

LARICE BRUNA FERREIRA SOARES

**OCORRÊNCIA DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA DIARREIA
VIRAL BOVINA (BVDV) E RINOTRAQUEÍTE INFECCIOSA
BOVINA (IBR) EM BUFÁLOS NO ESTADO DE PERNAMBUCO**

GARANHUNS

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO – UFRPE
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE E
REPRODUÇÃO DE RUMINANTES – PGRSS

LARICE BRUNA FERREIRA SOARES

OCORRÊNCIA DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA DIARREIA
VIRAL BOVINA (BVDV) E RINOTRAQUEÍTE INFECCIOSA
BOVINA (IBR) EM BUFÁLOS NO ESTADO DE PERNAMBUCO

Dissertação apresentada ao Programa de Sanidade e Reprodução de Ruminantes da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Sanidade e Reprodução de Ruminantes

Orientador: Prof. Dr. José Wilton Pinheiro Junior

GARANHUNS

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO – UFRPE
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE E
REPRODUÇÃO DE RUMINANTES – PGRSS

OCORRÊNCIA DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA DIARREIA
VIRAL BOVINA (BVDV) E RINOTRAQUEÍTE INFECCIOSA
BOVINA (IBR) EM BUFÁLOS NO ESTADO DE PERNAMBUCO

Dissertação elaborada por:

LARICE BRUNA FERREIRA SOARES

Aprovada em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. José Wilton Pinheiro Junior

Presidente da Banca – Departamento de Medicina Veterinária/UFRPE

Profa. Dra. Rita de Cássia de Carvalho Maia
Departamento de Medicina Veterinária/UFRPE

Prof. Dr. Huber Rizzo
Departamento de Medicina Veterinária/UFRPE

DEDICATÓRIA

À Deus.

À minha mãe, Maria José Ferreira Rodrigues.

Às minhas irmãs e irmão.

Ao meu noivo, João Luciano de Andrade Melo Junior.

AGRADECIMENTOS

- À Deus, por estar ao meu lado em todas as circunstâncias, dando-me força e fé, para reerguer-me nos momentos difíceis.
- À minha mãe, Maria José Ferreira Rodrigues, pela educação, dedicação e amor incondicional, que me fizeram chegar até aqui.
- Ao meu pai, Bento José Soares Neto.
- Às minhas irmãs e irmão, Luciana Ferreira Rodrigues, Liliane Ferreira Soares, Brena Lays Ferreira Soares e Naldo Ferreira Soares, pelo incentivo e companheirismo.
- Ao meu noivo, João Luciano de Andrade Melo Junior, por todo apoio, incentivo, paciência e amor, essenciais durante esse período.
- Aos meus sogros, João Luciano de Andrade Melo e Maria Ferreira da Silva.
- Aos meus familiares e amigos. Especialmente a Gabriella Anchieta S. Barros, pela amizade e disposição em ajudar.
- Ao professor, José Wilton Pinheiro Junior, pela orientação inestimável, paciência, dedicação, amizade e confiança. Serei sempre grata.
- Aos amigos, Bruno Pajeú e Silva; Jonas Borges de Melo; Júnior Mário Baltazar de Oliveira; Allison Alves de Macêdo, Antônio Fernando Barbosa Batista Filho, Grasiene Meneses Silva e Breno Bezerra Aragão, pelo auxílio e apoio dado durante a realização do experimento.
- A todos que fazem parte do Laboratório de viroses da UFRPE. Em especial, ao técnico Sérgio Alves do Nascimento, pelo auxílio durante a execução do experimento.
- À Unidade Acadêmica de Garanhuns da Universidade Federal Rural de Pernambuco, e ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Reprodução de Ruminantes, pela oportunidade do curso.
- Ao programa da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.
- A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização do presente trabalho.

“O SENHOR é a minha luz e a minha salvação; a quem temerei? O SENHOR é a força da minha vida; de quem me recearei? ”

Salmos 27:1

“O verdadeiro sábio é aquele que se coloca na posição de eterno aprendiz. ”

Sócrates

RESUMO

Objetivou-se com este estudo diagnosticar os aspectos epidemiológicos da infecção pelo vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) e Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR) em bubalinos no estado de Pernambuco, Brasil. Foram coletas de 244 amostras sanguíneas de búfalos procedentes dos municípios de Agrestina (n=5), Água Preta (n=50), Canhotinho (n=21), Quipapá (n=5), Ribeirão (n=113) e Rio Formoso (n=50). A pesquisa de anticorpos anti-BVDV e anti-BoHV-1 foi realizada pela técnica de virusneutralização (VN). Para análise de associação entre o *status* sorológico para infecção pelo BoHV-1 e os aspectos de manejo higiênico-sanitário e reprodutivo aplicou-se um questionário investigativo com perguntas objetivas, referentes às características gerais da propriedade, manejo produtivo, reprodutivo e sanitário. Observou-se uma ocorrência de 97,9% (239/244) de anticorpos anti-BVDV e 56,1% (137/244) anti-BoHV-1. Constatou-se co-infecção em 55,3% (135/244) dos animais. Observou-se que 100,0% das propriedades apresentaram pelo menos um animal positivo para as duas infecções. A distribuição da ocorrência de anticorpos em búfalos por propriedades variou de 90,5% a 100,0% para BVDV e de 4,8% a 100,0% para BoHV-1. Não foi possível realizar a análise de associação para à infecção pelo BVDV, entretanto, para à infecção pelo BoHV-1, as variáveis que apresentaram associação significativa foram: sistema de criação extensivo ($P < 0,001$); rebanho aberto ($P = 0,029$); ausência de descanso reprodutivo ($P = 0,029$); monta natural em fêmeas com problemas reprodutivos ($P < 0,001$); tipo de exploração ($P = 0,0014$); presença de animais silvestres ($P < 0,001$) e ausência de limpeza das instalações ($P = 0,008$). Conclui-se que as infecções pelo vírus da Diarreia Viral Bovina e Rinotraqueíte Infecciosa Bovina ocorrem em búfalos no estado de Pernambuco. Desta forma, sugere-se que medidas de profilaxia como o diagnóstico rotineiro, controle reprodutivo dos animais, e cuidados higiênicos-sanitários rigorosos devem ser implementados nas propriedades com o intuito de diminuir as perdas reprodutivas ocasionadas por estas infecções.

Palavras chave: BoHV-1, BVDV, epidemiologia.

ABSTRACT

The objective of this study was to diagnose the epidemiological aspects of Bovine Viral Diarrhea (BVDV) and Bovine Infectious Rhinotracheitis virus (IBR) in buffaloes in the state of Pernambuco, Brazil. A total of 244 buffalo blood samples collected from the municipalities of Agrestina (n = 5), Água Preta (n = 50), Canhotinho (n = 21), Quipapá (n = 5), Ribeirão (113) And Rio Formoso (n = 50). The search for anti-BVDV and anti-BoHV-1 antibodies was performed by the virus neutralization (VN) technique. To analyze the association between the serological status for BoHV-1 infection and the aspects of hygienic-sanitary and reproductive management, an investigative questionnaire was applied with objective questions regarding the general characteristics of the property, productive, reproductive and sanitary management. An occurrence of 97.9% (239/244) of anti-BVDV antibodies and 56.1% (137/244) anti-BoHV-1 was observed. Co-infection was observed in 55.3% (135/244) of the animals. It was observed that 100.0% of the properties showed at least one animal positive for both infections. The distribution of antibodies to buffaloes by properties varied from 90.5% to 100.0% for BVDV and from 4.8% to 100.0% for BoHV-1. It was not possible to perform the association analysis for BVDV infection; however, for the BoHV-1 infection, the variables that presented a significant association were: extensive breeding system ($P < 0.001$); Open herd ($P = 0.029$); Absence of reproductive rest ($P = 0.029$); Natural mating in females with reproductive problems ($P < 0.001$); Type of exploration ($P = 0.0014$); Presence of wild animals ($P < 0.001$) and absence of cleaning of the facilities ($P = 0.008$). It is concluded that Bovine Viral Diarrhea and Bovine Infectious Rhinotracheitis virus infections occur in buffaloes in the state of Pernambuco. Thus, it is suggested that prophylaxis measures such as routine diagnosis, animal reproductive control, and strict hygienic-sanitary care should be implemented in the properties in order to reduce the reproductive losses caused by these infections.

Key words: BoHV-1, BVDV, epidemiology.

LISTA DE TABELAS

Revisão de Literatura

Tabela 1.	Soroprevalência da infecção por BVDV em bubalinos dos diferentes países.	16
Tabela 2.	Soroprevalência da infecção por BoHV-1 em bubalinos em diferentes países.	23

Artigo

Table 1.	Occurrence of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and bovine herpesvirus type-1 (BoHV-1) infection in buffaloes by counties in Pernambuco state.	46
Table 2.	Occurrence of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and bovine herpesvirus type-1 (BoHV-1) infection in buffaloes by properties in Pernambuco state	47
Table 3.	Association analysis between serological status of bovine herpesvirus type-1 (BoHV-1) and hygienic-sanitary management aspects in buffaloes in Pernambuco state, Brazil, 2016.	48

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	13
	2.1 Geral	13
	2.2 Específicos	13
3	REVISÃO DE LITERATURA	14
	3.1 DIARREIA VIRAL BOVINA (BVD)	14
	3.1.1 Vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV)	14
	3.1.2 Epidemiologia	15
	3.1.3 Patogenia	17
	3.1.4 Sinais clínicos	18
	3.1.5 Diagnóstico	19
	3.1.6 Profilaxia	20
	3.2 RINOTRAQUEÍTE INFECCIOSA BOVINA (IBR)	21
	3.2.1 Herpesvírus bovino tipo – 1	21
	3.2.2 Epidemiologia	22
	3.2.3 Patogenia	24
	3.2.4 Sinais clínicos	25
	3.2.5 Diagnóstico	26
	3.2.6 Profilaxia	27
4	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
5	ARTIGO CIENTÍFICO	40
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	58
7	APÊNDICE A. Questionário Investigativo	59
8	APÊNDICE B. Termo de Autorização	61
10	ANEXO A. Licença para uso de animais em pesquisa	62

1. INTRODUÇÃO

No Brasil a bubalinocultura tem apresentado crescente desenvolvimento, por ser uma alternativa rentável, devido à adaptabilidade desses animais aos mais variados ambientes, elevada fertilidade e longevidade produtiva (MAPA, 2015). O número de búfalos no Brasil está em torno de 1,2 milhões de cabeças (IBGE, 2011). O Nordeste possui 135 mil bubalinos, concentrados principalmente nos estados do Maranhão, Ceará e Pernambuco ocupando a terceira colocação com aproximadamente 10.500 animais (MAPA, 2015).

Os bubalinos são suscetíveis a infecções virais, frequentemente associadas a patologias de importância na bovinocultura (AHMED; ZAHER, 2008; MAHMOUD et al., 2009). Entre as inúmeras doenças infecciosas, a Diarreia Viral Bovina (BVDV) e a Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR) são consideradas enfermidades que causam um impacto negativo para a bubalinocultura (CRAIG et al., 2015; NAGAROL et al., 2014). Estas, reduzem a produtividade dos rebanhos (RONCORONI et al., 2007).

As principais perdas relacionadas ao BVDV, resultam da infecção de fêmeas prenhes, podendo ocorrer absorção embrionária, abortamentos, mumificações, natimortalidade, malformações fetais, nascimento de crias fracas, animais persistentemente infectados (PI) (FLORES et al., 2005). Em búfalos o BVDV foi associado a distúrbios reprodutivos, principalmente repetição de cio e abortos (AHMED; ZAHER, 2008). Vacas que se infectam antes de 150 dias de gestação podem levar ao nascimento de bezerras imunotolerantes, ou seja, persistentemente infectados (PI) (CRAIG et al., 2015). Acredita-se que a patogênese em bubalinos seja semelhante à dos bovinos (MAHMOUD et al., 2009).

A infecção pelo herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) é responsável por significativas perdas produtivas, devido ao menor desenvolvimento entre animais jovens, diminuição da produção leiteira e do ganho de peso, interferindo no desempenho reprodutivo do rebanho (MAHMOUD et al., 2009). BoHV-1 afeta principalmente, os tratores respiratório e genital de bovinos, apresentando como característico da infecção a vulvovaginite pustular infecciosa (IPV) e balanopostite pustular infecciosa (IPB). Raramente há ocorrência conjunta das formas genital e respiratória da doença (FINO et al., 2012). Em búfalos, a infecção pode ocorrer de forma subclínica (SCICLUNA et al.,

2010) e de forma clínica, casos de morte de recém-nascidos, abortos, deformidades de membros já foram associados a infecção (FUSCO et al., 2015).

Tendo em vista o desenvolvimento da criação de búfalos e as escassas pesquisas em relação às doenças infecciosas que causam repercussão na esfera reprodutiva na espécie bubalina, objetivou-se com este estudo diagnosticar os aspectos epidemiológicos associados à infecção pelo vírus da Diarreia Viral Bovina e Rinotraqueíte Infecciosa Bovina em bubalinos no estado de Pernambuco.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Realizar um estudo epidemiológico da infecção pelo vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) e Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR) em bubalinos no estado de Pernambuco.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar a ocorrência da infecção pelo vírus da Diarreia Viral Bovina e Rinotraqueíte Infecciosa Bovina em bubalinos no estado de Pernambuco;
- Determinar os aspectos epidemiológicos associados à infecção pelo vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) e Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR) em bubalinos no estado de Pernambuco.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 DIARREIA VIRAL BOVINA (BVD)

3.1.1 Vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV)

BVDV é um vírus RNA, pertencente à família *Flaviviridae*, gênero *Pestivirus*. Neste gênero estão incluídos o vírus da Peste Suína Clássica (*Classical swine fever virus*, CSFV) e o vírus da Doença da Fronteira de ovinos (*Border disease virus*, BDV) (NAGAI et al., 2008; OIE, 2008).

