

# **INSTITUTO BIOLÓGICO**

## **PÓS-GRADUAÇÃO**

Caracterização dos Gêneros *Pestivirus* e *Hepacivirus* com a finalidade de identificação para possível desenvolvimento de kits diagnósticos específicos

**PRISCILLA SCHOEPS FELICIO**

Tese apresentada para a obtenção do título de Doutora em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.  
Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema

Orientadora: Profa. Dra. Liria Hiromi Okuda

**São Paulo  
2022**

**SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO DO ESTADO DE SÃO  
PAULO**

**AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS  
INSTITUTO BIOLÓGICO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE, SEGURANÇA ALIMENTAR  
E AMBIENTAL NO AGRONEGÓCIO**


**CARACTERIZAÇÃO DOS GÊNEROS *Pestivirus* E *Hepacivirus* COM A  
FINALIDADE DE IDENTIFICAÇÃO PARA POSSÍVEL DESENVOLVIMENTO DE  
KITS DIAGNÓSTICOS ESPECÍFICOS**

**PRISCILLA SCHOEPS FELICIO**

Tese apresentada para a obtenção do título de Doutora em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio. Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.

SÃO PAULO  
2022

Eu **Priscilla Schoeps Felício**, autorizo o Instituto Biológico (IB-APTA), da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, a disponibilizar gratuitamente e sem ressarcimento dos direitos autorais, o presente trabalho acadêmico de minha autoria, no portal, biblioteca digital, catálogo eletrônico ou qualquer outra plataforma eletrônica do IB para fins de leitura, estudo, pesquisa e/ou impressão pela Internet desde que citada a fonte.

Assinatura:  **PRISCILLA SCHOEPS FELICIO**  
Data: 20/08/2023 11:52:27-0000  
 Verifique em: https://verificador.dfdfe.gov.br

Data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo**  
**Núcleo de Informação e Documentação – IB**

---

Felício, Priscilla Schoeps.  
 Caracterização dos Gêneros Pestivirus e Hepacivirus com a finalidade de identificação para possível desenvolvimento de kits diagnósticos específicos. / Priscilla Schoeps Felício. - São Paulo, 2022.  
 145 p.  
 doi: 10.31366/PGSSAAA.2022T.PF006

Tese (Doutorado). Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação.  
 Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.  
 Linha de pesquisa: Qualidade de produtos e processos na produção animal.

Orientador: Lília Hiroshi Okuda.  
 Versão do título para o inglês: Characterization of the genus Pestivirus and Hepacivirus with the purpose of identification for the possible development of specific diagnostic kits.

1. BVD/ 2. Hepflor/ 3. Diagnóstico 4. Inovação I. Felício, Priscilla Schoeps II. Okuda, Lília Hiroshi III. Instituto Biológico (São Paulo) IV. Título.

IBD/20/2022-006

---

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

Nome: Priscilla Schoeps Felicio

Título: Caracterização dos gêneros *Pestivirus* e *Hepacivirus* com a finalidade de identificação para possível desenvolvimento de kits diagnósticos específicos.

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio do Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, para a obtenção do título de Doutora em Sanidade, Segurança Alimentar no Agroecossistema.

Aprovado em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**Banca Examinadora**

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

**DEDICATÓRIA**

À minha mãe Sonia Maria, aos meus irmãos José Antonio, Renato, tia Ir. Iracema Schoeps e familiares.

Ao meu pai José Antonio Felicio (*in memoriam*)

## AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento do projeto (processo n. 2019/14164-1) por meio do programa de “Bolsas Concedidas como Ítens Orçamentários em Auxílios / BCO - Doutorado - Fluxo Contínuo”.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de financiamento 001, pelo apoio recebido sem o qual este trabalho não seria realizado.

À Profa. Dra. Liria Hiromi Okuda pela amizade e orientações acadêmicas para finalização deste trabalho.

À Profa. Dra. Edviges Maristela Pituco pela orientação inicial.

À Comissão de Pós Graduação.

Ao corpo docente da Pós Graduação do Instituto Biológico por sempre garantir a qualidade ao Curso.

Aos Pesquisadores científicos:

- Adriana Hellmeister de Campos Nogueira pela amizade sincera ao longo dos anos, apoio e por toda colaboração desde a fase inicial e todo desenvolvimento do projeto.
- Eliana de Stefano pela colaboração sempre prontamente disposta à concretização deste trabalho.
- Claudia Del Fava, Eliana Monteforte Cassaro Villalobos e Maria do Carmo C. S. H. Lara pela inesgotável amizade de sempre.

Aos Funcionários do Instituto Biológico:

Marta Elizabeth Scarelli Vicente pela amizade, compartilhamento de conhecimento e incentivo.

Márcia Regina pela presença contínua em todos os momentos.

Aos funcionários do Laboratório de Vírus de Bovídeos que sempre procuraram me auxiliar da melhor maneira possível, em especial, ao Sr. Abrahão José Abait.

Aos colegas de Pós Graduação pelo convívio harmonioso e incomparável (Anna C.C. Junqueira, Yuzen Carvalho, Fabiola S. L. Santos e Luara Cassiano).

*“O Brasil precisa de ciência e não pode desperdiçar seus valores”*  
José Reis



## RESUMO

FELICIO, P. S. “Caracterização dos Gêneros *Pestivirus* e *Hepacivirus* com a finalidade de identificação para possível desenvolvimento de kits diagnósticos específicos” São Paulo, 2022, 145f., Tese de Doutorado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio – Instituto Biológico de São Paulo.

O vírus da diarreia viral bovina (BVDV) com suas variantes são considerados importantes patógenos na bovinocultura brasileira, e o *Hepacivirus* bovino (HepBovV) ainda é pouco estudado, e seu impacto na cadeia produtiva desconhecido. A relação genética e antigênica entre esses vírus, devido às reações cruzadas que apresentam, pode representar dificuldade nos métodos diagnósticos. A vacinação é uma das formas de controle de BVDV adotada no país, porém, vacinas importadas, o que levanta o questionamento para controle efetivo frente às estirpes virais nativas. Quanto ao HepBovV, por ainda ter seu efeito pouco estudado nos animais, não se avança a necessidade de desenvolver vacina. Os objetivos do presente estudo foram os de identificar bovinos positivos de até 15 meses de idade para BVDV e HepBovV utilizando testes moleculares e imunodiagnósticos que possam auxiliar a identificação de possíveis biomarcadores para BVDV e HepBovV, visando contribuir no desenvolvimento de kits diagnósticos capazes de distingui-los e verificar as correlações genéticas entre esses vírus da família *Flaviviridae*. No estudo piloto foram caracterizadas amostras positivas para BVDV pela RT-PCR convencional, sequenciamento e análise filogenética a partir de 683 amostras de sangue total bovino utilizando-se *primers* da região 5'UTR, sendo identificados pelo sequenciamento de Sanger, seis para HepBovV (99%) e uma amostra para o atípico Hobi-like (*Pestivirus* H), com 99% de identidade. Esse resultado evidencia que os *primers* da região 5'UTR para BVDV apresentaram possível reatividade cruzada no teste molecular com HepBovV. Na etapa seguinte, ampliada a amostragem para 9.026 amostras de sangue total bovino, analisadas em *pools* de cinco amostras, totalizando 1.805 *pools*, pela técnica de RT-qPCR para BVDV. Para comparação dos resultados com outras metodologias diagnósticas, as amostras positivas na RT-qPCR foram testadas pelo ELISA BVDV antígeno (ELISA-Ag BVDV da IDEXX®) e isolamento viral em cultivo celular seguido de Imunoperoxidase (IPX). Das 9026 amostras de sangue analisadas sob a forma de *pool* de cinco amostras foram detectados 6,4% (115/1.805) *pools* positivos, os quais ao serem individualizados revelaram 1,43% (129/9.026) amostras de BVDV positivas. As 129 amostras positivas na RT-qPCR foram submetidas ao teste de ELISA-Ag, o qual confirmou 60 animais positivos, e demonstrou a possível reatividade cruzada com outros *Pestivirus* na RT-qPCR. No sequenciamento de Sanger identificaram-se os vírus BVDV3 (30) e o HepBovV (1). Foram submetidas ao isolamento em célula MDBK, 123 amostras de sangue total bovino e a avaliação quanto à presença do BVDV foi realizada pela IPX, sendo que 19 isolados apresentaram-se positivos ao BVDV não citopatogênico (NCP), sendo possível confirmar o isolamento do BVDV-1d e do BVDV-3, ambos NCP. Foram incluídos no presente estudo dois fetos de uma propriedade leiteira com problemas reprodutivos, as quais foram positivas no ELISA-Ag e RT-qPCR para BVDV tendo sido identificada a estirpe BVDV-1a pelo sequenciamento de Sanger com 98% de identidade. Formou-se um banco de amostras de sangue, tecidos fetais e vírus isolados em cultivo celular que poderão ser utilizados para o desenvolvimento de novos kits diagnósticos.

