Segregation of bovine viral diarrhoea virus into genotypes, *Virology*, 205, 66-74

Ridpath, J.F., 2010. Bovine viral diarrhoea virus: global status, *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 26, 105-121,

Vilcek, S., Herring, A.J., Herring, J.A., Nettleton, P.F., Lowings, J.P. and Paton, D.J., 1994. Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis, *Arch Virol*, 136, 309-323

Yesilbag, K., Forster, C., Ozyigit, M.O., Alpay, G., Tuncer, P., Thiel, H.J. and Konig, M., 2014. Characterisation of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates from an outbreak with haemorrhagic enteritis and severe pneumonia, *Vet Microbiol*, 169, 42-49

5 CONCLUSÃO

- Unidades de criação de bezerras que não adotam critérios sanitários prévios para a entrada de animais constituem condições epidemiológicas propícias para a ampla disseminação do BVDV com altas taxas de animais TI e PI, além da manutenção de uma diversidade de subgenotipos virais.

APÊNDICES

APÊNDICE A
Lista de reagentes

1. 100 mM dNTP Set, 4 x 250 μ L; 25 μ mol 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 ($C_2H_6O_2$) P.M. 78,13 (Fluka®)
5. Acetona, P.A. (CH_3COCH_3) P.M. 58,08 (Dinâmica®)
6. Ácido acético glacial, P.A. (CH_3COOH) P.M. 60,05 (Nuclear®)
7. Ácido bórico (H_3BO_3) P.M. 61,83
8. Ácido clorídrico (HCl) P.M. 36,46 (Reagen®)
9. Ácido etilenodiaminotetraácido Sal di-sódico – EDTA, P.A. ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$) P.M. 372,24 (Reagen®)
10. Agarose (Gibco BRL®)
11. Álcool etílico absoluto (C_2H_5OH) P.M. 46,07 (Nuclear®)
12. Álcool isoamílico ($(CH_3)_2CHCH_2CH_2OH$) 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. ($CHCl_3$) P.M. 119,38 (Dinâmica®)
17. Dodecil Sulfato de Sódio – Lauril Sulfato de Sódio – SDS ($C_{12}H_{25}NaO_4S$) P.M. 288,38 (Synth®)
18. Ethidium bromide ($C_{21}H_{20}N_3Br$) 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. (CH_3OH) 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* (SiO_2) P.M. 60,08 (Sigma®)

APÊNDICE B
Soluções e Tampões

- **Tampão de Amostra**
 - Azul de bromofenol 0,25%
 - Sacarose – sucrose ($C_{12}H_{22}O_{11}$) 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 q.s.p. 1L

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 (Na_2HPO_4)
 - 15 mM fosfato de potássio monobásico ($K_2H_2PO_4$)
 - Água ultrapura autoclavada q.s.p. 1L

pH 7,2
- **Oligonucleotídeos**
 - 324 *sense* (5' atg ccc wta gta gga cta gca 3' onde W=A ou T, nt 108–128) (Invitrogen Life Technologies®)
 - 326 *anti-sense* (5' tca act cca tgt gcc atg tac 3' – nt 375–395) (Invitrogen Life Technologies®)
- **Preparação dos oligonucleotídeos**

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

$$\frac{\text{Concentração em nm x 1000}}{200 \text{ pmol}} = \text{volume em } \mu\text{L de água ultrapura a ser adicionado}$$

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

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

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

$$200 \text{ pmol}$$

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

Para uso: Diluir 10 μL de primer mãe em 90 μL de água ultrapura.

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

$$200 \text{ pmol}$$

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

Para uso: Diluir 10 μL de primer mãe em 90 μL de água ultrapura.

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

$$200 \text{ pmol}$$

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

Para uso: Diluir 10 μL de primer mãe em 90 μL de água ultrapura.

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

$$200 \text{ pmol}$$

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

Para uso: Diluir 10 μL de primer mãe em 90 μL de água ultrapura.

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 utilizando reagente Trizol**

1. Adicionar 250 μ L de amostra em microtubos plásticos
2. 750 μ l de Trizol
3. 200 μ L de Clorofórmio
4. Agitar o microtubo em vortex por 15s
5. Incubar por 15 min a temperatura ambiente
6. Centrifugar por 15 min a 12.000 x g (2 a 8°C)
7. Recolher a fase aquosa e transferir para outro microtubo.
8. Adicionar 500 μ L de propanol
9. Homogeneizar com a pipeta e incubar por 10 min a temperatura ambiente
10. Centrifugar por 10 min a 12.000 x g (2 a 8°C)
11. Irá formar um “pellet” de gel
12. Remover o sobrenadante por inversão e secar com papel
13. Adicionar 1000 μ L de etanol 75%
14. Vortexar
15. Centrifugar por 5 min a 7.500 x g (2 a 8°C)
16. Descartar o sobrenadante e deixar secar em temperatura ambiente
17. Adicionar 30 μ L de água DEPEC
18. Vortexar
19. Incubar por 10 min a 56°C
20. Spin
21. Recolher o sobrenadante

Reações da PCR

Mix Den

Água (2 μ L)
Primer 326 (1 μ L)

Mix PCR

Água (34 μ L)
Buffer 10 x (5 μ L)
Dntp (2 μ L)
MgCl₂ (1,5 μ L)
Primer 326 (1 μ L)
Primer 324 (1 μ L)
Taq (0,5 μ L)

Mix RT

Água (3,1 μ L)
Buffer 10x (2 μ L)
Dntp (2 μ L)
MgCl₂ (0,6 μ L)
mmLV (0,3 μ L)

3 μ L Mix Den

8 μ L Mix RT

5 μ L cDNA

45 μ L Mix PCR

9 μ L RNA

Programas:

DEN

97° 4'

RT

-42° 30',

-95° 5'

PCR

-94° 1' }

-56° 1' }

-72° 1' }

40 ciclos

-72° 7' Extensão Final

-4 ° Forever

Adicionar 3 μ l do Mix Den + 9 μ l do RNA e desnaturação por 4 minutos, em seguida banho de gelo por 3 minutos

Acrescentar 8 μ l do Mix RT no Mix da Den (Após desnaturação) e 30 minutos de transcriptase reversa

Adicionar 5 μ l do cDNA em 45 μ l do Mix da PCR

- **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 / 30 s
 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 / 30 s
 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 / 30 s
 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 Qubit™ fluorometer (Invitrogen™ Life Technologies, EUA)**

1. Preparar a solução *Quant-iT™ Working Solution* diluindo o reagente *Quant-iT™* no *Buffer Quant-iT™*, 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-iT™ Working Solution* a 2 µL do DNA purificado.
4. No microtubo do padrão 0 adicionar 190 µL da solução *Quant-iT™ Working Solution* a 10 µL do padrão 0.
5. No microtubo do padrão 100 adicionar 190 µL da solução *Quant-iT™ 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 *Qubit™ fluorometer (Invitrogen™ Life Technologies, EUA)*
9. Multiplicar pelo fator de diluição para determinar a concentração correta da amostra.