O vírus apresenta forma esférica, de 40-60 nm de diâmetro, constituído por nucleocapsídeo de simetria icosaédrica, revestido por um envelope (MOENNIG, 1990). O genoma viral é RNA fita simples, 12 Kb de comprimento (COLLETT, 1992).

BVDV inclui dois genótipos distintos, BVDV-1 e BVDV-2 (OIE, 2015). Um terceiro genótipo, BVDV-3 vem sendo proposto, mas é pouco esclarecida a sua distribuição (XIA et al., 2011; BAUERMANN et al., 2014). BVDV-1 é classificado ainda por análises genéticas em torno de dezoito subtipos (1a – 1t) (JACKOVA et al., 2008; GIAMMARIOLI et al., 2014) e BVDV-2 em três subtipos (2a – 2c) (LUZZAGO et al., 2014). Baseados na capacidade de produzir efeitos citopáticos em cultivos celulares, os isolados de BVDV podem ser classificados em biótipos citopáticos (CP) e não citopáticos (NCP) (FLORES et al., 2005; RIDPATH, 2013).

Os mesmos interagem de forma diferente com o sistema imunológico, as cepas NCP podem estabelecer infecções persistentes, animais persistentemente infectados (PI), são capazes de eliminar o vírus durante toda vida, assegurando que o BVDV permaneça em circulação. As cepas CP não produzem animais PI (RIDPATH, 2013). Embora existam ambos os biótipos citopático e não citopático de BVDV-1 e BVDV-2, estirpes não citopáticas são normalmente encontrados em infecções de campo (OIE, 2015).

As mutações ou recombinações genéticas do vírus NCP podem originar o vírus CP (KUMMERER et al., 2000). A maioria dos vírus de campo são NCP, amostras CP são isoladas quase que exclusivamente de animais acometidos com Doença das Mucosas (DM), uma forma clínica severa da infecção (OIE, 2015).

3.1.2 Epidemiologia

O vírus da BVD apresenta distribuição mundial e já foi identificado na maioria dos países onde existe criação de bovinos. É uma doença de notificação obrigatória a OIE (OIE, 2016). Em países livres da febre aftosa, o BVDV é considerado o agente viral mais importante de bovinos e tem sido alvo de estudos e programas de controle e erradicação (FLORES et al., 2005; CANÁRIO et al., 2009).

No Brasil vários relatos clínico-patológicos e sorológicos têm comprovado a distribuição da infecção pelo BVDV em rebanhos bovinos no país desde o final dos anos sessenta (FLORES et al., 2005). A prevalência na bovinocultura varia de 22,2% (THOMPSON et al., 2006) a 85,4% (QUINCOZES et al., 2007).

Em bubalinos estudos já foram realizados em diversas partes do mundo e constatou-se uma prevalência variando entre 14,2% (DENG et al., 2015) a 84,2% (CRAIG et al., 2015). No Brasil a prevalência é estimada entre 8,8% (FERNANDES et al., 2016) a 52,7% (LAGE et al., 1996). Os estudos realizados para determinar a prevalência da infecção em bubalinos por BVDV estão dispostos na tabela 2.

O vírus é capaz de infectar uma grande variedade de ruminantes como bovinos (CHAVES et al., 2012), búfalos (CRAIG et al., 2015), ovinos e caprinos (MISHRA et al., 2012), e camelos (DEHKORDI, 2011). Os bovinos são considerados hospedeiros naturais do agente (CANÁRIO et al., 2009, FINO et al., 2012). Craig et al. (2015) relataram que búfalos podem atuar como reservatório natural de BVDV.

A transmissão ocorre principalmente de forma horizontal direta pela presença de animais PI (com biótipo NCP) nos rebanhos, que eliminam grandes quantidades de vírus no ambiente pela urina, fezes, descargas, leite e sêmen, durante toda a vida (MARLEY et al., 2009, OIE, 2015). Touros PI (Persistentemente Infectado) podem eliminar grandes quantidades do vírus no sêmen (KIRKLAND et al., 1997).

Tabela 1 – Soroprevalência da infecção por BVDV em bubalinos dos diferentes países

Autores	Ano	País	Amostra	Método de Diagnóstico	Prevalência (%)
Akhtar; Asif	1996	Paquistão	36	VN	30,6%
Lage et al.	1996	Brasil	329	VN	52,7%
Pituco et al.	1997	Brasil	417	VN	16,3%
Zaghawa.	1998	Egito	150	VN	52,0%
Sudharshana et al.	1999	Índia	112	ELISA	23,2%
Roncoroni et al.	2007	Itália	465	ELISA	22,0%
Bhatia et al.	2008	Índia	104	ELISA	36,8%
Ghazi et al.	2008	Egito	210	ELISA/VN	11,4%/25,0%
Dehkordi	2011	Irã	372	ELISA	16,9%
Albayrak et al.	2012	Turquia	82	ELISA	68,3%
Giraldo et al.	2013	Colômbia	19	ELISA	51,9%
Sheffer	2013	Brasil	176	VN	10,8%
Dawlat et al.	2014	Egito	372	ELISA	22,7%
Craig et al.	2015	Argentina	38	VN	84,2%
Deng et al.	2015	China	134	ELISA	14,2%
Fernandes et al.	2016	Brasil	136	VN	8,8%
Silva et al.	2016	Brasil	805	ELISA	14,0%
Viana et al.	2016	Brasil	175	VN	36,0%

Convenções: Ensaio Imunoenzimático (ELISA); Virusneutralização (VN)

A transmissão do vírus por animais com infecção aguda é geralmente menos importante, estes excretam níveis relativamente baixos de vírus e por um curto período de tempo (sete a dez dias). BVDV também pode persistir no ambiente por períodos curtos e ser transmitido por meio de fômites (OIE, 2015).

A transmissão vertical do BVDV desempenha um papel importante na sua epidemiologia e patogênese, devido ao nascimento de animais PI, caracterizados como a principal fonte de infecção do vírus (OIE, 2015). Em animais recém-nascidos pode ocorrer a infecção pela ingestão de colostro ou leite procedente de fêmeas positivas para BVDV (ROSSMANITH et al., 2014).

Os fatores de risco que favorecem a disseminação do vírus nos rebanhos bovinos incluem alta densidade populacional; animais criados em exploração mista (leite e carne); criação extensiva (QUICOZES et al., 2007); propriedades que utilizam como forma de reprodução somente touro (CHAVES et al., 2012) utilização de touro de repasse (SAMARA et al., 2004); utilização de técnica de inseminação artificial (IA) (QUICOZES

et al., 2007); ausência de assistência técnica nas propriedades e propriedades menos tecnificadas (SAMARA et al., 2004; CHAVES et al., 2012).

Aliado à introdução de animais PI que constituem em uma fonte constante de infecção para animais não imunes, introdução de fêmeas gestando fetos PI, introdução de animais infectados, atuam como potenciais fontes de infecção nos rebanhos (SAMARA et al., 2004; CANÁRIO, 2009). Animais de maior faixa etária são mais susceptíveis, quanto maior a idade dos animais, maiores são as chances de exposição ao agente. Além dos mesmos estarem em atividade reprodutiva (CHAVES et al., 2012).

No estado de Pernambuco, foram identificados os seguintes fatores de risco para BVDV em bovinos: não fornecer colostro (OR = 3,85; $p = 0,018$); não conhecer a enfermidade (OR = 2,54; $p = 0,001$); criação consorciada com animais de produção (OR = 1,76; $p = 0,013$) (RÊGO et al., 2016).

3.1.3 Patogenia

As infecções agudas em vacas não imunes e que não estejam prenhes, com vírus NCP resultam em viremia transitória, a partir de três dias pós infecção (PEDRERA et al., 2011), até o desenvolvimento da imunidade em torno de duas semanas (MEYLING et al., 1990).

Efeitos de infecções fetais são complexas, dependem da idade do feto e quando a infecção ocorreu pela primeira vez (LANYON et al., 2014). Entre vinte e nove e quarenta e um dias pós-concepção pode resultar em infecção, levando a morte embrionária (MCGOWAN et al., 1993). Infecção após o trigésimo dia de gestação e durante o primeiro trimestre pode resultar no nascimento de bezerros PI (BROWNLIE et al., 1998), havendo uma variação de feto para feto (PETERHANS; SCHWEIZER, 2013).

BVDV está localizado no oócito de fêmeas PI, explicando porque bezerros nascidos de fêmeas PI são sempre PI (FRAY et al., 2000). Animais PI não apresentam resposta imunológica ao vírus, eliminando grandes quantidades do vírus em excreções e secreções (MARLEY et al., 2009). Infecção entre oitenta e cento e cinquenta dias de gestação podem causar efeitos teratogênicos no feto (LANYON et al., 2014). Somente animais PI desenvolvem a doença das mucosas, apresentando alto poder de letalidade (LANYON et al., 2014). Esta doença está associada ao biótipo CP, ou a mutações do biótipo NCP (BROWNLIE et al., 1984).

A idade fetal em que ocorre o desenvolvimento do sistema imunológico em búfalos ainda é desconhecida, sendo difícil prever a idade gestacional em que o BVDV pode causar infecção persistente nesta espécie. O período de gestação de búfalos é cerca de um mês mais longo, portanto, o prazo gestacional em que a infecção persistente pode ocorrer em búfalos pode ser diferente dos bovinos. Problemas reprodutivos e abortos estão associados normalmente com a infecção em animais prenhes (MARTUCCIELLO et al., 2009). Em touros a infecção resulta em redução na concentração, motilidade e aumento de anormalidade espermática (PATON et al., 1989).

Acredita-se que a patogenia em bubalinos seja semelhante à dos bovinos, originando animais persistentemente infectados, no entanto ainda há escassez de dados em relação à patogênese nessa espécie (MARTUCCIELLO et al., 2009; CRAIG et al., 2015). Análises moleculares de amostras de sangue em animais com sorologia negativa, revelou a presença de ácido nucleico viral, confirmando a existência de infecção persistente em búfalos (CRAIG et al. 2015). O BVDV foi isolado de fetos, provavelmente originado de búfalas PI (MARTUCCIELLO et al., 2009).

3.1.4 Sinais clínicos

Os sinais clínicos normalmente ocorrem em infecções agudas (gastroentérica, respiratória e hemorrágica), infecções persistentes e doença das mucosas (DM). A severidade da doença depende da cepa, dose infectante e idade do animal. O período de incubação é variável entre dois e quatorze dias (RIDPATH et al., 2007).

A ocorrência de abortos, fetos natimortos (DAMMAN et al., 2015), nascimentos de crias fracas, dentre outros problemas reprodutivos, pode ser indicativo da presença do BVDV em rebanhos (FLORES et al., 2005). A infecção de fêmeas soronegativas e livres do vírus pode resultar em taxas de concepção deficientes (DAMMAN et al., 2015), repetição de cio e abortamentos (JUNQUEIRA et al., 2006), redução na taxa de fertilidade (GAROUSSI; MEHRZAD, 2011). Animais PI podem apresentar diminuição do ganho de peso, crescimento retardado. Podendo sugerir sistema imunológico deficiente, tornando-os susceptíveis a infecções secundárias (VOGES et al., 2006). A infecção persistente em um touro foi associada à hipoplasia testicular (BOREL et al., 2007).

O BVDV está relacionado à ocorrência de abortos em búfalos, representando uma ameaça à saúde destes animais (MATUCCIELLO et al., 2009). Foi observada associação entre a ocorrência de problemas reprodutivos com a presença de animais positivos para o

BVDV, sendo repetição de cio e abortos os principais distúrbios observados em rebanhos bubalinos (AHMED; ZAHER, 2008).

3.1.5 Diagnóstico

O isolamento do vírus é um teste confiável e amplamente utilizado para o diagnóstico de infecções por BVDV, permitindo a caracterização do agente, o crescimento de ambos os biótipos é geralmente satisfatório (OIE, 2008). Alguns fatores podem afetar a capacidade de isolamento do vírus, tais como: momento da coleta da amostra, transporte da amostra e processamento da amostra no laboratório (DUBOVI, 2013).

Em animais PI, a maioria dos tecidos pode ser utilizada para isolamento, especialmente em amostras de sangue ou soro (DUBOVI, 2013). Para detectar níveis baixos de vírus em algumas amostras, em especial o sêmen, pode ser necessária a análise de volumes maiores que o habitual, assegurando que o teste não será comprometido pela presença de baixos níveis de BVDV (OIE, 2015).

Os testes sorológicos mais comuns para detecção de anticorpos anti-BVDV são virusneutralização (VN) e Ensaio Imunoenzimático (ELISA) (OIE, 2008), estes testes podem ser utilizados para identificar os níveis de imunidade do rebanho, investigação do envolvimento do BVDV em doenças reprodutivas e estabelecer o “*status*” sorológico de touros utilizados para a coleta de sêmen. Em bezerros com idade menor que quatro a cinco meses a detecção de anticorpos anti-BVDV, por técnicas sorológicas, é dificultada pela presença de anticorpos maternos (BROCK et al., 1998).

A detecção de anticorpos específicos para o BVDV é uma valiosa forma de determinar o estado imunológico do animal e qualquer exposição anterior ao agente. Um teste de anticorpo positivo em um animal não vacinado, não só indica que o mesmo tenha sido previamente exposto ao BVDV, mas que também não é um PI. Um resultado positivo em uma fêmea gestante pode indicar a possibilidade da mesma gerar um feto PI (LANYON et al., 2014).