Palavras-chave: BVDV, HepBovV, diagnóstico, inovação.

## ABSTRACT

FELICIO, P. S. “Characterization of the genes *Pestivirus* and *Hepacivirus* with the purpose of identification for the possible development of specific diagnostic kits” São Paulo, 2022, 145p. Doctoral thesis in Health, Food and Environmental Safety in Agrobusiness – Instituto Biológico, São Paulo.

The bovine viral diarrhea virus (BVDV) with its variants is considered important pathogen in Brazilian cattle, and the Bovine *Hepacivirus* (HepBovV) is still less studied and the impact on the productive chain is unknown. The genetic and antigenic relationship between these viruses, due to the cross-reactions, may represent difficulties in the diagnostic methods. Vaccination is one of the forms of BVDV control adopted in the country, however, the vaccines are imported, which raises the question of effective control against native viral strains. For HepBovV, as its effect on animals is still poorly studied, there is no need to develop a vaccine. The objectives of the present study were to identify positive cattle under 15 months of age for BVDV and HepBovV using molecular and immunodiagnostic to identify possible biomarkers for BVDV and HepBovV, and contributing to the development of diagnostic kits capable of distinguishing them and verify the genetic correlations among these viruses of the Flaviviridae family. In the pilot study, positive samples for BVDV were characterized by conventional RT-PCR, sequencing, and phylogenetic analysis from 683 samples of bovine whole blood using primers from the 5'UTR region, being identified by Sanger sequencing, six for HepBovV (99 %) and a sample for the atypical Hobi-like (*Pestivirus H*), with 99% identity. These results showed that the primers of the 5'UTR region for BVDV showed possible cross-reactivity in the molecular test with HepBovV. In the next step, the sample was expanded to 9,026 samples of whole bovine blood, analyzed in pools of five samples, totaling 1,805 pools, using the RT-qPCR technique for BVDV. To compare the results with other diagnostic methodologies, the positive samples in the RT-qPCR were tested by ELISA BVDV antigen and viral isolation in cell culture followed by immunoperoxidase (IPX). Of the 9,026 blood samples analyzed in the pool form of five samples, 6.4% (115/1,805) positive pools were detected, which when individualized revealed 1.43% (129/9,026) positive BVDV samples. The 129 positive samples in RT-qPCR were analyzed in the ELISA-Ag test and 60 animals were confirmed positive for BVDV in the ELISA BVDV antigen, that is, 69 were negative in this test. demonstrating the possible cross-reactivity with other *Pestiviruses* or false positives in RT-qPCR. In Sanger sequencing, BVDV3 (30) and HepBovV (1) viruses were identified. The 123 samples of bovine whole blood were subjected to isolation in MDBK cells and to verify for the presence of BVDV it was performed IPX, with 19 isolates being positive for non-cytopathogenic BVDV (NCP), it was possible to confirm the isolation of BVDV -1d and BVDV-3, both NCP. Two fetuses from a dairy farm with reproductive problems were included in the present study, which were positive in ELISA-Ag and RT-qPCR for BVDV and the BVDV-1a strain was identified by Sanger sequencing with 98% identity. A bank of blood samples, fetal tissues, and viruses isolated in cell culture was created, which could be used for the development of new diagnostic kits.

Keywords: BVDV, BovHepV, diagnosis, innovation.

## LISTA DE FÍGURAS

Figura 1 -	Partícula viral de membros da família <i>Flaviviridae</i> (representação esquemática).	29
Figura 2 -	Estrutura e organização do genoma dos <i>Pestivirus</i> .	30
Figura 3 -	Estrutura e organização do genoma do <i>Hepacivirus</i> .	31
Figura 4	Delineamento Experimental do projeto com os métodos para o estudo.	50
Figura 5 -	Extração e análise do material genético individualmente e sob a forma de <i>pool</i> de cinco amostras.	52
Figura 6 -	Eletroforese da RT-PCR do <i>Hepacivirus</i> bovino para diferentes gradientes de temperatura (°C).	61
Figura 7 -	Eletroforese da RT-PCR para BVDV usando o set de <i>primers</i> da região 5'UTR para BVDV.	73
Figura 8 -	Árvore filogenética da família <i>Flaviviridae</i> : <i>Pestivirus</i> H e <i>Hepacivirus</i> bovino.	75
Figura 9 -	Curva Padrão de amplificação por meio da RT-qPCR com oligonucleotídeos recomendados pela OMSA para o BVDV-1 NADL.	78
Figura 10 -	Curva padrão de amplificação por meio da RT-qPCR, utilizando-se o conjunto de <i>primers</i> recomendados pela OMSA frente ao vírus padrão BVDV-2.	80
Figura 11 -	Curva Padrão de amplificação por meio da RT-qPCR, utilizando-se o conjunto com Oligonucleotídeos descritos por BHUDEVI; WEINSTOCK (2001) frente ao vírus padrão BVDV - 1 NADL, sob filtro de leitura FAM (465-510).	82
Figura 12 -	Curva Padrão de amplificação por meio da RT-qPCR, utilizando-se o conjunto de oligonucleotídeos descritos por BHUDEVI; WEINSTOCK (2001) frente ao vírus padrão BVDV - 2, sob o filtro de leitura VIC (533-580).	84

Figura 13 -	Curvas de amplificação realizada para o KIT Virotype utilizando-se o vírus BVDV-1 NADL, sob filtro de leitura FAM (465-510).	86
Figura 14 -	Curvas de amplificação do controle endógeno, para o Kit Comercial Virotype® BVDV RT-PCR, sob o filtro de leitura HEX (533-580).	87
Figura 15 -	Curvas de amplificação realizada para o KIT Virotype utilizando-se o vírus BVDV-2 sob o filtro de leitura FAM (465-510).	88
Figura 16 -	Reação de imunoperoxidase (IPX) para a detecção de antígenos virais (BVDV).	93
Figura 17-	Placa de ELISA captura de antígenos: Kit de ELISA BVDV Ag - IDEXX laboratories®.	95
Figura 18 -	Árvore filogenética da família <i>Flaviviridae</i> demonstrando a genotipagem dos vírus isolados de dois fetos no LVB/ IB (LVB 9931/20 e LVB 9932/20).	97
Figura 19 -	Árvore filogenética da família <i>Flaviviridae</i> : <i>Pestivirus</i> H (BVDV-3) e <i>Hepacivirus</i> (HepBovV) demonstrando a genotipagem dos vírus encontrados nas amostras de sangue.	99
Figura 20 -	Árvore filogenética da família <i>Flaviviridae</i> : <i>Pestivirus</i> (A, B, H,) e <i>Hepacivirus</i> (HepBovV), <i>Pestivirus</i> C (peste suína clássica) e os <i>Flavivirus</i> (Dengue vírus tipo 2 e Zika vírus) e a genotipagem dos vírus isolados das amostras de campo.	100
Figura 21 -	Árvore filogenética da família <i>Flaviviridae</i> <i>Pestivirus</i> (BVDV-1d, BVDV2, BVDV3) e Zika vírus demonstrando a genotipagem dos vírus isolados em células MDBK.	101

**LISTA DE GRÁFICOS**

Gráfico 1 -	Frequência de <i>pools</i> de amostras positivas para <i>Pestivirus</i> na RT-qPCR utilizando-se os oligonucleotídeos recomendados pela OMSA.	89
Gráfico 2 -	Frequência de animais positivos para BVDV individualizados na RT-qPCR/OMSA.	89
Gráfico 3 -	Resultado do teste de RT-qPCR para os animais provenientes de <i>pools</i> desmembrados com oligonucleotídeos recomendados pela OMSA.	90
Gráfico 4 -	Resultados dos testes de RT-qPCR para os animais provenientes de <i>pools</i> desmembrados com oligonucleotídeos descritos por Bhudevi; Weinstock (2001).	91
Gráfico 5 -	Resultados dos testes de RT-qPCR para os animais provenientes de <i>pools</i> desmembrados com o Kit comercial Virotype® BVDV RT-PCR (Indical Bioscience).	91