O diagnóstico também pode ser realizado pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (SCHEFFER, 2013). O método de PCR pode ser utilizado para fins de diagnóstico, pela detecção do RNA vírus, tendo valor especial em suspeitas de infecção por níveis baixos do vírus (OIE, 2008). A sensibilidade do teste permite a adoção de estratégias para detectar animais PI em rebanhos (OIE, 2015). O uso do PCR tem se tornado cada vez

mais comum, muitas vezes preferível para isolamento do vírus, por ser menos demorado, menos custo e altamente sensível (HOUE et al., 2006).

3.1.6 Profilaxia

A identificação de animais PI é a chave para a prevenção da infecção pelo BVDV (DAMMAN et al., 2015), assim como a minimização do risco potencial de nascimentos de animais PI, já que os mesmos permanecem como fontes de infecção; pode ser realizado pela separação de fêmeas gestantes suspeitas ou recém-adquiridas do restante do rebanho até que elas e suas respectivas crias possam ser adequadamente testadas para BVDV (DAMMAN et al., 2015).

Outros métodos são indicados, tais como: quarentena para animais recém-adquiridos, para evitar a entrada do agente em criações livres; controle do trânsito animal nas propriedades; adoção de práticas adequadas de higiene e desinfecção de fômites e instalações, em especial nos locais de quarentena para evitar a persistência viral no ambiente (PACHECO, 2010). Aplicação contínua de medidas higiênico-sanitárias (LANYON et al., 2014).

Vacinação é uma estratégia importante para rebanhos, sendo eficaz na redução do número de infecções (RIDPATH, 2013). Devido à necessidade de produzir vacinas de acordo com as cepas isoladas em um país ou região, não é viável a produção de vacinas que possam ser utilizadas globalmente. Dessa forma, não existe vacina padrão para BVDV, mas uma série de preparações comerciais disponíveis. Vacinas formuladas com vírus atenuado não devem ser administradas em vacas prenhes, devido ao risco de infecção transplacentária, por outro lado, dose única é suficiente para conferir proteção. Vacinas com vírus inativado são seguras e podem ser administradas em qualquer idade estas necessitam de reforço vacinal (OIE, 2015).

Em búfalos previamente imunizados com vacina inativada contendo BVDV-1a, foi identificada a presença de BVDV e houve divergências em relação à estirpe, no estudo foram isoladas cepas de BVDV-1b. O acompanhamento e atualização contínua de vacinas com cepas circulantes é importante para o controle da infecção (SOLTAN et al., 2015).

3.2 RINOTRAQUEÍTE INFECCIOSA BOVINA (IBR)

3.2.1 Herpesvírus bovino tipo – 1 (BoHV-1)

A Rinotraqueíte Infecciosa Bovina, também conhecida como IBR, é causada pelo Herpesvírus Bovino tipo 1 (BoHV-1). BoHV-1, pertencente à família *Herpesviridae*, subfamília *Alfaherpesvirinae*, gênero *Varicellovirus* (ICTV, 2014). Esta enfermidade é responsável por uma variedade de distúrbios respiratórios e reprodutivos em bovinos (SANTOS et al., 2014) e búfalos (SCICLUNA et al., 2010).

Morfologicamente, os herpesvírus são distintos de todos os outros vírus (DAVISON et al., 2009). Caracteriza-se por apresentar um núcleo contendo o material genético DNA dupla fita, envolto por um nucleocapsídeo icosaédrico, por um envelope exterior coberto de glicoproteínas, em sua superfície, espículas que apresentam papel fundamental, pela indução de anticorpos no hospedeiro (SOUTO et al., 2006; DAVISON et al., 2009). Localizado entre o capsídeo e o envelope exterior, está o tegumento, uma matriz proteica (SATHISH et al., 2012).

De acordo com análises antigênicas e genômicas, BoHV-1 pode ser classificado em três subtipos (METZLER et al., 1985): BoHV-1.1 - relacionado com sinais clínicos respiratórios e abortamentos; BoHV-1.2a tem sido relacionado à diversas manifestações clínicas, incluindo distúrbios de ordem reprodutiva (abortos, vulvovaginite pustular infecciosa – IPV, balanopostite pustular infecciosa – IPB) e problemas respiratórios, este subtipo é frequentemente isolado no Brasil (FLORES, 2007); BoHV – 1.2b, ocasiona doença respiratória leve (IPV e IPB), a ocorrência de abortamentos não tem sido associada a este genótipo (D'ARCE et al., 2002). Por isso, amostras do subtipo 1.2b são consideradas menos patogênicas que o subtipo 1 (FLORES, 2007).

A partir de 1990 um novo subtipo foi reclassificado como BoHV-5, agente neuropatogênico (EDWARDS et al., 1990).

Os isolados dos três subtipos apresentam reatividade sorológica cruzada, dificultando a sua diferenciação pelos métodos sorológicos convencionais (SPILKI et al., 2005; ANZILIERO et al., 2011).

BoHV-1 é resistente ao ambiente, sua inativação depende de fatores como temperatura, pH, luz e umidade. Em uma temperatura de 4°C o agente permanece estável

durante um mês, a 56°C é inativado em torno de 21 minutos, a 37°C em um período de dez dias e em 22°C dentro de cinquenta dias (GIBBS; RWEYEMAMU, 1997). Pode sobreviver por mais de trinta dias em alimentos (NANDI et al., 2009). O agente é sensível a substâncias desinfetantes, que atuam destruindo o envelope lipídico do vírus (BISWAS et al., 2013).

3.2.2 Epidemiologia

A Rinotraquite Infecciosa Bovina tem distribuição mundial (BARBOSA et al., 2005). É uma doença de notificação obrigatória a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) (OIE, 2016). Acomete principalmente bovinos e bubalinos (FERREIRA, 2009). No Brasil, BoHV-1 foi isolado pela primeira vez de bovinos em 1978 na Bahia (ALICE, 1978). O primeiro levantamento sorológico foi realizado por Galvão et al. (1963), determinando uma prevalência de 34,5%. Estudos sorológicos em bovinos indicam uma prevalência variável entre 22,0% (URBINA et al., 2005) e 79,5% (SILVA et al., 2015).

Estudos indicam a ocorrência da infecção por BoHV-1 em búfalos em diversas partes do mundo e constatou-se uma prevalência variando entre 30,5% (SCICLUNA et al., 2007) a 100,0% (PETRINE et al., 2012). No Brasil a prevalência é estimada entre 14,7% (LAGE et al., 1996) a 87,3% (CARVALHO et al., 2015). Os estudos realizados para determinar a prevalência da infecção por BoHV-1 em bubalinos estão dispostos na tabela 1.

A transmissão do BoHV-1 ocorre pelo contato com secreções respiratórias, oculares e reprodutivas como: muco prepucial, muco vaginal (FRANCO et al., 2012) e sêmen (KUPFERSCHMIED et al., 1986). E de forma vertical, por infecção transplacentária, vai depender do estado imunológico da fêmea no momento da infecção (RADOSTITS et al., 2007). Em rebanhos BoHV-1 positivos mais atenção deve ser dada à possível transmissão iatrogênica através de fômites (RAAPERI et al., 2010).

Tabela 2 – Soroprevalência da infecção por BoHV – 1 em bubalinos em diferentes países

Autores	Ano	País	Amostra	Método de diagnóstico	Prevalência (%)
Akhtar; Asif	1996	Paquistão	36	VN	16,7%
Lage et al.	1996	Brasil	329	VN	14,7%
Cortez et al.	2001	Brasil	133	VN	52,6%
Fujii et al.	2001	Brasil	222	ELISA	77,0%
De Carlo et al.	2004	Itália	72	ELISA	32,0%
Roncoroni et al.	2007	Itália	465	ELISA	25,0%
Scicluna et al.	2007	Itália	1756	ELISA	30,5%
Mahmoud et al.	2009	Egito	86	ELISA	45,0%
Ferreira	2009	Brasil	188	VN	82,4%
Scicluna et al.	2010	Itália	7	VN	100,0%
Nandi et al.	2011	Índia	79	VN	31,6%
Albayrak et al.	2012	Turquia	82	ELISA	80,5%
Petrine et al.	2012	Itália	4	VN	100,0%
Trangadia et al.	2012	Índia	77	ELISA	23,94%
Amoroso et al.	2013	Itália	36	ELISA	86,0%
Shabbir et al.	2013	Paquistão	47	ELISA	70,3%
Giraldo et al.	2013	Colômbia	19	ELISA	80,3%
Scheffer	2013	Brasil	339	VN	42,8%
Jorgens et al.	2014	Brasil	242	VN	23,14%
Medeiros et al.	2014	Brasil	80	VN	43,7%
Carvalho et al.	2015	Brasil	306	ELISA	87,3%
Fernandes et al.	2016	Brasil	136	VN	63,2%
Viana et al.	2016	Brasil	214	VN	85,0%

Convenções: Ensaio Imunoenzimático (ELISA); Virusneutralização (VN)

Em búfalos a infecção pode ocorrer por aerossóis e fômites contaminados (LAMAIRE et al., 1994). Estudo indica a presença de BoHV-1 em fezes de búfalos, atuando como fonte de contaminação ambiental para o herpesvírus (SCICLUNA et al., 2010).

O processo de congelamento do sêmen não inativa o vírus, o mesmo permanece com a capacidade de causar infecções (LATA JAIN et al., 2008). Amostras criopreservadas podem manter o vírus viável por até um ano (CHAPMAN et al., 1979).

Em casos de infecção aguda, o vírus é excretado em grande quantidade por dez a quinze dias. Quando ocorre reativação viral, após o período de latência, a excreção ocorre em menor concentração em dois a dez dias (FRANCO et al., 2012).

Animais de todas as idades e raças são susceptíveis à infecção, porém pesquisas com bovinos relatam maior ocorrência da infecção em animais acima dos seis meses de idade, observando-se elevadas taxas de prevalência nas idades mais avançadas, pois os mesmos estão mais expostos ao agente, em especial quando estão na fase reprodutiva (BARBOSA et al., 2005; JUNQUEIRA et al., 2006). Vacas com idade acima de quatro anos tem 2,36 vezes maior risco de se infectarem pelo BoHV-1 (URBINA et al., 2005).

Quanto ao tipo de exploração, animais leiteiros são mais predispostos à infecção, quando comparados aos de corte, provavelmente devido a maior aglomeração dos animais de exploração leiteira (VIEIRA et al., 2003).

A utilização de monta natural e inseminação artificial (IA) no manejo reprodutivo são considerados como fatores de risco (DIAS et al., 2008). Em um estudo epidemiológico realizado em bovinos no estado de Pernambuco, foram observados os seguintes fatores de risco: utilização de touros na estação de monta com fêmeas com problemas reprodutivos (OR = 3,84; P = <0,000); criação consorciada (OR = 2,90; P = 0,048); tamanho do rebanho com até 50 animais (OR = 3,62; P = 0,001) (SILVA et al., 2015).

3.2.3 Patogenia

Durante a fase aguda, ocorre a replicação viral, de acordo com a porta de entrada, podendo ocorrer no trato respiratório ou na mucosa genital. O vírus penetra nas terminações periféricas locais, por via axonal retrógrada onde irá atingir os sítios de latência (TIKOO et al., 1995).

Os principais sítios de latência são os gânglios sensoriais e autônomos, dependendo do local de replicação primária do vírus (FLORES, 2007). Infecções respiratórias, orais, ou oculares resultam em colonização dos neurônios sensoriais do gânglio trigêmeo (JONES et al., 2011). Os gânglios sacrais são os sítios de predileção decorrentes de infecções genitais (FLORES, 2007).

Durante o período de latência o vírus permanece no organismo animal sem multiplicar-se, dificultando sua detecção (JONES et al., 2011). O ciclo de latência e reativação pode ser dividido em três etapas principais: estabelecimento de latência, manutenção da latência e reativação viral. Estabelecimento de latência inclui a entrada do genoma viral em neurônios ganglionares, replicação do DNA em infecções agudas e então cessa a replicação do gene viral. Manutenção da latência é o período onde não é detectada

a infecção viral pelo isolamento, sem replicação viral. A reativação da latência é iniciada por estímulos externos como estresse e imunossupressão, estimulando a expressão do gene viral (JONES, 2003).

Periodicamente, BoHV-1 é reativado havendo excreção viral, podendo ser transmitido a animais susceptíveis (JONES et al., 2011). A reativação do vírus ocorre quando o animal passa por períodos de estresse, devido à escassez de alimentos e água, durante o transporte dos animais, desmame, mudanças climáticas (JONES et al., 2011), utilização de corticosteroides (JONES et al., 2006). Na ausência de fatores predisponentes, o vírus permanece de forma latente (PETRINE et al., 2012).

Nas infecções por BoHV-1 a latência apresenta papel importante na patogenia, pois uma vez infectado, o animal torna-se portador para o resto da vida (DEL FAVA et al., 2002; FERREIRA, 2009). A ocorrência de sinais clínicos associada com a reativação, geralmente, é caracterizada por sinais mais brandos do que aqueles resultantes da infecção aguda (FLORES, 2007).

A patogênese e a gravidade do quadro clínico da infecção por BoHV-1, podem ser influenciadas por diversos fatores, entre eles: estirpe; dose infectante; via de infecção; hospedeiro (espécie, raça, idade, sexo, características fisiológicas e infecções simultâneas) e ambiente (MUYLKENS et al., 2006).

3.2.4 Sinais clínicos

O período de incubação varia entre dez a vinte dias em condições naturais. Os sinais clínicos são diversificados, podendo apresentar distúrbios respiratórios, genitais, oculares e encefalomielite (DEL FAVA et al., 2002, ALY et al., 2003, NANDI et al., 2009).

Na forma respiratória, a infecção pode ocorrer de forma subclínica, branda ou severa. Os animais podem apresentar dispneia, tosse, secreção nasal, bronquite, pneumonia. A morbidade é de aproximadamente 100% e a mortalidade pode chegar a 10% (NANDI et al., 2009). Na forma ocular, observa-se conjuntivite uni ou bilateral, fotofobia, epífora (TURIM; RUSSO, 2003). Alguns casos regridem dentro de cinco a dez dias (NANDI et al., 2009).

A forma genital é caracterizada por vulvovaginite pustular infecciosa e balanopostite infecciosa. Abortos são frequentes no terço final da gestação, mas pode ocorrer em qualquer das formas de infecção pelo BoHV-1, inclusive na forma subclínica

(DEL FAVA et al., 2002; YAN et al., 2008). Também observa-se infertilidade, nascimento de crias fracas, natimortos e malformação congênita (ALY et al., 2003).

Em bubalinos a infecção pode ocorrer de forma subclínica. Em condições experimentais foi observado que búfalos podem ser infectados com BoHV-1 pelas de vias de transmissão naturais, entretanto, nenhum animal utilizado na pesquisa apresentou qualquer alteração clínica relacionada a infecção pelo BoHV-1 (SCICLUNA et al., 2010).

Bezerros neonatos infectados com BoHV-1, antes ou após o nascimento, geralmente morrem dentro de poucos dias (MUYLKENS et al., 2007). Isolados de BoHV-1 em búfalos apresentam o mesmo nível de patogenicidade, incluindo a morte de recém-nascidos. Bem como, abortos e deformidades de membros posteriores (FUSCO et al., 2015).

3.2.5 Diagnóstico

O isolamento viral em cultivo celular pode ser realizado a partir de *swabs* de secreções nasais e genitais, durante infecções agudas. Podendo ser utilizado tecido de fetos abortados e anexos fetais. O isolamento de vírus no sêmen necessita de adaptações especiais, já que o mesmo possui fatores que são tóxicos e inibem a replicação viral (OIE, 2010). Em animais que apresentam infecção latente, torna-se difícil o isolamento, pois durante este período não há excreção viral (NANDI et al., 2011).

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma alternativa para detecção do vírus, tendo como objetivo a amplificação de uma região específica do DNA do micro-organismo, apresentando alta especificidade e sensibilidade, de forma rápida e eficaz. Tornando-se uma alternativa para diminuição de tempo e trabalho quando comparado a detecção de BoHV-1 pelo isolamento (WANG et al., 2007; WANG et al., 2008; CAMPOS et al., 2009).

Técnicas alternativas para identificação do vírus são imunoperoxidase e imunofluorescência direta. O material para análise inclui cortes ou impressões de tecido, esfregaço de secreções e de sêmen (OIE, 2010).

O diagnóstico sorológico pode ser realizado por virusneutralização (VN) ou por Ensaio Imunoenzimático (ELISA), estes testes são utilizados para detecção de anticorpos contra BoHV-1. A identificação sorológica de anticorpos é um indicador confiável de infecção no rebanho, incluindo animais com infecção latente. Podendo ser utilizado para determinar a prevalência da infecção em estudos soro-epidemiológicos, diagnosticar

ausência da infecção em animais que serão exportados ou importados, apoiar programas de erradicação (OIE, 2010).

3.2.6 Profilaxia

A profilaxia é baseada na utilização de manejo sanitário rigoroso (NANDI et al., 2011) e imunização dos animais (PATEL, 2005). Montagnaro et al. (2014), realizaram estudo onde a imunização prévia com vacina gE (glicoproteína E) deletada contra o BoHV-1 induziu proteção em búfalos e redução na excreção viral.

A vacinação é recomendada em rebanhos onde a infecção por herpesvírus é enzoótica, bem como em propriedades onde haja condições que favoreçam a transmissão do BoHV-1 (PATEL, 2005). Vacinas geralmente impedem o desenvolvimento de sinais clínicos e reduzem a excreção viral, mas não conseguem evitar completamente a infecção (OIE, 2010).

Vacinas deletadas são utilizadas em programas de controle e erradicação do BoHV-1 (RAAPERI et al., 2014), permitem a diferenciação entre animais infectados e animais vacinados (VAN OIRSCHOT et al., 1996). Estas vacinas podem ser utilizadas em animais de todas as idades, com capacidade de minimizar a excreção viral (STRUBE et al., 1996).

Deve-se realizar controle reprodutivo, descarte de animais com problemas reprodutivos recorrentes, eliminação da prática de empréstimos de reprodutores (SILVA et al., 2015). Utilização de quarentena com período de quatro semanas para animais recém-adquiridos, a monta natural deve ser evitada e utilização de sêmen de touros negativos (OIE, 2010).

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, W. M.; ZAHER, K. S. A. Field contribution on the relation between reproductive disorders and bovine viral diarrhoea virus infection in buffalo-cows. **American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences**. v. 3, n. 5, p. 736-742, 2008.

AKHTAR, S.; ASIF, M. Epidemiologic association between antibody titres against bovine virus diarrhoea virus, rinderpest disease virus and infectious bovine rhinotracheitis virus in a buffalo herd. **Tropical Animal Health Production**. v. 28, p. 207-212, 1996.

ALBAYRAK, H. et al. A Serological investigation of some aetiological agents associated with abortion in domestic water buffalo (*Bubalus bubalis* Linnaeus, 1758) in Samsun Province of Northern Turkey. **Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri. Dergisi**. v. 7, n. 3, p. 155-160, 2012.

ALICE, F. J. Isolamento do vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) no Brasil. **Revista Brasileira de Biologia**. v. 38, n. 4, p. 919-920, 1978.

ALY, N. M. et al. Bovine viral diarrhoea, bovine herpesvirus and parainfluenza-3 virus infection in three cattle herds in Egypt in 2000. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**. v. 22, n. 3, p. 879-892, 2003.

AMOROSO, M. G. et al. Bubaline herpesvirus 1 associated with abortion in a Mediterranean water buffalo. **Research in Veterinary Science**. v. 94, p. 813-816, 2013.

ANZILIERO, D. et al. A recombinant bovine herpesvirus 5 defective in thymidine kinase and glycoprotein E is immunogenic for calves and confers protection upon homologous challenge and BoHV-1 challenge. **Veterinary Microbiology**, v. 154, p. 14-22, 2011.

BARBOSA, A. C.; BRITO, W. M.; ALFAIA, B. T. Soroprevalência e fatores de risco para a infecção pelo herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1) no Estado de Goiás, Brasil. **Ciência Rural**. v. 35, n. 6, p.1368-1373, 2005.

BAUERMANN, F. V. et al. Lack of evidence for the presence of emerging HoBi-like viruses in North American fetal bovine serum lots. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 26, p. 1-8, 2014.

BHATIA, S. et al. Development and evaluation of a MAb based competitive ELISA using helicase domain of NS3 protein for sero-diagnosis of bovine viral diarrhoea in cattle and buffaloes. **Research in Veterinary Science**. v. 85, p. 39-45, 2008.

BISWAS, S. et al. Bovine herpesvirus-1 (BHV-1) – a re emerging concern in livestock: a revisit to its biology, epidemiology, diagnosis, and prophylaxis. **Veterinary Quarterly**. v. 33, n. 2, p. 68-81, 2013.

BOREL, N. et al. Testicular hypoplasia in a bull persistently infected with bovine diarrhoea virus. **Journal of Comparative Pathology**. v. 137, p. 169-173, 2007.

BROCK, K. V. et al. Changes in levels of viremia in cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 10, p. 22-26, 1998.

BROWNLIE, J. et al. Maternal recognition of foetal infection with bovine virus diarrhoea virus (BVDV) – The bovine pestivirus. **Clinical and Diagnostic Virology**. v. 10, p. 141-150, 1998.

BROWNLIE, J.; CLARKE, M. C.; HOWARD, C. J. Experimental production of fatal mucosal disease in cattle. **Veterinary Record**. v. 114, p. 535-536, 1984.

CAMPOS, F. S. et al. High prevalence of co-infections with bovine herpesvirus 1 and 5 found in cattle in southern Brazil. **Veterinary Microbiology**. v. 139, p. 67-73, 2009.

CANÁRIO, R. et al. **Diarreia viral bovina: uma afecção multifacetada**. Veterinaria.com.pt, v. 1, n. 2, 46 p. 2009. Disponível em: <http://www.veterinaria.com.pt/media/DIR_27001/VPC-I-2-e6.pdf> Acesso em: 05 de abril de 2015.

CARVALHO, O. S. et al. Occurrence of *Brucella abortus*, *Leptospira interrogans* and bovine herpesvirus type 1 in buffalo (*Bubalus bubalis*) herd under extensive breeding system. **African Journal of Microbiology Research**. v. 9, n. 9, p. 598-603, 2015.

CHAPMAN, M. S. et al. Survival of infectious bovine rhinotracheitis virus in stored bovine semen. **Veterinary Sciences Communications**. v. 3, n. 2, p. 137-139, 1979.

CHAVES, N. P. et al. Frequência e fatores associados à infecção pelo vírus da diarreia viral bovina em bovinos leiteiros não vacinados no estado do Maranhão. **Arquivos do Instituto Biológico**. v. 79, n. 4, p. 495-502, 2012.

COLLETT, M. S. Molecular genetics of pestiviruses. **Comparative Immunology-Microbiology and Infectious Diseases**. v. 15, p. 145-154, 1992.

CORTEZ, A. et al. Comparação das técnicas de ELISA indireto e de soroneutralização na detecção de anticorpos contra o BHV-1 em amostras de soro bubalino (*Bubalus bubalis*). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 38, n. 3, p. 146-148, 2001.

CRAIG, M. I. et al. Molecular analyses detect natural coinfection of water buffaloes (*Bubalus bubalis*) with bovine viral diarrhoea viruses (BVDV) in serologically negative animals. **Revista argentina de microbiologia**. v. 47, n. 2, p. 148-151, 2015.

D'ARCE, R. C. F. et al. Restriction endonucleases and monoclonal antibody analysis of Brazilian isolates of bovine herpesvirus 1 and 5. **Veterinary Microbiology**. v. 88, p. 315-334, 2002.

DAMMAN, A. et al. Modelling the spread of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in a beef cattle herd and its impact on herd productivity. **Veterinary Research**. v. 46, n. 12, 2015.

DAVISON, A. J. et al. The order herpesvirales. **Archives of Virology**. v. 154, p. 171-177, 2009.

DAWLAT, M. A. et al. Epidemiology surveillance on bovine viral diarrhoea virus and persistently infected animals of cattle and buffaloes in Egypt. **Global Veterinaria**. v. 13, n. 5, p. 856-866, 2014.

DE CARLO, E. et al. Molecular characterisation of a field strain of bubaline herpesvirus isolated from buffaloes (*Bubalus bubalis*) after pharmacological reactivation. **Veterinary Record**. v. 154, p. 171-174, 2004.

DEHKORDI, F. S. Prevalence study of bovine viral diarrhoea virus by evaluation of antigen capture ELISA and RT-PCR assay in bovine, ovine, caprine, buffalo and camel aborted fetuses in Iran. **Associação Médica Brasileira**. v. 1, n. 32, p. 1-31, 2011.

DEL FAVA, C.; PITUCO, E. M.; D'ANGELINO, J. L. Herpesvírus bovino tipo 1 (hvb-1): revisão e situação atual no Brasil. **Revista de educação continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 5, n. 3, p. 300 – 312, 2002.

DENG, M. et al. Prevalence study and genetic typing of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in four bovine species in China. **PLoS One**. v. 10, n. 4, 2015.

DUBOVI, E. J. Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhoea virus. **Biologicals**. v. 41, p. 8-13, 2013.

EDWARDS, S.; WHITE, H.; NIXON, P. A study of the predominant genotypes of BHV-1 found in UK. **Veterinary Microbiology**. v. 22, p. 213-223, 1990.

FERNANDES, L. G. et al. Risk factors associated with BoHV-1 and BVDV seropositivity in buffaloes (*Bubalus bubalis*) from the State of Paraíba, Northeastern Brazil. **Ciências Agrárias**. v. 37, n. 4, p. 1929-1936, 2016.

FERREIRA, R. N. **prevalência da rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) em touros bubalinos em propriedades localizadas no Amapá e Ilha de Marajó (PA), Brasil**. 2009, 68f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Pará, Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural, Belém, 2009.

FINO, T. C. M. et al. Diarreia Bovina a Vírus (BVD) - Uma Breve Revisão. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**. v. 34, n. 2, p. 131-140, 2012.

FINO, T. C. M. et al. Infecções por herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e as suas implicações na reprodução bovina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v. 36, n. 2, p. 122-127, 2012.

FLORES, E. 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.

FLORES, E. **Virologia Veterinária**, UFSM, Santamaria, 2007.

FRANCO, A. C.; ROEHE, P. M.; VARELA, A. P. M. Herpesviridae, In: FLORES, E.F., **Virologia Veterinária**. Santa Maria-RS, Ed. Da UFSM, cap. 18, p. 503-570, 2012.

FRAY, M. D. Germinal centre localization of bovine viral diarrhoea virus in persistently infected animals. **Journal of General Virology**. v. 81, p. 1669-1673, 2000.

FUJII, T. U. et al. anticorpos anti- neospora caninum e contra outros agentes de abortamentos em búfalas da região do Vale do Ribeira, São Paulo, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**. v. 68, n. 2, p. 5-9, 2001.