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Membros do gênero <i>Pestivirus</i>	28
Quadro 2 -	Descrição dos <i>primers</i> da região 5'UTR que amplificam 290 pares de bases (Pb) por meio da RT-PCR convencional selecionados para o diagnóstico da BVD	53
Quadro 3 -	Descrição dos insumos utilizados na RT-PCR de BVDV	53
Quadro 4 -	Ciclo de amplificação da RT-PCR convencional para BVDV	54
Quadro 5 -	Oligonucleotídeos e genes utilizados na padronização RT-qPCR para detecção do BVDV, diferencial entre BVDV-1/BVDV-2 e BovHepV	55
Quadro 6 -	Quantidade de reagentes e oligonucleotídeos para o preparo do Master Mix para RT-qPCR para o diagnóstico da BVD	56
Quadro 7 -	Ciclo de amplificação RT-qPCR para o diagnóstico da BVD com os oligonucleotídeos recomendados pela OMSA utilizando-se o Kit de amplificação GoTaq <sup>®</sup> Probe 1-Step RT-qPCR System (Promega <sup>®</sup> )	57
Quadro 8 -	Quantidade de reagentes e <i>Primers</i> para o preparo do Mix para RT-qPCR para o diagnóstico diferencial da BVD	58
Quadro 9 -	Ciclo de amplificação RT-qPCR para oligonucleotídeos para RT-qPCR multiplex que diferenciam BVDV-1 e BVDV-2, descritos por Bhudevi; Weinstock (2001), utilizando-se o Kit de amplificação GoTaq <sup>®</sup> Probe 1-Step RT-qPCR System (Promega <sup>®</sup> )	58
Quadro 10 -	- Preparo do Master Mix Kit comercial Virotype <sup>®</sup> BVDV RT-PCR (Indical Bioscience) para cada amostra	59
Quadro 11 -	Ciclo de amplificação RT-PCR para Virotype <sup>®</sup> BVDV RT-qPCR	60
Quadro 12 -	Ciclo de amplificação RT-PCR para o BovHepV	61
Quadro 13 -	Quantidade de reagentes para o preparo do Mix de RT-qPCR para o diagnóstico de <i>Hepacivirus</i> bovino com <i>primers</i> 500nM e probe 100nM	62
Quadro 14 -	Quantidade de reagentes para o preparo do Mix de RT-qPCR para o diagnóstico de <i>Hepacivirus</i> bovino com <i>primers</i> 500nM e probe 150nM	62
Quadro 15 -	Quantidade de reagentes para o preparo do Mix de RT-qPCR para o diagnóstico de <i>Hepacivirus</i> bovino com <i>primers</i> 500nM e probe 200nM	63

Quadro 16 -	Quantidade de reagentes para o preparo do Mix de RT-qPCR para o diagnóstico de <i>Hepacivirus</i> bovino com <i>primers</i> 500nM e probe 300nM	63
Quadro 17 -	Cálculo do título viral BVDV 2	67
Quadro 18 -	Resultados dos valores de absorvância ELISA BVDV-Ag em amostras de fetos abortados e de isolados na 3ª. passagem em célula MDBK	94
Quadro 19 -	Resultados das análises da RT-qPCR de BVDV utilizando-se o Kit comercial Virotype® BVDV RT-PCR (Indical Bioscience)	96

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool.</i>
BovHepV	<i>Hepacivirus</i> bovino.
BVD	Diarreia viral bovina.
BVDV	Vírus da diarreia viral bovina.
CN	Controle negativo.
COFI	macerado de coração e fígado.
CP	Citopatogênico.
Ct	<i>Cycle threshold.</i>
D.O.	Densidade óptica.
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético.
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i> – ensaio imunoenzimático.
FAO	<i>Food Agriculture Organization of the United Nations.</i>
g	Grama.
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.
ID.	Identificação.
IgG	Imunoglobulina G.
IgM	Imunoglobulina M.
LT	Líquido tóraco-abdominal.
LVB/IB	Laboratório de Virose de Bovídeos/Instituto Biológico.
M	Molar.
µg	Micrograma.
µL	Micro litro.
µm	Micrometro.
mL	Mililitro.
mM	Milimolar.
µL	Micro litros.
µM	Micromolar.
n.	Número.
nm	Nanomol.
NCP	Não citopatogênico.
NFW	<i>Nuclease free water</i>



ORF	<i>Open reading frame.</i>
pb	Pares de bases.
PBS	Solução tamponada com fosfatos.
PC	<i>Positive control.</i>
PCR	Reação em cadeia pela polimerase.
pH	Potencial hidrogeniônico.
PI	Persistentemente infectado.
pmol	Picomol.
<i>Pool</i>	Várias amostras.
q. s. p.	Quantidade suficiente para.
RNA	Acido ribonucleico.
RT-PCR	Transcrição reversa seguida da PCR.
RT-qPCR	Transcrição reversa seguida da PCR em tempo real quantitativa.
SBV	Sociedade Brasileira de Virologia.
SFB	Soro fetal bovino.
SNC	Sistema nervoso central.
TCID	<i>Tissue culture infectious dosis.</i>
TE	Tampão Tris-EDTA.
UI	Unidade internacional.
UTR	<i>Untranslated region.</i>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Diluição seriada na base 10 do vírus padrão BVDV-1 NADL de título de $10^{5,6}$ TCID <sub>50</sub> /mL	68
Tabela 2 -	Diluição seriada na base 10 do vírus padrão BVDV-2 NADL de título de $10^{4,8}$ TCID <sub>50</sub> /mL	68
Tabela 3 -	Valores utilizados para a avaliação do grau de concordância entre as variantes utilizando-se o índice <i>Kappa</i> por meio do programa IBM SPSS <i>Statistics</i>	71
Tabela 4 -	Resultados valores de Ct, em triplicatas, para as diluições virais na base 10 do vírus padrão BVDV-1 NADL em triplicatas utilizando-se o conjunto com Oligonucleotídeos recomendados pela OMSA, sob o filtro de leitura FAM (465-510)	77
Tabela 5 -	Resultados valores de Ct para as diluições virais na base 10 do vírus padrão BVDV-2 em triplicatas, utilizando-se o conjunto com Oligonucleotídeos recomendados pela OMSA sob o filtro de leitura FAM (465-510)	79
Tabela 6 -	Resultados valores de Ct para as diluições virais na base 10 do vírus padrão BVDV-1 NADL de título $10^{5,6}$ TCID <sub>50</sub> /mL em triplicatas utilizando-se o conjunto com oligonucleotídeos descritos por Bhudevi; Weinstock (2001) sob o filtro de leitura FAM (465-510).	81
Tabela 7 -	Resultados valores de Ct para as diluições virais na base 10 do vírus padrão BVDV-2 em triplicatas utilizando-se o conjunto com Oligonucleotídeos descritos por BHUDEVI; WEINSTOCK (2001) sob o filtro de leitura VIC (533-580).	83
Tabela 8 -	Resultados de valores de Ct para as diluições virais na base 10 do vírus padrão BVDV-1 NADL em triplicatas para BVDV com Kit Comercial Virotype® BVDV RT-PCR, sob o filtro de leitura FAM (465-510)	85
Tabela 9 -	Resultados de valor de Ct para as diluições em base 10 para o vírus BVDV-2 de título de $10^{4,8}$ TCID <sub>50</sub> /mL nas triplicatas para BVDV-2 com Kit Comercial Virotype® BVDV RT-PCR, sob o filtro de leitura FAM (465-510)	87
Tabela 10 -	Análise de concordância <i>Kappa</i> entre os testes de RT-qPCR/OMSA, descritos por Hoffman et al. (2006) e o Kit comercial Virotype® BVDV RT-PCR (Indical Bioscience), das 571 amostras de RNA, provenientes de sangue total bovino LVB/IB, o valor da medida de concordância <i>Kappa</i> foi de 0,500, utilizando-se IBM SPSS <i>Statistics</i> , portanto o índice de considerado foi considerado moderado.	102
Tabela 11 -	Análise de concordância <i>Kappa</i> entre os testes diagnósticos ELISA (BVDV Ag - IDEXX laboratories®) e o Kit comercial Virotype® BVDV RT-PCR (Indical Bioscience) em amostras de suspensão de órgãos fetais.	103
Tabela 12 -	Espécies virais identificadas pelo sequenciamento parcial de Sanger, a	104

partir de amostras de campo para formação de banco de amostras positivas (quantidade de materiais, origem das amostras e espécie viral).

Tabela 13 -	Espécies virais isoladas em cultivo de célula MDBK, identificadas pelo sequenciamento parcial de Sanger (quantidade de materiais, Estado de origem das amostras e biotipo das amostras isoladas).	104
-------------	---	-----

**LISTA DE SÍMBOLO**

°C - graus Celsius.

∞ - infinito.

## SUMÁRIO

RESUMO	IX
ABSTRACT	X
LISTA DE FÍGURAS	XI
LISTA DE GRÁFICOS	XIII
LISTA DE QUADROS	XIV
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	XVI
LISTA DE TABELAS	XVIII
LISTA DE SÍMBOLOS	XX
SUMÁRIO	XXI
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	24
<b>2. OBJETIVOS</b>	27
2.1. Geral	27
2.2. Específicos	27
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b>	28
3.1. Etiologia	28
<b>3.1.1. Pestivirus</b>	29
<b>3.1.2. Hepacivirus</b>	30
3.2. Características virais dos <i>Pestivirus</i> e <i>Hepacivirus</i>	31
3.3. Replicação viral	32
3.4. Epidemiologia	33
3.5. Transmissão	38
3.6. Sintomatologia	39
3.7. Diagnóstico	40
<b>3.7.1. Isolamento viral</b>	42
<b>3.7.2. Ensaio imunoenzimático de adsorção -ELISA</b>	44
<b>3.7.3. Diagnóstico molecular</b>	45
<b>3.7.4. Sequenciamento genético</b>	46
3.8. Controle e erradicação	47
3.9. Protocolos de exportação	49
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	50
4.1. Seleção de amostras para o estudo	50
4.2. Processamento das amostras	50
<b>4.2.1. Amostras de sangue</b>	50
<b>4.2.2. Amostras para isolamento viral</b>	51
4.3. Amostras testes moleculares	51
<b>4.3.1. RT-PCR convencional</b>	52
<b>4.3.2. RT-PCR em tempo real para BVDV</b>	54
<b>4.3.3. Análise das sequências de primers utilizando-se o BLAST</b>	55
<b>4.3.4. Oligonucleotídeos preconizados pela OMSA</b>	55
<b>4.3.5. Oligonucleotídeos para diagnóstico diferencial de BVDV 1 e BVDV 2</b>	57
<b>4.3.6. Kit comercial Virotype® BVDV RT-PCR (Indical Bioscience)</b>	58
<b>4.3.7. Padronização da RT-qPCR para diagnóstico do Hepacivirus bovino</b>	60
4.4. Análise de reações cruzadas entre <i>Pestivirus</i> e <i>Hepacivirus</i>	64
4.5. ELISA-Ag direto de competição para BVDV	64
4.6. Isolamento viral	65
<b>4.6.1. Manutenção das células</b>	65
<b>4.6.2. Isolamento viral em células Madin Darby Bovine Kidney (MDBK)</b>	65

<b>4.6.3. Determinação do título viral</b>	66
<b>4.6.4. Diluições das estirpes BVDV-1 NADL e BVDV-2 para a realização da curva padrão em RT-qPCR</b>	67
4.7. Reação de imunoperoxidase para BVDV não citopatogênico	68
4.8. Sequenciamento de Sanger	69
4.9. Análise estatística	70
<b>5. RESULTADOS</b>	72
5.1. Análise de reações cruzadas entre <i>Pestivirus</i> e <i>Hepacivirus</i>	72
<b>5.1.1. Análise <i>in silico</i> dos primers</b>	72
5.2. Resultados projeto piloto	73
<b>5.2.1. RT-PCR convencional</b>	73
<b>5.2.2. ELISA-Ag BVDV - IDEXX®</b>	73
<b>5.2.3. Análises pelo método de Sanger</b>	74
5.3. RT-qPCR para BVDV	76
<b>5.3.1. Sensibilidade analítica</b>	76
5.3.1.1. RT-qPCR para BVDV recomendados pela OMSA	76
<b>5.3.1.1.1. BVDV – 1 NADL</b>	76
<b>5.3.1.1.2. BVDV – 2</b>	79
5.3.1.2. RT-qPCR diagnóstico diferencial entre BVDV 1 e 2	81
<b>5.3.2.2.1. BVDV – 1 NADL</b>	81
<b>5.3.2.2.2. BVDV – 2</b>	83
5.3.3.1. RT-qPCR para BVDV com Kit Comercial Virotype®	85
<b>5.3.3.1.1. BVDV – 1 NADL</b>	85
<b>5.3.3.1.2. BVDV – 2</b>	87
5.4. RT-qPCR para <i>Hepacivirus</i> bovino (HepBovV)	88
5.5. Resultados das amostras de campo	89
<b>5.5.1. RT-qPCR Primers recomendados pela OMSA para triagem</b>	89
5.5.1.1. Análise dos <i>pools</i> desmembrados	90
<b>5.5.1.1.1 RT-qPCR Primers recomendados pela OMSA</b>	90
<b>5.5.1.1.2. Primers e sondas multiplex para diagnóstico diferencial de BVDV-1 e BVDV-2</b>	90
<b>5.5.1.1.3. Kit Comercial Virotype® BVDV RT-PCR</b>	91
5.6. Resultados ELISA-Ag BVDV - IDEXX®	92
5.7. Isolamento em cultivo celular	92
5.8. Reação de Imunoperoxidase	92
5.9. Resultados das amostras fetais	93
<b>5.9.1. ELISA BVDV IDEXX</b>	94
<b>5.9.2. RT-qPCR Kit comercial Virotype® BVDV (Indical Bioscience)</b>	95
<b>5.9.3. Sequenciamento de Sanger e análise filogenética</b>	96
5.10. Análises filogenéticas das amostras de sangue total e de isolados	98
5.11. Análises estatísticas	101
5.12. Formação de banco de amostras positivas e vírus isolados	104
5.13. Análise econômica para <i>pool</i> de amostras	105
<b>6. DISCUSSÃO</b>	106
<b>7. CONCLUSÕES</b>	115
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA</b>	116
<b>ANEXO I - Certificado de aprovação – CETEA - Comissão de Ética na Experimentação Animal</b>	127
<b>Apêndice A - Resultado das análises comparativas entre testes moleculares, imunoenzimáticos e isolamento viral</b>	128

**Apêndice B** - Resultado da RT-qPCR, valores de Cp no *pool* desmembrado 133  
utilizando-se o conjunto de *primers* recomendados pela OMSA,  
Oligonucleotídeos descritos por BHUDEVI; WEINSTOCK (2001) e o Kit  
comercial Virotype® BVDV RT-PCR (Indical Bioscience)

## 1. INTRODUÇÃO

O vírus da diarreia viral bovina (BVDV), membro do gênero *Pestivirus* da família *Flaviviridae*, é classificado em três espécies: *Pestivirus A* (BVDV-1), *Pestivirus B* (BVDV-2) e *Pestivirus H* (atípico HoBi-like) conforme Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV, 2020; POSTEL et al., 2021) e considerado de suma importância para a bovinocultura mundial (MAYA et al., 2016; KLIMOWICZ-BODYS et al., 2022). Esse agente é um RNA vírus senso positivo de fita simples, responsável por causar a diarreia viral bovina (BVD) e caracterizado por alta taxa de mutação viral (FLORES et al., 2005; HIROSE et al., 2021), que vem contribuindo, ao longo dos anos, pelo desenvolvimento de estirpe atípica e por falhas vacinais e, conseqüentemente comprometendo estratégias de controle sanitário dessa doença (PITUCO, 2016; BASSET et al., 2021).

A identificação do HoBi-like vírus (D32/00\_HoBi), reclassificado como *Pestivirus H* (SMITH et al., 2017) é considerado uma estirpe atípica, isolada de amostras de soro fetal bovino (SFB) de fabricação nacional por Schirmmeier et al. (2004) e levantou questionamento quanto às medidas sanitárias adotadas para o controle da BVD. Tais medidas incluem a necessidade de implantar a biossegurança dos rebanhos, aprimorar as técnicas diagnósticas, monitorar os reagentes utilizados para o diagnóstico do BVDV e os insumos usados para a produção de vacinas, bem como garantir a sensibilidade e especificidade dos testes frente às diferentes estirpes *Pestivirus A*, *B* e *H* com a finalidade de permitir a rápida identificação dos animais reagentes e dos persistentemente infectados (DUBOVI, 2012; FLORES et al., 2005; FOUNTAIN et al., 2022).

O BVDV é responsável por relevantes impactos econômicos devido às perdas nas cadeias produtivas de carne e leite, por causar problemas reprodutivos nos rebanhos (SCHWEIZER; PETERHANS, 2014, PITUCO, 2016; MONSENA et al., 2022, KHODAKARAM-TAFTI; FARJANIKISH, 2017), mesmo com a atenção voltada ao controle e prevenção, novos focos de BVDV e o aparecimento de novos *Pestivirus* ainda são mundialmente relatados (AL-KIBUTI, 2021, KALAIYARASU et al., 2022).

Os *Pestivirus* detectados no Brasil, ao longo de décadas, apresentaram alta diversidade genética (MONSENA et al., 2022).