FUSCO, G. et al. First report of natural BoHV-1 infection in water buffalo. **Veterinary Record**. v. 177, p. 152, 2015.

GALVÃO, C. L.; DORIA, J. D.; ALICE, F. J. Anticorpos neutralizantes para o vírus da rinotraqueíte infecciosa dos bovinos, em bovinos do Brasil. **Boletim do Instituto Biológico da Bahia**. v. 6, n. 1, p. 15-25, 1962/1963.

GAROUSI, M. T.; MEHRZAD, J. Effect of bovine viral diarrhoea virus biotypes on adherence of sperm to oocytes during in-vitro fertilization in cattle. **Theriogenology**. v. 75, p. 1067-1075, 2011.

GHAZI, Y. A. et al. Diagnostic studies on bovine diarrhea infection in cattle and buffloes with emphasis on gene markers. **Global Veterinária**. v. 2, n. 3, p. 92-98, 2008

GIAMMARIOLI, M. et al. Increased genetic diversity of BVDV-1: recent findings and implications thereof. **Virus Genes**. v. 50, p. 147-151, 2014.

GIBBS, E. P. J.; RWEYEMAMU, M. M. Bovine herpesviruses. Part I. Bovine herpesvirus 1. **Veterinary Bulletin**. v. 47, p. 317-18, 1977.

GIRALDO, J. L. M. et al. Prevalencia de anticuerpos al virus de la diarrea viral bovina, Herpesvirus bovino 1 y Herpesvirus bovino 4 en bovinos y búfalos en el Departamento de Caquetá, Colombia. **Revista de Salud Animal**. v. 35, n. 3, p. 174-181, 2013.

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.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística: **Produção da Pecuária Municipal**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2011/default.shtm>> Acesso em 28 Set. 2013.

ICTV – International Committee on Taxonomy of Viruses. Taxonomy History for Herpesviridae, Canada, 2014. Disponível em: <<http://www.ictvonline.org/>> Acesso em 05 mai. 2016.

JACKOVA, 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, C. Herpes simplex virus type 1 and bovine herpesvirus 1 latency. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 16, n. 1, p. 79-95, 2003.

JONES, C. et al. Functional analysis of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) genes expressed during latency. **Veterinary Microbiology**. v. 113, p. 199-210, 2006.

JONES, C.; DA SILVA, L. F.; SINANI, D. Regulation of the latency-reactivation cycle by products encoded by the bovine herpesvirus 1 (BHV-1) latency-related gene. **Journal Neurovirology**. v. 17, p. 535-545, 2011.

JORGENS, M. et al. **Infecções latentes por herpesvirus bovino tipo 1 em búfalos (*Bubalus bubalis*) no Brasil**. XXII Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de Pelotas, 2014.

JUNQUEIRA, J. R. C. et al. Avaliação do desempenho reprodutivo de um rebanho bovino de corte naturalmente infectado com BoHV-1, BVDV e *Leptospira hardjo*. **Semina: Ciências Agrárias**. v. 27, n. 3, p. 471-480, 2006.

KIRKLAND, P. D. et al. Insemination of cattle with semen from a bull transiently infected with pestivirus. **Veterinary Record**. v. 140, p. 124-127, 1997.

KUMMERER, B. M. et al. The genetic basis for cytopathogenicity of pestiviruses. **Veterinary Microbiology**. v. 77, p. 117-128, 2000.

KUPFERSCHMIED, H. U. et al. Transmission of IBR/IPV virus in bovine semen: A case report, **Theriogenology**. v. 25, p. 439-443, 1986.

LAGE, A. P. et al. Prevalence of antibodies to bluetongue, bovine herpesvirus 1 and bovine viral diarrhoea/ mucosal disease viruses in water buffaloes in Minas Gerais State, Brazil. **Revue d'élevage et médecine vétérinaire des pays tropicaux**. v. 49, n. 3, p. 195-197, 1996.

LANYON, S. R. et al. Bovine viral diarrhoea: Pathogenesis and diagnosis. **The Veterinary Journal**. v. 199, p. 201-209, 2014.

LATA JAIN, V. et al. Detection of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) infection in semen of breeding bulls of Gujarat by a direct fluorescence test. **Buffalo Bulletin**. v. 27, n. 2, 2008.

LEMAIRE, M.; PASTORET, P. P.; TLLIRY, E. Le contrôle de l'infection par le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine. **Annales de Médecine Vétérinaire**. v. 138, n. 3, p. 167-180, 1994.

LUZZAGO, C. et al. Extended genetic diversity of bovine viral diarrhoea virus and frequency of genotypes and subtypes in cattle in Italy between 1995 and 2013. **BioMed Research International**. v. 2014, p. 8, 2014.

MAHMOUD, M. A.; MAHMOUD, N. A.; ALLAM, A. M. Investigations on infectious bovine rhinotracheitis in Egyptian cattle and buffaloes. **Global Veterinaria**. v. 3, n. 4, p. 335-340, 2009.

MAPA. **Ministério da Agricultura, Pecuária e abastecimento**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/bovinos-e-bubalino>>. Acesso em: 9 de Abril de 2015.

MARLEY, M. S. D. et al. Bovine viral diarrhoea virus is inactivated when whole milk from persistently infected cows is heated to prepare semen extender. **Veterinary Microbiology**. v. 134, p. 249-253, 2009.

MARTUCCIELLO, A. et al. Detection of bovine viral diarrhoea virus from three water buffalo fetuses (*Bubalus bubalis*) in southern Italy. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 21, p. 137-140, 2009.

MCGOWAN, M. R. et al. Increased reproductive losses in cattle infected with bovine pestivirus around the time of insemination. **Veterinary Record**. v. 133, p. 39-43, 1993.

METZLER, A. E. et al. European isolates of bovine herpesvirus 1: a comparison of restriction endonuclease sites, polypeptides and reactivity with monoclonal antibodies. **Archives of Virology**. v. 85, p. 57-69, 1985.

MEYLING, A.; HOUE, H.; JENSEN, A. M. Epidemiology of bovine virus diarrhoea virus. **Revue Scientifique et Technique, International Office of Epizootics**. v. 9, p. 75-93, 1990.

MISHRA, N. et al. Genetic variety of bovine viral diarrhoea virus 1 strains isolated from sheep and goats in India. **Acta virológica**. v. 56, n. 3, p. 209-215, 2012.

MOENNIG, V. Pestiviruses: a review. **Veterinary Microbiology**. v. 23, p. 35-54, 1990.

MUYLKENS, B. et al. Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. **Veterinary Research**. v. 38, p. 181–209, 2006.

NAGAI, M. et al. Identification of new genetic subtypes of bovine viral diarrhoea virus genotype 1 isolated in Japan. **Virus Genes**. v. 36, p. 135-139, 2008.

NANDI, S. et al. Bovine herpes virus infections in cattle. **Animal Health Research Reviews**. v. 10, p. 85-98, 2009.

NANDI, S. et al. Serological evidences of bovine herpesvirus-1 infection in bovines of organized farms in India. **Transboundary and Emerging Diseases**. v. 58, p. 105-109, 2011.

NOGAROL, C. et al. Expression and antigenic characterization of bubaline herpesvirus 1 (BuHV1) glycoprotein E and its potential application in the epidemiology and control of alpha herpesvirus infections in Mediterranean water buffalo. **Journal of Virological Methods**. v. 207, p. 16–21, 2014.

OIE. Bovine Viral Diarrhoea. **Organização Mundial de Saúde Animal**. 2008.

OIE. Infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis. **Organização Mundial de Saúde Animal**. 2010.

OIE. Organização Mundial de Saúde Animal, Bovine Viral Diarrhoea. In: **OIE Terrestrial Manual**. Cap. 2.4.8, p. 1-22, 2015.

OIE. **Listed diseases, infections and infestations in force in 2016**. Disponível em: <<http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/oie-listed-diseases-2016>> Acesso em 03 mai. 2016.

PACHECO, J. M. C. **Caracterização do perfil de risco e avaliação de práticas de biossegurança em explorações produtoras de leite**. Dissertação (em Medicina Veterinária), Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto, Porto, 2010.

PATEL, J. R. Characteristics of live bovine herpesvirus-1 vaccines. **Veterinary Journal**. v. 169, p. 404-416, 2005

PATON, D. J. et al. Evaluation of the quality and virological status of semen from bulls acutely infected with BVDV. **Veterinary Record**. v. 124, n. 63, 1989.

PEDRERA, M. et al. Quantification and determination of spread mechanisms of bovine viral diarrhoea virus in blood and tissues from colostrum-deprived calves during an experimental acute infection induced by a non-cytopathic genotype 1 strain. **Transboundary and Emerging Diseases**. v. 59, p. 377-384, 2011.

PETERHANS, E.; SCHWEIZER, M. BVDV: A pestivirus inducing tolerance of the innate immune response, **Biologicals**. v. 41, p. 39-51, 2013.

PETRINE, S. et al. Rilievo del bubaline herpesvirus 1 (BuHV-1) in un allevamento di bufali nel centro Italia. **Large Animal Review**. v. 18, p. 113-116, 2012.

PITUCO, E. M. et al. Prevalência da infecção pelo vírus da diarréia viral bovina (BVD) em búfalos (*Bubalus bubalis*) no Vale do Ribeira, SP, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**. v. 64, n. 1, p. 23-28, 1997.

QUINCOZES, C. G. et al. Prevalência e fatores associados à infecção pelo vírus da diarréia viral bovina na região Sul do Rio Grande do Sul. **Semina: Ciências Agrárias**. v. 28, p. 269-276, 2007.

RAAPERI, K. et al. Seroepidemiology of bovine herpesvirus 1 (BHV1) infection among Estonian dairy herds and risk factors for the spread within herds. **Preventive Veterinary Medicine**. v. 96, p. 74-81, 2010.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; HINCHCLIFF, K. W. Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats. 10 th ed., **Saunders-Elsevier**. Edinburgh, p. 2156, 2007.

RÊGO, M. J. P. et al. Epidemiological analysis of infection by the bovine viral diarrhea virus on family farms in Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**. v. 37, p. 4119-4130, 2016.

RIDPATH, J. et al. Flaviviridae, In: **FLORES, E.F., Virologia Veterinária**. Santa MariaRS, Ed. Da UFSM, cap. 22, p. 582-589, 2007.

RIDPATH, J. F. Immunology of BVDV vaccines. **Biologicals**. v. 41, n. 1, p. 14-19, 2013.

RONCORONI, C. et al. Serological survey and reproductive performances in buffaloes under fixed time artificial insemination. **Italian Journal of Animal Science**. v. 6, n. 2, p. 828-831, 2007.

ROSSMANITH, W. et al. Analysis of BVDV isolates and factors contributing to vírus transmission in the final stage of a BVDVeradication program in lower Austria. **Berl Munch Tierarztl Wochenschr.** v. 127, n. 1-2, p. 12-8, 2014.

SAMARA, S. I.; DIAS, F. C.; MOREIRA, S. P. G. Ocorrência da diarreia viral bovina nas regiões sul do Estado de Minas Gerais e nordeste do Estado de São Paulo. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research.** v. 41, p. 396-340, 2004.

SANTOS, M. R. et al. Surveillance of neutralizing antibodies against *bovine herpesvirus 1* in cattle herds from different farming property systems. **Bioscience Journal.** v. 30, n. 3, p. 803-809, 2014.

SATHISH, S.; WANG, X.; YUAN, Y. Tegument proteins of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus and related gamma-herpesviruses. **Frontiers in Microbiology.** v. 3, n. 98, p. 1-13, 2012.

SCHEFFER, C. M. **Herpesvírus e Pestivírus em Rebanhos Bubalinos do Rio Grande do Sul.** 2013. 98.f. Dissertação (em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre (RS), Brasil, 2013.

SCICLUNA, M. T. et al. Epidemiological situation of herpesvirus infections in buffalo herds: Bubaline herpesvirus1 or bovine herpesvirus1?. **Italian Journal of Animal Science.** v. 6, n. 2, p. 845-849, 2007.

SCICLUNA, M. T. et al. Should the domestic buffalo (*Bubalus bubalis*) be considered in the epidemiology of bovine herpesvirus 1 infection?. **Veterinary Microbiology.** v. 143, p. 81-88, 2010.

SHABBIR, M. Z. et al. Serological evidence of selected abortifacients in a dairy herd with history of abortion. **Pakistan veterinary Journal.** v. 33, n. 1, p. 19-22, 2013.

SILVA, F. S. et al., Análise soropidemiológica da infecção pelo herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) em bovinos no Estado de Pernambuco. **Acta Scientiae Veterinariae.** v. 43, p. 1324, 2015.

SILVA, R. R. et al. Pesquisa de anticorpos contra a diarreia viral bovina (bvdv) em rebanhos bubalinos (*Bubalus bubalis*) do estado do Pará. **Veterinária e Zootecnia.** v. 23, n. 3, p. 430-438, 2016.

SOLTAN, M. A. et al. Circulation of bovine viral diarrhoea virus – 1 (BVDV-1) in dairy cattle and buffalo farms in Ismailia Province, Egypt. **The Journal of Infection in Developing Countries**. v. 9, n. 12, p. 1331-1337, 2015.

SOUTO, R. N. et al. Herpes simplex virus tegument protein vp16 is a component of primary enveloped virions. **Journal of Virology**. v. 80, n. 5, p. 2582-2584, 2006.

SPILKI, F. R. et al. A monoclonal antibody-based ELISA allows discrimination between responses induced by bovine herpesvirus subtypes 1 (BoHV-1.1) and 2 (BoHV-1.2). **Journal of Virological Methods**. v. 129, p. 191-193, 2005.

STRUBE, W. et al. A gE deleted infectious bovine rhinotracheitis marker vaccine for use in improved bovine herpesvirus 1 control programs. **Veterinary Microbiology**. v. 53, p. 181-189, 1996.

SUDHARSHANA, K. J.; SURESH, K. B.; RAJASEKHAR, M. Prevalence of bovine viral diarrhoea virus antibodies in India. **Revue Scientifique et Technique** (International Office of Epizootics). v. 18, p. 667-671, 1999.

THOMPSON, J. A. et al. Spatial hierarchical variances and age covariances for seroprevalence to *Leptospira interrogans* serovar hardjo, BoHV-1 and BVDV for cattle in State of Paraíba, Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**. v. 76, p. 290-301, 2006.

TIKOO, S. K. et al. Bovine Herpesvirus I (BHV-1): biology, pathogenesis and control. In: J. **Advances in virus research**. v. 5, p. 191-223, 1995.

TRANGADIA, B. J. et al. Serological investigation of bovine Brucellosis, John's disease and infectious bovine rhinotracheitis in two states of India. **Journal of Advanced Veterinary Research**, v. 2, p. 38-41, 2012.

TURIN, L.; RUSSO, S. BHV-1 infection in cattle: an update. **Veterinary Bulletin**. v. 73, p. 16-21, 2003.

URBINA, A. M.; RIVEIRA, J. L. S.; CORREA, J. C. S. Rinotraqueitis infecciosa bovina em hatos lecheros de la región cotzio-téjaro, Michoacán, México. **Técnica Pecuária em México**. v. 43, n. 1, p. 27-37, 2005.

VAN OIRSCHOT, J. T. et al. The use of marker vaccines in eradication of herpesviruses. **Journal of Biotechnology**. v. 44, p. 75-81, 1996.

- VIANA, R. B. et al. Ocorrência do vírus da leucose enzoótica dos bovinos (BLV) e de anticorpos contra herpesvírus bovino tipo-1 (BoHV-1) e vírus da diarreia viral bovina (BVDV) em búfalos no Estado do Pará. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 44, p. 1357, 2016.
- VIEIRA, S. et al. Anticorpos para o herpesvírus bovino 1 (BHV-1) em bovinos do estado de Goiás. **Ciência Animal Brasileira**. v. 4, n. 2, p. 131-137, 2003.
- VOGES, H. et al. Direct adverse effects of persistent BVDv infection in dairy heifers – a retrospective case control study. **Bovine Medicine**. v. 19, p. 22-25, 2006.
- WANG, J. et al. Validation of a real-time PCR assay for the detection of bovine herpesvirus 1 in bovine semen. **Journal of Virological Methods**. v. 144, p. 103-108, 2007.
- WANG, J. et al. An international inter-laboratory ring trial to evaluate a realtime PCR assay for the detection of bovine herpesvirus 1 in extended bovine semen. **Veterinary Microbiology**. v. 126, p. 11-19, 2008.
- XIA, H. et al. Detection and identification of the atypical bovine pestiviruses in commercial foetal bovine serum batches. **PLoS ONE**. v. 6, n. 12, 2011.
- YAN, B. F. et al. Serological survey of bovine herpesvirus type 1 infection in China. **Veterinary Microbiology**. v. 127, p. 136-141, 2008.
- ZAGHAWA, A. et al. Prevalence of antibodies to bovine viral diarrhoea virus and/or border disease virus in domestic ruminants. **Journal of Veterinary Medicine**. v. 45, p. 345-351, 1998.

5 ARTIGO CIENTÍFICO

**OCCURRENCE OF BOVINE VIRAL DIARRHEA VIRUS AND
INFECTIOUS BOVINE RHINOTRACHEITIS VIRUS IN
BUFFALOES IN PERNAMBUCO STATE**

(Submitted to journal: Tropical Animal Health and Production)

ABSTRACT

This study aimed to detect the occurrence of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and infectious bovine rhinotracheitis (IBR) virus infections in buffaloes in Pernambuco state, Brazil. For this purpose, serum samples were obtained from 244 buffaloes on eight properties distributed in six municipalities. The search for anti-BVDV and -bovine herpesvirus type-1 (BoHV-1) antibodies was performed using the virus neutralization technique. To analyze the association between the serological status of BoHV-1 infection and aspects of hygienic-sanitary and reproductive management, an investigative questionnaire with objective questions was used. In total, 97.9% (239/244) of buffaloes had anti-BVDV antibodies and 56.1% (137/244) had anti-BoHV-1 antibodies. Co-infection was observed in 55.3% (135/244) of buffaloes. The distribution of antibody occurrence in buffaloes by properties ranged from 90.5% to 100.0% for BVDV and from 4.8% to 100% for BoHV-1. It was not possible to perform an association analysis for BVDV infection; however, in that for BoHV-1 infection, the following variables exhibited a significant association: an extensive breeding system ($P < 0.001$), open herd ($P = 0.029$), lack of reproductive rest ($P = 0.029$), natural mating in females with reproductive disorders ($P < 0.001$), exploration type ($P = 0.0014$), presence of wild animals ($P < 0.001$), and lack of cleaning facilities ($P = 0.008$). In conclusion, BVDV and IBR virus infections occur in buffaloes in Pernambuco state. Thus, it is suggested that prophylactic measures, including routine diagnosis, reproductive animal control, and strict health care, will be implemented at each property to reduce the reproductive losses caused by these infections.

KEYWORDS: Diagnosis., BoHV-1., Virus neutralization., Serology.

INTRODUCTION

The reproductive efficiency in buffalo herds is essential for enhancing buffalo profitability; however, these animals are susceptible to viral, bacterial, and parasitic infections, and effects of some of these on buffaloes are not completely understood (Roncoroni et al., 2007). Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and infectious bovine rhinotracheitis (IBR) virus infections are responsible for several reproductive disorders, which cause a negative impact on buffalo herds (Martucciello et al., 2009; Fusco et al., 2015).

These diseases present a varied distribution in buffaloes, with prevalence ranging from 11.4% (Ghazi et al., 2008) to 84.2% (Craig et al., 2015) for BVDV and from 30.5% (Scicluna et al., 2007) to 100% for bovine herpesvirus type-1 (BoHV-1) (Scicluna et al., 2010; Petrino et al., 2012). In Brazil, studies conducted in different regions indicate prevalences ranging from 8.8% (Fernandes et al., 2016) to 52.7% (Lage et al., 1996) for BVDV and 14.7% (Lage et al., 1996) to 87.3% for BoHV-1 (Carvalho et al., 2015).

BVD and IBR are diseases requiring notification to the World Organization for Animal Health (OIE, 2016). Persistently infected (PI) animals are considered the main source of BVDV infection in livestock (OIE, 2015). Studies have already proven the presence of PI animals in buffalo herds (Martucciello et al., 2009; Craig et al., 2015).

Transmission in IBR mainly occurs through contact with secretions (Franco et al., 2012) and semen (Kupferschmied et al., 1986). One study indicates the presence of BoHV-1 in buffalo feces, representing a possible source of environmental contamination (Scicluna et al., 2010). Abortions, limb deformities, birth of weak offspring (Fusco et al., 2015), stillbirths (Muykens et al., 2006), and subclinical infections (Scicluna et al., 2010) have been reported in buffaloes.

Considering the development of buffalo breeding and the limited research in relation to infectious diseases affecting the reproductive ability in buffalo species, this study aimed to diagnose the epidemiological aspects associated with BVDV and IBR virus infection in buffaloes in Pernambuco state.

MATERIAL AND METHODS

The project was approved by the Ethics Committee in the Use of Animals of the Federal Rural University of Pernambuco with license n° 121/2015.

A cross sectional study was carried out in eight properties distributed in six counties in Pernambuco state, Brazil. To compose the study sample, a total of 10,500 heads (Mapa, 2015) was analyzed, with an expected prevalence of 51.1% for BVDV (Rêgo et al., 2016) and 79.5% for IBR (Silva et al., 2015). These parameters provided a minimum sample size of 196 for BVDV and 128 animals for IBR, with a 95% confidence interval, and a statistical error of 7% (Thrusfield, 2004).

A total of 244 blood samples were collected from the Agrestina (n = 5); Água Preta (n = 50); Canhotinho (n = 21); Quipapá (n = 6); Ribeirão (n = 113); Rio Formoso (n = 50) counties, of reproductive age buffaloes, of dairy and cutting ability, created in a semi-intensive and extensive way, with no history of vaccination against either BVDV or IBR.

Before collecting the biological material, an investigative questionnaire was carried out, consisting of objective questions to the breeder, referring to the property's characteristics, productive, reproductive, and sanitary management, for the association study analysis.

In all, 10 ml of blood was collected from the tail vein in the coccygeal region, after antibacterial treatment with iodized alcohol, in previously identified siliconized test tubes without coagulant. The tubes were sent to the laboratory for processing. To obtain

the serum, the samples were centrifuged at 900g for 10 minutes; the obtained serum was stored in polypropylene microtubes, identified, and maintained at -20°C until processing.

The antibody analysis for BVDV and BoHV-1 was performed by the virus neutralization (VN) technique, according to the protocol established by the World Organization for Animal Health (OIE, 2012). Serum samples were previously inactivated in a water bath at 56°C for 30 minutes and then distributed into duplicate 96 well microplates at 1:2 and 1:4 dilutions. The test was performed on Madin–Darby bovine kidney (MDBK) continuous lineage cells grown in minimal essential medium (MEM), supplemented with 2% fetal bovine serum.

As an antigen, a BVDV sample was used at the infecting dose of 100 TCID₅₀ per well, to the titration value of 3.16×10^{-4} TCID₅₀ whilst BoHV-1, was used at the infecting dose of 100 TCID₅₀ per well, previously titrated according to the Reed and Muench technique (1938), being evidenced to the titration the value of 6.31×10^4 TCID₅₀.

In all, 50 μl of medium per well was distributed in a plate, with the sera mixed in duplicate at a 1:2 and 1:4 dilutions, followed by the addition of 50 μl of viral suspension at a 100 TCID₅₀/50 μl concentration, with a cutoff of 1:4. The plates were then incubated for 1 hour for BVDV and for 24 hours for BoHV-1, in an incubator at 37°C and 5% CO₂ and, after the incubation time, 50 μl of MDBK lineage cells in 4.5×10^5 per mL concentration were added, before returning the samples to the incubator for 96 and 72 hours for BVDV and BoHV-1, respectively. To validate the test reliability, virus and cell cytotoxicity positive and negative controls were performed, respectively, on each microplate, with the cytopathic effects of these controls being evaluated before the plate samples were read.

For the association between the serological status of BoHV-1 infection and aspects of hygienic-sanitary and reproductive management, an interest variables

univariate analysis was performed using either Pearson's chi-square test (X^2) or the Fisher exact test, when necessary, considering as dependent variable the result obtained in virus neutralization (positive or negative). The EpiInfoTM 7 program was used to perform the statistical calculations and the significance level was set at 5%.

RESULTS

BOVINE VIRAL DIARRHEA VIRUS (BVDV)

The occurrence of anti-BVDV antibodies in buffaloes was 97.9% (239/244) (Table 1). From the eight sampled properties, 100% had at least one positive animal for this infection. The distribution of antibody occurrence for buffaloes by properties ranged from 90.5% to 100% (Table 2). It was not possible to perform the association analysis between the serological status of BVDV infection and the hygienic-sanitary and reproductive management aspects, since all the properties had a high occurrence of positive animals.

BOVINE HERPESVIRUS TYPE 1 (BoHV-1)

The occurrence of anti-BoHV-1 antibodies in buffaloes was 56.1% (137/244) (Table 1). From the eight sampled properties, 100% had at least one positive animal. The distribution of antibodies occurrence for buffaloes by properties ranged from 4.8% to 100% for BoHV-1 (Table 2).

In the association analysis between the serological status and the hygienic-sanitary and reproductive management aspects, a significant association was found for the following variables: an extensive breeding system; an open herd; a lack of reproductive rest; natural mating in females with reproductive disorders; exploration type (mixed); presence of wild animals; a lack of clean facilities (Table 3).

When analyzing the association between the reproductive history for BoHV-1, an association was observed between vaginal discharge ($p = 0.036$) and placental retention ($p = 0.036$).

Co-infection by DVD and BoHV-1 was observed in 55.3% (135/244) from the animals, with antibodies occurring in a range from 4.8 to 100%.

Table 1. Occurrence of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and bovine herpesvirus type-1 (BoHV-1) infection in buffaloes by counties in Pernambuco state.

Counties	VN							
	BVDV				BoHV-1			
	Positives		Negatives		Positives		Negatives	
	AF	RF (%)						
Agrestina	5	100%	0	-	01	20.0%	4	80.0%
Água Preta	49	98.0%	1	2.0%	26	52.0%	24	48.0%
Canhotinho	19	90.5%	2	9.5%	1	4.8%	20	95.2%
Quipapá	5	100%	0	-	5	100%	-	-
Ribeirão	112	99.1%	1	0.9%	80	70.8%	33	29.2%
Rio Formoso	49	98.0%	1	2.0%	24	48.0%	26	52.0%
Total	239	97.9%	5	2.1%	137	56.1%	107	43.9%

AF = Absolute frequency; RF = Relative frequency; VN = Virus neutralization.

Table 2. Occurrence of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and bovine herpesvirus type-1 (BoHV-1) infection in buffaloes by properties in Pernambuco state.