Dependendo do *status* sanitário do rebanho e do tipo de vírus envolvido, pode ocorrer forma mais grave e causar doença gastroentérica, respiratória, doença hemorrágica, infertilidade, perdas embrionárias, mumificação fetal e nascimento de bezerros fracos (DEZEN et al., 2013). Os prejuízos econômicos podem ser contabilizados a partir da entrada



do BVDV no rebanho livre; normalmente a infecção ocorre por contato direto entre animais persistentemente infectados (PI) e animais susceptíveis, resultando em queda de produtividade, presença de animais fracos e abortamentos (MAYA, 2016; HOUE, 2005).

A identificação das espécies de BVDV nos rebanhos é fundamental para adoção de medidas profiláticas específicas por meio de vacinas com estirpes de BVDVs presentes no campo. O conhecimento do vírus circulante é importante para avaliação sobre proteção, principalmente fetal, nas propriedades que aplicam a vacinação como medida de controle da doença. A detecção do atípico Hobi like vírus trouxe novos paradigmas, principalmente para o controle por meio de vacinas, se há proteção cruzada, melhorar a biossegurança das fazendas, seja na introdução de animais novos, assim como estabelecer melhor adoção do manejo sanitário dentro da propriedade (HIROSE et al., 2021; BASSET et al., 2021). O produtor se beneficiará, pois haverá redução nos custos de produção decorrentes desta patologia, e nesse sentido as ferramentas diagnósticas podem contribuir, de forma prática, na determinação do controle para a bovinocultura brasileira.

Nos países livres da febre aftosa (FA), os programas de controle e erradicação para BVD têm avançado nas últimas décadas (FLORES et al., 2005; BASSET et al., 2021; FOUNTAIN et al., 2022) com a intensificação de testagem, adoção de medidas de biossegurança e vacinação estratégica dos rebanhos.

As vacinas comercializadas mundialmente contemplam somente os genótipos dos *Pestivirus A* e *B*. Até o momento, o grau de reação cruzada das vacinas comerciais frente ao *Pestivirus H* é desconhecido, bem como a possibilidade de inclusão dessa nova estirpe na composição de vacinas contra BVD.

Em relação ao Brasil, questiona-se a necessidade de inclusão de estirpes de BVDV nativas, uma vez que as vacinas comerciais são importadas de origem americana e europeia e parecem não conferir proteção adequada quando desafiadas pelas estirpes virais presentes no campo. Portanto, é fundamental desenvolver estratégias de controle nacional por testes diagnósticos genótipos específicos, capazes de identificar as estirpes circulantes no campo e definir a inclusão de vacinas nacionais, a fim de reduzir os prejuízos decorrentes da doença nos rebanhos bovinos.

Desta forma, o desenvolvimento de testes diagnósticos específicos capazes de detectar animais PI ou em infecção transitória é fundamental para instigar a tomada de ações que promovam a biossegurança dos rebanhos, reduzindo prejuízos decorrentes da reintrodução da doença em rebanhos livres (WEINSTOCK et al., 2001).

O *Hepacivírus* bovino (BovHepV), gênero *Hepacivirus*, apresenta dados raros e é caracterizado por difícil isolamento e replicação em cultura de células (CANAL et al., 2017), assim como o vírus da Hepatite C (HCV), que causa doença infecto-contagiosa e afeta diretamente a saúde humana causando hepatite, cirrose e carcinoma hepatocelular (LU et al., 2018).

Na Alemanha, Baechlein et al. (2015) identificaram um novo *Hepacivirus* em gado utilizando sequências de *primers* desenhadas a partir da região que codifica o gene NS3\_310. A análise filogenética e de dados, quanto à patogenia gerada por esse vírus, permitiu classificá-lo como uma nova espécie no gênero *Hepacivirus*.

No Brasil, são raros os relatos em literatura quanto à presença do BovHepV e o real impacto na cadeia produtiva nacional, sendo necessário avaliar possíveis reações cruzadas entre espécies da mesma família *Flaviviridae*, incluindo o novo *Pestivirus* H (CANAL et al., 2017).

Este trabalho tem a possibilidade de auxiliar no desenvolvimento de novas plataformas diagnósticas que possam distinguir os *Pestivirus* A, *Pestivirus* B e o *Pestivirus* H e detectar o *Hepacivirus* bovino, contribuindo assim com medidas de prevenção e controle para esses agentes. O desenvolvimento de kits diagnósticos adequados à realidade epidemiológica do país além de favorecer a detecção e ocorrência desses vírus, permitirá a rápida identificação e eliminação de animais PI pelo BVDV, principal fonte de infecção em rebanhos suscetíveis, diminuindo as perdas econômicas relacionadas a esses agentes.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Geral

Avaliar as interações moleculares e antigênicas entre os gêneros *Pestivirus* e *Hepacivirus* da família *Flaviviridae* em amostras de sangue e órgãos fetais de bovinos.

### 2.2. Específicos

- Detectar *Pestivirus* e *Hepacivirus* em amostras de sangue bovino.
- Padronizar a RT-qPCR para detecção de *Hepacivirus* em amostras de sangue bovino.
- Avaliar os kits disponíveis no mercado para utilização no diagnóstico em amostras positivas para o BVDV-1, BVDV-2, BVDV-3 e *Hepacivirus* bovino.
- Analisar e comparar a sensibilidade e especificidade dos métodos comerciais de ELISA para detecção de antígeno do BVD 1, 2 e 3 com o RT-qPCR.
- Avaliar reação cruzada por RT-qPCR dos *Pestivirus* com *Hepacivirus* e caracterizar os genótipos de *Pestivirus* e *Hepacivirus*.
- Análise econômica para pool de amostras.
- Formação de banco de amostras de sangue e órgão fetais bovino e isolados em célula MDBK.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. Etiologia

Nas últimas décadas, apenas quatro espécies virais eram oficialmente reconhecidas como membros do gênero *Pestivirus* que são os Vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV1 e BVDV2), o Vírus da Peste Suína Clássica e o Vírus da Doença de Fronteira (BAUERMANN, RIDPATH, 2021).

O vírus da diarreia viral bovina (BVDV) e o *Hepacivirus* são vírus identificados como causadores de enfermidades (LU; GONG, 2017), pertencentes à família *Flaviviridae*, a qual é constituída por quatro gêneros: *Flavivirus* (53 espécies), *Pegivirus* (11 espécies), *Hepacivirus* (14 espécies) e os *Pestivirus* (11 espécies), de acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV, 2020).

Smith et al. (2017), propuseram a reclassificação para o gênero *Pestivirus* (família *Flaviviridae*) com a finalidade de inclusão de sete novas espécies, para tanto os autores mantiveram o nome do gênero, seguido por letras (A até K) Desta forma as 11 espécies foram reclassificadas como *Pestivirus A* (Vírus da diarreia viral bovina 1 – BVDV1), *Pestivirus B* (Vírus da diarreia viral bovina 2 – BVDV2), *Pestivirus C* (Vírus da peste suína clássica), *Pestivirus D* (Vírus da doença das Fronteiras - BDV), já as sete novas espécies são *Pestivirus E* (Pestivírus de antilocapra ou antílope americano), *Pestivirus F* (Pestivírus porcino Bungowannah), *Pestivirus G* (Pestivírus de girafa), *Pestivirus H* (Pestivirus tipo HoBi-like), *Pestivirus I* (Pestivírus do tipo Aydin), *Pestivirus J* (Pestivírus de rato) e *Pestivirus K* (Pestivírus suíno atípico).

No quadro 1 estão representadas as reclassificações das espécies de *Pestivirus* e seus respectivos hospedeiros, segundo SMITH et al. (2017).

Quadro 1 – Membros do gênero *Pestivirus* (Fonte adaptado de SMITH et al., 2017; AL-KUBAT, 2021)

Espécie viral	Descrição	Hospedeiros
<i>Pestivirus A</i>	Vírus da Diarreia viral bovino tipo 1	Bovinos, suínos e outros ruminantes
<i>Pestivirus B</i>	Vírus da Diarreia viral bovino tipo 2	Bovinos, suínos e outros ruminantes
<i>Pestivirus C</i>	Vírus da Peste suína clássica	Suínos
<i>Pestivirus D</i>	Virus da Doenças das fronteiras	Ovinos, suínos e outros ruminantes
<i>Pestivirus E</i>	<i>Pestivírus</i> de antilocapra ou antílope americano	Antílope
<i>Pestivirus F</i>	<i>Pestivírus</i> de porcino Bungowannah	Suínos
<i>Pestivirus G</i>	<i>Estivírus</i> de Girafa	Girafas e bovinos
<i>Pestivirus H</i>	<i>Pestivírus</i> HoBi-like	Bovinos e bubalinos
<i>Pestivirus I</i>	<i>Pestivírus</i> do tipo Aydin	Ovinos e caprinos
<i>Pestivirus J</i>	<i>Pestivírus</i> de rato	Ratos
<i>Pestivirus K</i>	<i>Pestivírus</i> suíno atípico	Suínos

Os vírus membros da família *Flaviviridae* possuem nucleocapsídeo icosaédrico (45-60 nm de diâmetro) revestidos externamente por envelope lipoproteico derivado das membranas do hospedeiro (Fig. 1).

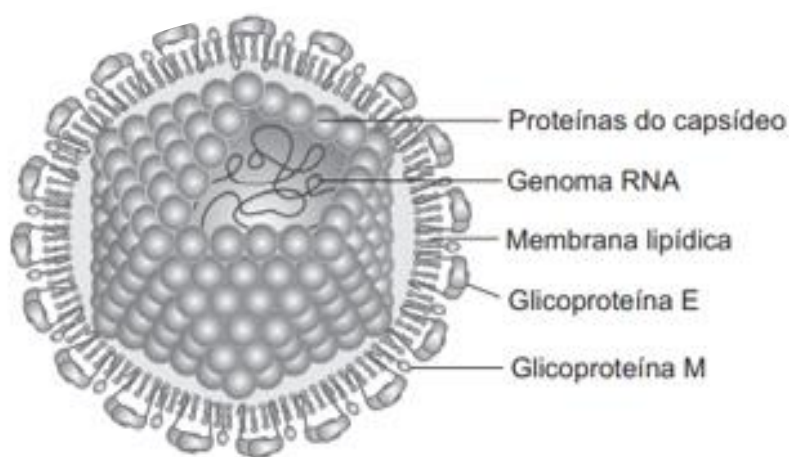


Figura 1 – Partícula viral de membros da família *Flaviviridae*: (representação esquemática).  
 (Fonte: adaptado de RIDPATH; FLORES, 2007).

### 3.1.1. *Pestivirus*

O genoma do gênero *Pestivirus* consiste em uma molécula de RNA cadeia simples, com aproximadamente 12,3 Kb (BAUERMANN; FLORES; RIDPATH, 2012). O BVDV possui RNA linear de sentido polaridade positiva (9,5 a 12,5 Kb), traduzido em poliproteína, posteriormente, clivado em proteínas individuais por enzimas virais e celulares. As ORF's, sequências gênicas codificantes de sentido positivo, podem traduzir o genoma em proteínas por meio dos ribossomos (PICONE; FLORES, 2007). O genoma organizado de forma semelhante em todos os membros da família *Flaviviridae*, com as proteínas estruturais não traduzidas (UTR) *untranslated region*, codificadas no primeiro terço (extremidade 5') e as não estruturais nos terços finais (extremidade 3') (RIDPATH; FLORES, 2007), com duas regiões não traduzidas (UTR) em suas extremidades (5' - 3') e uma (ORF) *open reading frame* – fase de leitura aberta codificam uma poliproteína de 4000 aminoácidos e formam 11 proteínas virais (PITUCO, 2016). Duas proteínas são exclusivas do gênero *Pestivirus*, proteína não estrutural N<sup>pro</sup> codificada pela ORF, com função de autoclivagem após a sua síntese, a E<sup>ms</sup> (ou E0) associada ao envelope viral que pode ser secretada pelas células infectadas com atividade de ribonuclease (RIDPATH; FLORES, 2007).

Os genes possuem a sequência N<sup>pro</sup>-C-E<sup>ms</sup>-E1-E2-p7-NS2/NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B, sendo as quatro proteínas estruturais E<sup>ms</sup> (ribonuclease solúvel), E1 e E2 (glicoproteínas de envelope – dominante, induzem a formação de anticorpos neutralizantes) e a C (glicoproteína de envelope), as demais, são consideradas proteínas não estruturais N<sup>pro</sup>-p7-NS2/NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B, representadas na figura 3 (PITUCO, 2016).

Na Figura 2, a primeira parte da imagem apresenta a codificação do genoma em uma poliproteína, já na parte intermediária da imagem são observadas as representações das proteínas estruturais e não estruturais, as quais são desmembradas em quatro proteínas estruturais (C, Erns, E1 e E2) e em oito proteínas não estruturais (Npro, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5b), sendo que as proteínas não estruturais possuem função de proteases que clivam a poliproteína viral (AL-KUBATI et al., 2021).

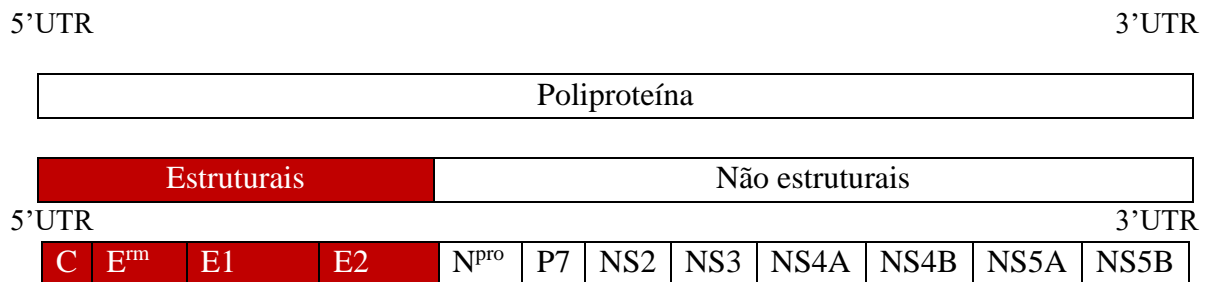


Figura 2 - Estrutura e organização do genoma dos *Pestivirus* (Fonte: adaptado de ICTV, 2021).

### 3.1.2. *Hepacivirus*

O gênero *Hepacivirus* pertence à Família *Flaviviridae* (DENG, 2018), as partículas virais são envelopadas e apresentam de 9,0Kb a 13,0Kb (SIMMONDS et al., 2017). Os *Hepacivirus* foram reclassificados, recentemente, em *Hepacivirus* A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K L, M e N (ICTV, 2020).

O genoma dos *Hepacivirus* é formado por uma molécula de RNA cadeia simples e senso positivo, o genoma de seu principal representante, o vírus da Hepatite C (HCV) é de 9,6Kb; este possui formato esférico com cerca de 50nm de diâmetro, e possui envelope lipídico, e núcleo esférico com 30nm de diâmetro (ICTV, 2020).

A compreensão sobre a diversidade genética e evolução do *Hepacivirus* resultou no avanço do conhecimento, já que inicialmente reconhecia-se apenas o HCV como causador da doença em humanos, e estudos posteriores têm demonstrado que esse gênero pode infectar uma diversidade de espécies animais, incluindo morcegos, primatas e roedores. Por outro lado, novas variantes de *Hepacivirus* acometem animais domésticos, como cães, bovinos e equinos (PYBUS; THÉZÉ, 2016), o qual estabelece infecções persistentes e localizadas no

fígado (SIMMONDS et al., 2017). Portanto, identificar novas variantes de *Hepacivirus* em animais é necessário para estabelecer possíveis correlações quanto à escala evolutiva dessa espécie viral e potencial risco como reservatório para as hepatites humanas (SCHEEL; SIMMONDS; KAPOOR, 2014). Segundo Lu et al. (2018), na China, identificaram oito amostras de campo e as caracterizaram geneticamente para BovHepV no gado leiteiro e constataram divergências dos *Hepacivirus* chinês e os encontrados em outros países, e afirmaram a importância de não se subestimar o potencial risco zoonótico do *Hepacivirus* bovino na saúde pública, antes que o *Hepacivirus* bovino seja estudado, uma vez que o gado bovino é importante fonte de proteínas (carne e leite) à população. As amostras analisadas apresentaram homologia na sequência de nucleotídeos com identidade de 86,9 a 95,3% para BovHepV. Foram identificaram 43 mutações de nucleotídeos, o que permitiu concluir que o BovHepV apresenta alta diversidade genética.

A organização do genoma do *Hepacivirus* é constituída por proteínas estruturais (C, E1 e E2) e proteínas não estruturais (NS2/NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B) (Fig. 3) (PITUCO, 2016; FLORES, 2007).