Properties	N	BVDV	BoHV-1	Co-infection
		Positivity	Positivity	
A	5	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)
B	43	43 (100%)	19 (44.2%)	19 (44.1%)
C	21	19 (90.5%)	1 (4.8%)	1 (4.8%)
D	5	5 (100%)	1 (20.0%)	1 (20.0%)
E	50	49 (98.0%)	26 (52.0%)	25 (50.0%)
F	49	48 (97.9%)	41 (83.6%)	40 (81.6%)
G	21	21 (100%)	20 (95.2%)	20 (95.2%)
H	50	49 (98.0%)	24 (48.0%)	24 (48.0%)
TOTAL	244	239 (97.9%)	137 (56.1%)	135 (55.3%)

N = Total samples

Table 3. Association analysis between serological status of bovine herpesvirus type-1 (BoHV-1) and hygienic-sanitary management aspects in buffaloes in Pernambuco state, Brazil, 2016.

Variables	N	Serology Positive	Value P
<i>Creation System</i>			
Semi-intensive	32	9 (28.1%)	<0.001^{(A)*}
Extensive	212	128 (60.4%)	
<i>Reproductive Management</i>			
Natural mount	194	111 (57.2%)	0.508 ^(A)
Natural mount + Artificial insemination	50	26 (52.0%)	
<i>Creation Type</i>			
Open	151	93 (61.6%)	0.029^{(A)*}
Closed	93	44 (47.3%)	
<i>Perform Quarantine</i>			
Yes	11	7 (63.6%)	0.759 ^(B)
No	233	130 (55.8%)	
<i>Reproductive Rest</i>			
Yes	93	44 (47.3%)	0.029^{(A)*}
No	151	93 (61.6%)	
<i>Natural Mating in Females with Reproductive Disorders</i>			
Yes	169	110 (65.1%)	<0.001^{(A)*}
No	75	27 (36.0%)	
<i>Exploration Type</i>			
Milk	93	44 (47.3%)	0.001^{(A)*}
Meat	145	87 (60.0%)	
Mixed	6	6 (100%)	
<i>Presence of Wild Animals</i>			
Yes	130	91 (70.0%)	<0.001^{(A)*}
No	114	46 (40.3%)	
<i>Isolation of Sick Animals</i>			
Yes	56	32 (57.1%)	0.879 ^(A)
No	188	105 (55.8%)	
<i>Cleaning of Facilities</i>			
Yes	98	45 (45.9%)	0.008^{(A)*}
No	146	92 (63.0%)	

^(A) Test χ^2 ; ^(B) Fisher's exact test; N = Total samples; * Significant association at 5.0% level; **Undefined.

DISCUSSION

BOVINE VIRAL DIARRHEA VIRUS (BVDV)

This is the first record of the occurrence of anti-BVDV antibodies in buffaloes in Pernambuco state. It is known that the BVDV in buffaloes is distributed worldwide, presenting a variable prevalence from 11.4% (Ghazi et al., 2008) to 84.2% (Craig et al., 2015).

The occurrence of anti-BVDV antibodies in this study was 97.9%. This was higher than those reported in other country's regions, as in the Minas Gerais State, 52.7% (295/329) (Lage et al., 1996); in the São Paulo state, 16.3% (68/417) (Pituco et al., 1997); in Rio Grande do Sul, 10.8% (19/176) (Schefer, 2013) and in the Pará State, 36.0% (63/175) (Viana et al., 2016).

Differences between serological studies in several parts of the world may occur due to several factors, such as the age of animals, the type of sampling, sanitary and nutritional management, and individual differences between each animal (Albayrak et al., 2012).

The results of the present study demonstrate a high occurrence of anti-BVDV antibodies in each of the properties in Pernambuco state, demonstrating that the animals have contact with infection sources, due to the large number of positive animals. Indeed, it is likely that there is at least one PI animal in every herd.

The agent's maintenance in the herds may be mainly related to the presence of persistently infected animals (PI), which eliminate large amounts of the virus in the environment (OIE, 2015), constituting a constant source of infection for other animals. Therefore, research must be conducted to identify these PI animals.

It was observed that 100% of the properties possessed at least one positive animal. In the Ribeira Valley, São Paulo State, the number of properties with positive buffaloes was 100% (Pituco et al., 1997). A study carried out in the Pará state indicated a prevalence difference between the properties, with a variation from 0% to 97% (Viana et al., 2016). The high number of positive animal properties may be related to the absence of biosecurity measures; a subclinical BVDV infection can occur which the owners cannot identify it, as it is not common the adoption of a reproductive program in the region.

Control of BVDV infection must be conducted to systematically reduce the occurrence of an infected herd, prevent contact with PI animals, and with females gestating PI animals is the key to reducing incidence in herds (Lindenberg; Houer, 2005). In Belgium, a study carried out on farms that eradicated BVDV observed that it is still necessary to reinforce basic biosecurity measures, for example, adequate use of protective clothing and avoid contact with neighboring herds (Sarrazin et al., 2014). Vaccination of animals is also an important strategy for infection control (Soltan et al., 2015).

BOVINE HERPESVIRUS TYPE 1 (BOHV-1)

It is also noted that this is the first record of the occurrence of anti-BoHV-1 antibodies in buffaloes in Pernambuco state. The occurrence of the anti-BoHV-1 antibody in this study was 56.1% (137/244). In other states, both lower and higher prevalences were reported compared to this study, for example, in Minas Gerais, 14.7% (38/329) by the VN test (Lage et al., 1996) and in Maranhão, 87.3% (267/306) by the ELISA technique (Carvalho et al., 2015).

The differences between the results of this study with those carried out in other country regions can be justified by the differences between the hygienic-sanitary management of the herds, age of the animals, reproductive management type (Dias et al.,

2012), production systems, size of the herds (Mainar-Jaime et al., 2001). Besides each region's climatic characteristics, geographic factors, exploration type and population sampled (Freitas et al., 2014) are different.

Regarding the number of properties with positive animals, all tested positive for at least one positive animal, like that found in Pernambuco in cattle (Silva et al., 2015). In Goiás, 98.5% of the properties had at least one positive animal (Barbosa et al., 2005). The high number of properties with positive animals may be related to several factors, including the ability of the virus to remain latent, thus introducing a single animal infected with BoHV-1 sufficient for infection spread and perpetuation in buffaloes. In addition to the neglect of bubaline health and lack of knowledge about this infection pathogenesis, associated with the lack of diagnosis and initiatives to implement control and prevention programs (Carvalho et al., 2015). It is believed that the introduction of infected animals and the lack of disease knowledge by the producers may have been responsible for the agent's introduction and maintenance in the herds.

In the association analysis between the serological status and the hygienic-sanitary and reproductive management aspects, a higher frequency of positive animals was observed in the herds that adopted an extensive breeding system ($P < 0.001$); this may occur due to a low control of reproductive diseases, when compared to dairy farming, and may occur because of the agent's introduction into free properties (Dias et al., 2012). Another hypothesis, would be the possible contact with neighboring herds, facilitating direct contact with infected animals or the indirect contamination by contaminated water and food (Engels; Ackermann, 1996).

In relation to the type of herd, an association was observed for open herds ($P = 0.029$); this variable was identified as a risk factor in cattle raised in the Paraná state (Dias et al., 2012). This association can be attributed to other variables, such as if the animals

were purchased at agricultural fairs or not (Van Schaik et al., 1998). The animals purchased at fairs was identified as a risk factor in buffaloes, in the Paraíba state, highlighting the importance of performing a sanitary control and serological diagnosis in the purchase of animals, to avoid introduction of infected animals in the herds (Fernandes et al., 2016).

The presence of wild animals presented an association ($P < 0.001$) with the positivity in the VN. It can be explained by the fact that, although some animals do not play an important role in the dissemination of BoHV-1, they can take on the role of carrying the virus when moving from one place to another and between properties (Van Schaik et al., 1998).

Another variable that showed an association with the frequency of positive samples was a lack of cleaning facilities ($P = 0.008$). It is known that the transmission of BoHV-1 can occur through contaminated aerosols and fomites (Lemaire et al., 1994) and by contact with respiratory, ocular, and reproductive secretions (Franco et al., 2012). In buffaloes, in Paraíba, the presence of sites with water points was a risk factor, probably related to indirect transmission by contaminated water ingestion; these animals have a habit of bathing in mud puddles or water points and urinating and defecating, there being ingestion of contaminated water in these places (Fernandes et al., 2016). Corroborating the study that indicates the presence of BoHV-1 buffalo feces, indicative of a source of environmental contamination (Scicluna et al., 2010).

Regarding reproductive management, a reproductive absence ($P = 0.029$) and natural mating in females with reproductive disorders ($P < 0.001$) displayed a significant association. This may have occurred due to the use of transfer bulls and by the practice of lending bulls to other properties, which mate with many females, contributing to the spread of BoHV-1 in the herds.

Semen is an important elimination route for BoHV-1, increasing the probability of virus infection on properties that use the practice of natural mating as a reproductive method in herds. Artificial insemination centers may be sure of the agent's absence in the semen (Dias et al., 2008). Transmission may also occur by contact with preputial or vaginal mucus (Franco et al., 2012).

In the herds where the BoHV-1 infection occurred, the animals presented a history of reproductive disorders, such as vaginal discharge ($P = 0.036$) and placental retention ($P = 0.036$). Reproductive disorders and abortions have already been associated with BoHV-1 infection in buffaloes, indicating that the virus can be expressed pathogenically in buffaloes (Fusco et al., 2015).

Co-infection was observed in 55.3% (135/244) of the animals. This result may be associated with the ability of BVDV to cause immunosuppression in animals, facilitating the maintenance of BoHV-1 in herds (Headley et al., 2014). In a study carried out in buffalo herds, in Paraíba and Pará state, respectively, a co-infection was observed between BVDV and BoHV-1 (Fernandes et al., 2016; Viana et al., 2016).

Finally, several prophylactic measures could be introduced including diagnosing infected animals, a strict sanitary management, animals' immunization, reproductive control, animal traffic control, and implementing biosecurity measures (Nandi et al., 2011).

CONCLUSION

This is the first record of BVDV and BoHV-1 infections in buffaloes in Pernambuco state and, from the results obtained verified that BVDV and BoHV-1 infections are distributed in buffaloes in the region. It is recommended that prophylactic measures such as routine diagnosis, reproductive control, and strict health care such as cleaning of facilities, avoiding contact with neighboring herds, acquisition of animals

with a negative diagnosis and the use of an artificial insemination program must be implemented in the properties with the purpose of reducing the reproductive losses caused by these infections.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare that they have no conflict of interest

REFERENCES

- Albayrak, H., Özán, E., Beyhan, Y.E., Kurt, M., Kiliçoğlu, Y., 2012. A Serological investigation of some aetiological agents associated with abortion in domestic water buffalo (*Bubalus bubalis* Linnaeus, 1758) in Samsun Province of Northern Turkey. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 7, 155-160.
- Barbosa, A.C., Brito, W.M., Alfaia, B.T., 2005. Soroprevalência e fatores de risco para a infecção pelo herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1) no Estado de Goiás, Brasil. *Ciência Rural*, 35, 1368-1373.
- Carvalho, O.S., Gonzaga, L.N.R., Albuquerque, A.S., Bezerra, D.C., Chaves, N.P., 2015. Occurrence of *Brucella abortus*, *Leptospira interrogans* and bovine herpesvirus type 1 in buffalo (*Bubalus bubalis*) herd under extensive breeding system. *African Journal of Microbiology Research*, 9, 598-603.
- Craig, M.I., König, G.A., Benitez, D.F., Draghi, M.G., 2015. Molecular analyses detect natural coinfection of water buffaloes (*Bubalus bubalis*) with bovine viral diarrhoea viruses (BVDV) in serologically negative animals. *Revista Argentina de Microbiología*, 26, 1-4. DOI.org/10.1016/j.ram.2015.03.001.
- Dias, J.A., Alfieri, A.A., Médici, K.C., Freitas, J.C., Ferreira Neto, J.S., Muller, E.E., 2008. Fatores de risco associados à infecção pelo herpesvírus bovino 1 em rebanhos bovinos da região Oeste do Estado do Paraná. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 28, 161-168.
- Dias, J.A., Alfieri, A.A., Ferreira-Neto, J.S., Gonçalves, V.S.P., Muller, E.E., 2012. Seroprevalence and Risk Factors of Bovine Herpesvirus 1 Infection in Cattle Herds in the State of Parana, Brazil. *Transboundary and Emerging Diseases*. DOI:10.1111/j.1865-1682.2012.01316.x.
- Engels M., Ackermann M., 1996. Pathogenesis of ruminant herpesviruses infections. *Veterinary Microbiology*, 53, 3-15.
- Fernandes, L.G., Pimenta, C.L.R.M., Pituco, E.M., Lima Brasil, A.W., Azevedo, S.S., 2016. Risk factors associated with BoHV-1 and BVDV seropositivity in buffaloes (*Bubalus bubalis*) from the State of Paraíba, Northeastern Brazil. *Ciências Agrárias*, 37, 1929-1936. DOI: 10.5433/1679-0359.2016v37n4p1929.