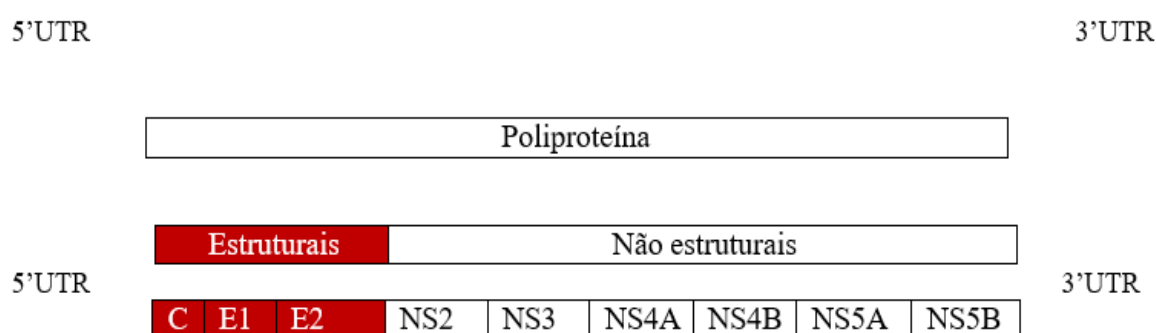


Figura 3 - Estrutura e organização do genoma do *Hepacivirus* (Fonte: adaptado de ICTV, 2021).

### 3.2. Características virais dos *Pestivirus* e *Hepacivirus*

A replicação viral em cultura de células de ambos os genótipos de BVDV pode ocorrer nas formas citopatogênicas (CP) e não citopatogênicas (NCP), caracterizadas por alterações morfológicas evidentes na estrutura das células infectadas *in vitro* visualizadas no microscópio, ou por meio de testes imunoenzimáticos para visualizar o NCP (OMSA, 2018; ICTV, 2020).

Os vírus citopatogênicos originam-se através das mutações, deleções e rearranjos genéticos dos biotipos não citopatogênicos (NCP), conforme descrito por Ridpath; Flores (2007), sendo essas estirpes responsáveis pela maior parte das infecções e relacionadas diretamente aos animais persistentemente infectados (PI). Os isolados CP não produzem

infecções persistentes, mas infecções mistas concomitantemente por vírus CP e NCP podem causar a doença das mucosas doença geralmente fatal (PITUCO, 2016). PETERHANS et al. (2010) relataram a plasticidade genética do BVDV no desenvolvimento de animais PI com elevada carga viral, em torno de  $10^{14}$  a  $10^{17}$  cópias virais, ao mesmo tempo que discutiram sobre o potencial do biotipo CP em causar a doença das mucosas, ao entrar em contato com um animal PI, uma vez, que o biotipo CP é oriundo do biótipo NCP e, portanto, o desenvolvimento da doença das mucosas está mais relacionado à tolerância imunológica.

Os biotipos NCP possuem tropismo por órgãos linfóides, aparelho respiratório e células leucocitárias, já o biotipo CP é encontrado no aparelho digestório (DIAS; SAMARA, 2010).

Houe (1995) relata que o BVDV se apresenta estável em temperatura ambiente e pode suportar temperatura de até 35°C por 3 horas, 20°C por até uma semana e três semanas quando armazenado em temperaturas de 4 a 10°C e pode ainda suportar as variações extremas de pH entre três (ácido) a nove (básico).

Os *Hepacivirus* diferem dos gêneros *Flavivirus* e *Pestivirus* devido à capacidade limitada de replicação em cultivo celular (ICTV, 2020).

Canal et al. (2017), no Brasil, utilizaram células MDBK (Madin Darby Bovine Kidney), BHK 21 (Baby Hamster kidney 21), RK-13 (Rabbit Kidney 13) e NCTC (Mouse Fibroblast L929) e células primárias de testículo bovino na tentativa de isolar o *Hepacivirus* de amostras positivas na RT-PCR, porém, todos os isolamentos apresentaram-se negativos.

Baechlein et al. (2019), ao avaliarem os resultados obtidos na bioquímica sérica de animais infectados por HepBovV, não evidenciaram alterações significativas em relação às amostras oriundas de animais saudáveis, e não foi possível relacionar a infecção viral às lesões causadas em fígado.

O melhor entendimento da hepatite viral bovina envolve o desenvolvimento de estudos mais robustos envolvendo o histórico evolutivo do HepBovV, principalmente, no que diz respeito a sua epidemiologia e patogenia.

### 3.3. Replicação viral

A replicação viral do BVDV ocorre após a penetração da partícula viral no citoplasma da célula do hospedeiro por endocitose pela interação entre as glicoproteínas de envelope viral (Erns e E2) e receptores da membrana (ICTV, 2020). O mecanismo que o BVDV utiliza para infectar a célula hospedeira é facilitada pela interação da glicoproteína viral E2 com o receptor transmembrana CD40, propiciando sua ligação específica e início da replicação viral



(Szilla et al., 2019), após a interação vírus/célula o capsídeo dissocia-se e ocorre a liberação do material genético no citoplasma da célula hospedeira. O RNA genômico de polaridade positiva é traduzido em poliproteínas, que ao passarem por clivagem originam as proteínas individuais (estruturais e não estruturais). A clivagem e replicação do genoma são mediadas, por meio das proteínas não estruturais que estão diretamente relacionadas à síntese do RNA molde de polaridade negativa, utilizadas para a produção de novas partículas de RNA de sentido e polaridade positiva. Neste momento, as novas moléculas de RNA recebem a cápside e na região perinuclear do citoplasma, associado às membranas do complexo de Golgi e do retículo endoplasmático liso; e as partículas recém-formadas apresentam-se sob a forma de vesículas e são liberadas por meio da exocitose (RIDPATH; FLORES, 2007; PITUCO, 2016).

### 3.4. Epidemiologia

Os *Pestivirus* possuem distribuição mundial (FLORES et al., 2005) e acometem tanto animais domésticos quanto selvagens indicando alta capacidade de adaptação do vírus nas diferentes espécies (PETERHANS; SCHWEIZER, 2010), e podem causar infecções clínicas ou subclínicas com a presença de doença gastroentérica, hemorrágica ou debilitante (SIMMONDS et al., 2017). A heterogeneidade é uma característica marcante do gênero *Pestivirus*, por apresentar diversas propriedades genéticas, variado espectro de hospedeiros diferentes sinais clínicos da doença e diversificada virulência das estirpes (PETERHANS; SCHWEIZER, 2010).

Destacam-se como principais patógenos na bovinocultura o *Pestivirus A*, *Pestivirus B* e *Pestivirus H* representados por vários subgenótipos de BVDV-1 e BVDV-2. Nos Continentes Americano e Europeu já foram identificadas as espécies BVDV 1a, 1b, 1c, 1d, 1e, 1f, 1g, 1h, 1i, 1j, 1k e 1l; e BVDV 2a e 2b (BAUERMANN; RIDPATH, 2021).

Dias et al. (2010) verificaram a presença do BVDV em animais PI com idades de seis a 12 meses, por meio de análises de amostras pareadas de soro sanguíneo por VN para a pesquisa de anticorpos anti-BVDV-1 e anti-BVDV-2, provenientes de 26 rebanhos não vacinados, sendo seis rebanhos do Estado de Minas Gerais e 20 do Estado de São Paulo. Após a VN foram selecionadas 277 amostras que resultaram negativas para ambas espécies virais, sendo destinadas à análise por RT-PCR utilizando-se o conjunto de *primers* 103 e 372, sendo identificados dois animais PIs de um mesmo rebanho do Estado de Minas Gerais com formação de bandas no gel de agarose. A detecção de animais PI nos rebanhos deve ser realizada por inquérito sorológico associado aos métodos de detecção de antígenos, com a finalidade de garantir o controle da BVD.

A avaliação de sequências parciais e completas fornecem maiores informações quando comparada à sorologia, pois permite determinação dos subgenótipos de BVDV com maior agilidade (YEŞILBAĞ; ALPAY; BECHER, 2017).

Yeşilbağ; Alpay; Becher (2017) relacionaram a variabilidade e distribuição mundial do BVDV e seus subgenótipos às sequências e número de isolados, e indicaram o BVDV-1 como o mais frequente (88,2%), enquanto apenas 11,8% das descrições foram do BVDV-2.

O *Pestivirus* H (Hobi-like) foi identificado pela primeira vez em amostras comerciais de soro fetal bovino (SFB) e foi realizado o primeiro relato de isolamento de HoBi- “like” vírus (D32/00\_Hobi) seguido de inoculação experimental, por via intranasal, em dois suínos e dois bovinos livres de doenças. Os suínos soroconverteram e não apresentaram sintomas clínicos ou leucopenia, no entanto, os bezerros infectados apresentaram viremia ao quinto dia e foi evidenciado eliminação viral do terceiro ao sexto dia com presença de leucopenia e hipertermia leves. As análises de sequências, anticorpos e virusneutralização cruzadas evidenciaram diferenças marcantes entre o D32/00\_HoBi e os demais *Pestivirus* representando limitações ao seu diagnóstico, essas características levaram a necessidade de uma nova classificação quanto a espécie dentro do gênero *Pestivirus* da família *Flaviviridae* (SCHIRRMIEIER et al., 2004).