- Franco, A.C., Roehe, P.M., Varela, A.P.M., 2012. Herpesviridae, In: FLORES, E.F., *Virologia Veterinária*, Santa Maria-RS, Ed. Da UFSM, cap. 18, pp.503-570.
- Freitas E.J.P., Lopes, C.E.R., Moura Filho, J.M., Sá, J.S., Santos, H.P., Pereira, H.M., 2014. Frequência de anticorpos contra o herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) em bovinos de corte não vacinados. *Ciências Agrárias*, 35, 1301-1310. DOI: 10.5433/1679-0359.2014v35n3p1301.
- Fusco, G., Amoroso, M.G., Aprea, G., Veneziano, V., Guarino, A., Galiero, G., Viscardi, M., 2015. First report of natural BoHV-1 infection in water buffalo. *Veterinary Record*. DOI: 10.1136/vr.103139.
- Ghazi, Y.A., El-Cherif, A.M., Azzam, R.A., Hussein, H.A., 2008. Diagnostic studies on bovine diarrhea infection in cattle and buffaloes with emphasis on gene markers. *Global Veterinária*, 2, 92-98.
- Headley, S.A., Alfieri, A.A., Fritzen, J.T.T., Queiroz, G.R., Lisbôa, J.A.N., Netto, D.P., Okano, W., Flaiban, K.K.M.C., Alfieri, A.F., 2014. Concomitant bovine viral diarrhea, mycotoxicosis, and seneciosis in beef cattle from northern Paraná, Brazil. *Ciências Agrárias*, 35, 2563-2576.
- Kupferschmied, H.U., Kihm, U., Bachmann, P., Muller, K.H., Ackermann, M., 1986. Transmission of IBR/IPV virus in bovine semen: A case report. *Theriogenology*, 25, 439-443.
- Lage, A. P., Castro, R.S., Melo, M.I.V., Aguiar, P.H.P., Barreto Filho, J.B., R.C. Leite, R.C., 1996. Prevalence of antibodies to bluetongue, bovine herpesvirus 1 and bovine viral diarrhea/ mucosal disease viruses in water buffaloes in Minas Gerais State, Brazil. *Revue d'élevage et médecine vétérinaire des pays tropicaux*, 49, 195-197.
- Lemalre, M., Pastoret, P.P., Tlliry, E., 1994. Le contrôle de l'infection par le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine. *Annales de Médecine Vétérinaire*, 138, 167-180.
- Lindberg, A., Houe, H., 2005. Characteristics in the epidemiology of bovine viral diarrhea virus (BVDV) of relevance to control. *Prev. Preventive Veterinary Medicine*, 72, 55-73.
- Mainar-Jaime, R.C., Berzal-Herranz, B., Arias, P., Rojo-Vázquez, F.A., 2001. Epidemiological pattern and risk factors associated with bovine viral diarrhoea (BVDV) infection in a non-vaccinated dairy-cattle population from the Asturias region of Spain. *Preventive Veterinary Medicine*, 52, 63-73.
- Martucciello, A., De Mia, G.M., Giammarioli, M., Donato, I., Lovane, G., Galiero, G., 2009. Detection of bovine viral diarrhea virus from three water buffalo fetuses (*Bubalus bubalis*) in southern Italy. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 21, 137-140.

- Muylkens, B., Thiry, J., Kirten, P., Schynts, F., Thiry, E., 2006. Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. *Veterinary Research*, 38, 181–209.
- Nandi, S., Kumar, M., Yadav, V., Chander, V., 2011. Serological evidences of bovine herpesvirus-1 infection in bovines of organized farms in India. *Transboundary and Emerging Diseases*, 58, 105–109. DOI:10.1111/j.1865-1682.2010.01185.x.
- OIE., 2012. Organização Mundial de Saúde Animal. Infectious Bovine Rhinotracheitis/Infectious Pustular Vulvovaginitis. In: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. 7 ed. cap. 2.4.13, 1-17. OIE, Paris.
- OIE., 2015. Organização Mundial de Saúde Animal, Bovine Viral Diarrhoea. In: *OIE Terrestrial Manual*. Cap. 2.4.8, 1-22. OIE, Paris.
- OIE., 2016. Listed diseases, infections and infestations in force in 2016.
- Petrine, S., Amoroso, M.G., Perugini, G., Gianfelici, P., Corrado, F., Bazzucchi, M., Paniccià, M., Casciari, C., Fortunati, M., Giammarioli, M., et al., 2012. Rilievo del bubaline herpesvirus 1 (BuHV-1) in un allevamento di bufali nel centro Italia. *Large Animal Review*, 18, 113-116.
- Pituco, E.M., Del Fava, C., Okuda, L.H., De Stefano, E., Bilinskyj, M.C.V., Samara, S.I., 1997. Prevalência da infecção pelo vírus da diarreia viral bovina (BVD) em búfalos (*Bubalus bubalis*) no Vale do Ribeira, SP, Brasil. *Arquivos do Instituto Biológico*, 64, 23-28.
- Reed, L.J., Muench, H., 1938. A simple method of estimating 50 per cent end point. *American Journal of Hygiene*, 27, 493-497.
- Rêgo, M.J.P., Batista Filho, A.F.B., Oliveira, P.R.F., Borges, J.M., França, C.A.B., Ribeiro, C.P., Pituco, E.M., Pinheiro Junior, J.W., 2016. Epidemiological analysis of infection by the bovine viral diarrhea virus on family farms in Brazil. *Ciencias Agrárias*, 37, 4119-4130.
- Roncoroni, C., Barile, V.L., Allegrini, S., Grifoni, G., Pettrossi, N., Fagiolo, A., 2007. Serological survey and reproductive performances in buffaloes under fixed time artificial insemination. *Italian Journal of Animal Science* 6, 828-831.
- Sarrazin, S., Cay, A. B., Laureyns, J., Dewulf, J., 2014. A survey on biosecurity and management practices in selected Belgian cattle farms. *Preventive Veterinary Medicine*, 117, 129–139. DOI.org/10.1016/j.prevetmed.2014.07.014.
- Scheffer, C. M., 2013. Herpesvírus e Pestivírus em Rebanhos Bubalinos do Rio Grande do Sul. 2013. 98.f. Dissertação (em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre (RS), Brasil.
- Scicluna, M.T., Saralli, G., Bruni, G., Sala, M., Cocumelli, C., Caciolo, D., Condoleo, R.U., Autorino, G.L., 2007. Epidemiological situation of herpesvirus infections

in buffalo herds: Bubaline herpesvirus1 or bovine herpesvirus1?. Italian Journal of Animal Science, 6, 845-849.

Scicluna, M.T., Caprioli, A., Saralli, G., Manna, G., Barone, A., Cersini, A., Cardeti, G., Condoleo, R.U., Autorino, G.L., 2010. Should the domestic buffalo (*Bubalus bubalis*) be considered in the epidemiology of bovine herpesvirus 1 infection?. Veterinary Microbiology, 143, 81–88.

Silva, F.S., Oliveira, J.M.B., Batista Filho, A.F.B., Ribeiro, C.P., Pituco, E.M., Pinheiro Junior, J.W., 2015. Análise soropidemiológica da infecção pelo herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) em bovinos no Estado de Pernambuco. Acta Scientiae Veterinariae, 43, 1324.

Soltan, M.A., Wilkes, R.P., Elsheery, M.N., Elhaig, M.M., Riley, M.C., Kennedy, M.A., 2015. Circulation of bovine viral diarrhea virus – 1 (BVDV-1) in dairy cattle and buffalo farms in Ismailia Province, The Journal of Infection in Developing Countries, 9, 1331-1337.

Thrusfield, M.V., 2004. Epidemiologia Veterinária. 2ª ed. São Paulo: Roca.

Van Schaik, G., Dijkhuizen, A.A., Huirne, R.B.M., Schukken, Y.H., Nielen, M., Hage, H.J., 1998. Risk factors existence of bovine herpesvirus 1 antibodies on nonvaccinating Dutch dairy farms. Preventive Veterinary Medicine, 34, 125-136.

Viana, R.B., Del Fava, C., Monteiro, B.M., Moura, A.C.B., Albuquerque, R.S., Cardoso, E.C., Araújo, C.V., Pituco, E.M., 2016. Ocorrência do vírus da leucose enzoótica dos bovinos (BLV) e de anticorpos contra herpesvírus bovino tipo-1 (BoHV-1) e vírus da diarréia viral bovina (BVDV) em búfalos no Estado do Pará. Acta Scientiae Veterinariae, 44, 1357.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este é o primeiro registro das infecções pelos vírus da Diarreia Viral Bovina e Herpesvírus Bovino Tipo -1 em búfalos no estado de Pernambuco e, a partir dos resultados obtidos pôde-se constatar que às infecções pelo BVDV e BoHV-1 apresentam-se distribuídas em bubalinos na região.

Sugere-se que medidas de profilaxia como o diagnóstico rotineiro, controle reprodutivo dos animais, cuidados sanitários rigorosos como a limpeza de instalações, evitar contato com rebanhos vizinhos, aquisição de animais com diagnóstico negativo e utilização de um programa de inseminação artificial, devem ser implementados nas propriedades, com o intuito de diminuir as perdas reprodutivas ocasionadas por estas infecções.

7 APÊNDICE A. Questionário Investigativo



QUESTIONÁRIO INVESTIGATIVO FATORES DE RISCO ASSOCIADOS À INFECÇÃO PELO VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA E RINOTRAQUEÍTE INFECCIOSA BOVINA

Nome da Propriedade: _____ Município: _____
 Proprietário: _____ Estado: _____
 Endereço: _____ Telefone: _____
 Email: _____
 Data: ___ / ___ / _____
 Questionário nº _____
 Investigador: _____

DADOS DA PROPRIEDADE

1) Sistema de Criação:

- 1- Intensivo ()
- 2- Extensivo ()
- 3- Semi-Intensivo ()

2) Assistência Veterinária:

- 1- Não ()
- 2- Permanente ()
- 3- Temporária/Esporádica ()

3) Qual o tamanho do rebanho?

- 1- Abaixo de 50 animais ()
- 2- Entre 51 e 100 animais ()
- 3- Entre 101 e 200 animais ()
- 4- Acima de 200 animais ()

4) Qual a fonte de volumoso oferecida aos animais?

- 1- Pasto ()
- 2- Silagem ()
- 3- Capim ()
- 4- Outras: _____

5) Fonte de água

- 1- Parada ()
- 2- Corrente ()
- 3- Mista ()

6) Vacina os animais (BVD/IBR)?

- 1- Sim ()
- Quais: _____
- 2- Não ()

7) Os animais para reposição são provenientes da propriedade?

- 1- Sim ()
- 2- Não ()

8) Qual a taxa anual de reposições dentro do rebanho?

- 1- Abaixo de 50 animais ()
- 2- Entre 51 e 100 animais ()
- 3- Entre 101 e 200 animais ()
- 4- Acima de 200 animais ()

9) Quando importa animais realiza quarentena?

- 1- Sim ()
- 2- Não ()

10) Qual o tipo de manejo reprodutivo utilizado na propriedade?

- 1- Monta Natural ()
- 2- Inseminação artificial ()
- 3- Transferência de embriões ()

11) Se realiza monta natural, há empréstimos de touros para outras propriedades?

- 1- Sim ()
- 2- Não ()

12) Se realiza Inseminação artificial, o sêmen é acompanhado de atestados sanitários?

- 1- Sim ()
- 2- Não ()

13) Já houve casos de aborto na propriedade?

- 1- Sim ()
- 2- Não ()

14) Em que terço da gestação ele ocorreu?

- 1- 1/3 ()

2- 2/3 ()

3- 3/3 ()

15) Houve casos de repetição de cio na propriedades?

- 1- Sim ()
- 2- Não ()

16) Foi observado corrimento vaginal purulento nas vacas?

- 1- Sim ()
- 2- Não ()

17) Foi observado retenção de placenta nas vacas?

- 1- Sim ()
- 2- Não ()

18) Os touros que utilizados na reprodução cobrem fêmeas que apresentam distúrbios reprodutivos?

- 1- Sim ()
- 2- Não ()

19) Utiliza touro de repasse?

- 1- Sim ()
- 2- Não ()

8 APÊNDICE B. Termo de Autorização



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
UNIDADE ACADÊMICA DE GARANHUNS

Av. Bom Pastor, s/n – Boa Vista – CEP 55292-270 – Garanhuns, PE
Telefones: (087) 3761.0882 e 3761.0969

TERMO DE AUTORIZAÇÃO

Eu, _____
_____, portador do CPF de número _____ e RG
_____ autorizo a coleta do material biológico necessário para a
execução do projeto intitulado Estudo epidemiológico da infecção pelo vírus da Diarreia
Viral Bovina e Rinotraqueíte Infecciosa Bovina, em búfalos no estado de Pernambuco e
também a publicação dos resultados obtidos para a comunidade científica.

_____, ____/____/____

9 ANEXO A. Licença para uso de animais em pesquisa



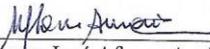
Universidade Federal Rural de Pernambuco
 Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n,
 Dois Irmãos - CEP: 52171-900 - Recife/PE

Comissão de ética no uso de animais - CEUA

Licença para o uso de animais em experimentação e/ou ensino

O Comitê de ética no uso de animais CEUA da Universidade Federal Rural de Pernambuco, no uso de suas atribuições, autoriza a execução do projeto discriminado abaixo. O presente projeto também se encontra de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11794/2008.

Número da licença	121/2015
Número do processo	23082.020472/2015
Data de emissão da licença	09 de Novembro de 2015
Título do Projeto	Estudo Epidemiológico da Infecção pelo Vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) e Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR) em Búfalos no Estado de Pernambuco . .
Finalidade (Ensino, Pesquisa, Extensão)	Pesquisa.
Responsável pela execução do projeto	José Wilton Pinheiro Júnior .
Colaboradores	Larice Bruna Ferreira Soares; Júnior Mário Baltazar de Oliveira ; Érica Chaves Lúcio; Bruno Pajeú e Silva ; Jonas de Melo Borges ; Alison Alves de Macêdo .
Tipo de animal e quantidade total autorizada	Bubalino ; total de 385 animais (Machos e Fêmeas).


 Prof.^a Dra. Marleyne José Afonso Accioly Lins Amorim
 (Coordenadora da CEUA-UFRPE)



Prof.^a Dr. Marleyne Amorim
 Coordenadora CEUA