As análises filogenéticas permitem o acompanhamento do histórico e epidemiologia de determinados agentes patogênicos (MÓSENA, 2017) e consideram-se importantes para identificar variantes, estabelecer o perfil genético, relacioná-lo de acordo com a provável origem e avaliar a evolução viral. Conhecer o genoma do vírus é extremamente relevante para o controle da doença, seja para classificar e entender o agente e o seu comportamento epidemiológico, ou para criar e aprimorar exames de diagnóstico e vacinas (PITUCO, 2016).

No Brasil, desde a década de 60, os dados relatados sobre a frequência da BVD eram por meio de inquéritos soroepidemiológicos, diagnóstico clínico e isolamento viral para verificar a circulação do vírus no rebanho bovino. Na América do Norte e em alguns países europeus, a prevalência de anticorpos anti-BVDV atingia 70 a 80% dos animais (FLORES et al., 2005).

Weber et al. (2014), na região Sul do Brasil, realizaram a RT-PCR de 9.078 soros de animais da espécie bovina de 6 a 12 meses de idade, inicialmente sob a forma de 277 *pools* contendo 44 amostras que posteriormente individualizados, identificaram 33 amostras (0,36%) positivas. Na análise do sequenciamento utilizando a região 5'UTR e N<sup>pro</sup> demonstraram a presença de 15 animais positivos para BVDV-1a, três para BVDV-1b, um animal para BVDV-1d e 14 para BVDV-2b. Na análise das árvores filogenéticas, BVDV-1

agruparam-se no subtipo 1a (15 animais), 1b (3animais) e 1d (1 animal) e para o BVDV-2 todos agruparam-se como do subtipo 2b.

A caracterização filogenética de 89 isolados Brasileiros de seis Estados (PB, PR, MS, MT, RS, SC) obtidas entre os anos de 1995 a 2014, permitiu identificar a presença de 53,9% BVDV-1, 33,7% BVDV-2 e 12,3% Hobi-like; os subgenótipos mais frequentemente identificados foram BVDV-1a (35,9%), BVDV-1b (10,1%), BVDV-1d (6,7%), BVDV-1e (1,1%), BVDV-2b (31,4%), BVDV-2c (2,2%) e BVDV-1e (1,1%), sendo o BVDV-1e e 2c a primeira descrição Brasileira (SILVEIRA, 2015).

Marques et al. (2016) identificaram o BVDV-3 no Nordeste Brasileiro, por meio do sequenciamento genético utilizando a região conservada 5'UTR em uma fêmea de três meses de idade, submetida a eutanásia; a análise imunohistoquímica em extremidade de orelha se apresentou antigênicamente positiva. A RT-PCR de amostra de soro sanguíneo apresentou-se positiva ao BVDV e no isolamento viral em células MDBK foi observada a ausência de efeito citopático. Diante desse resultado foi analisado o soro sanguíneo de 23 animais para BVDV utilizando-se o ELISA indireto, ao qual possibilitou a identificação de 16 animais sororeagentes.

O Brasil e a Argentina foram os únicos países Sulamericanos a relatarem a presença do *Pestivirus* H (BAUERMANN; RIDPATH, 2021). Mosena (2017) identificou, no Brasil, duas estirpes da nova espécie dos vírus “HoBi”-like e contribuiu com a primeira descrição do BVDV-1i, esse descrito anteriormente, apenas no Reino Unido e Uruguai.

Zucoloto et al. (2019) relataram no Estado do Paraná, a identificação de 10 bezerras PI para o genótipo BVDV-1d, esses animais pertenciam a um rebanho de gado Holandês de alta produção leiteira, em que a incorporação ocasional de novas fêmeas ao rebanho era recorrente e objetivava a manutenção da produção leiteira.

Na região Nordeste do Brasil, Silveira et al. (2018) analisaram 19.293 soros para a estirpe Hobi-like, sendo 16.621 de bovinos e 2.672 de pequenos ruminantes, inicialmente, estas amostras foram analisadas sob a forma de *pools*, sendo agrupadas 45 amostras por *pool*, totalizando 429 *pools*; posteriormente, as amostras dos *pools* positivos foram analisadas individualmente e possibilitou identificar 17 bovinos positivos, sendo que o sequenciamento utilizando os genes 5'UTR, N<sup>Pro</sup> e E2 permitiu na análise filogenética concluir que todas as amostras positivas foram identificadas como sendo Hobi-like, com identidades variando de 84 a 100% para o gene 5'UTR, 79 a 99% para o gene N<sup>Pro</sup> e de 89 a 98% para o E2.

Monteiro et al. (2018) utilizaram *primers* da região 5'UTR ao analisarem 73 amostras de lotes SFB, e identificaram 39 lotes de soro fetal bovino positivos para BVDV. No sequenciamento e análise filogenética, utilizando-se a mesma região não traduzida, constatou-se lotes positivos para mais de um *Pestivirus*, no entanto, o BVDV-1, em maior ocorrência de identidades compatíveis com o BVDV(1a), (1b) e (1d); seis lotes para BVDV2, e o *Pestivirus* H foi identificado em quatro amostras. Diante desses resultados os autores destacaram a importância na adoção de medidas para controle e monitoramento para esse bioensumo, com finalidade de evitar a disseminação dos *Pestivirus* para áreas livres por meio da contaminação de vacinas.

Embora a contaminação por BVDV em insumos utilizados na fabricação de vacinas para uso em humanos já tenha sido relatada, Laassri et al. (2018) analisaram por meio da PCR, RT-qPCR, isolamento, imunofluorescência e sequenciamento, dezessete lotes de SFB, quatro lotes de soro de equino, sete lotes de tripsina sendo dois lotes bovinas e cinco suínas, além de lotes de vacina trivalente (MMR) e um lote de vacina contra sarampo). Os lotes de SFB e um lote de tripsina bovina apresentaram-se positivos à PCR para BVDV. Os lotes de vacinas para uso em humanos e as demais amostras foram negativas ao *Pestivirus*. O sequenciamento completo do agente viral presente nas amostras de SFB foi identificado como BVDV-1. Nas demais amostras não foi detectado vírus infeccioso.

Na América do Norte, a frequência do *Pestivirus* B apresenta-se maior que a do *Pestivirus* A (OMSA, 2018). Em estudos Brasileiros, os sequenciamentos parciais e completos têm demonstrado uma diversidade de estirpes de BVDV e em frequências distintas, quando comparadas com as estirpes encontradas na Europa ou América do Norte (FLORES et al., 2018).

Un et al. (2022) analisaram 2.701 amostras de sangue, sob a forma de *pool* de oito amostras, totalizando 342 *pools*, provenientes de 62 propriedades da Turquia, essas amostras foram analisadas pela RT-qPCR utilizando-se o Kit RT-PCR BVDV RNA Test (IDEXX, Montpellier, France) capaz de detectar os diferentes gêneros de *Pestivirus* (BVDV 1, 2, 3 e o vírus da doença das fronteiras), sem distingui-los Das amostras analisadas foi possível detectar 11,74% (11/62) propriedades como positivas para *Pestivirus*.

Maya et al. (2020) analisaram 2.546 amostras de soros, sangue e tecidos de animais suspeitos de diarreia viral bovina, no período de 2015 a 2017, por meio da técnica de RT-qPCR e os *primers* (BVD190F, V326R) e probe (TQPest) capazes de identificar BVDV-1, BVDV-2 e Hobi-like vírus. O sequenciamento demonstrou a presença do BVDV-1a, BVDV-

1i e BVDV-2b, sendo o genótipo *Pestivirus A*, o mais frequente no Uruguai desde 1990. A presença de mutações pontuais no genoma conferiu características genéticas de linhagens regionais ao BVDV-1a, que possivelmente resultaram em falhas de imunização cruzada e vírusneutralização.

Giammarioli et al. (2015) analisaram o padrão genético de 173 sequências de BVDV-1 de isolados de animais em fase aguda de infecção e animais PI, período 1997 a 2014, provenientes de 14 regiões da Itália, e correlacionaram com o risco de surgimento de novos subtipos. O estudo utilizou a região 5'UTR (288pb) e comparou a região não codificada N<sup>Pro</sup> (428pb); pela análise filogenética, os autores identificaram vários subgenótipos do BVDV-1, sendo BVDV-1a (27), BVDV-1b (81), BVDV-1c (2), BVDV-1d (4), BVDV-1e (27), BVDV-1f (7), BVDV-1g (5), BVDV-1h (10), BVDV-1K (5) e BVDV-1l (1), as árvores filogenéticas resultantes demonstraram que os vírus se agrupam nas mesmas ramificações filogenéticas com valores de *Bootstrap* semelhantes.

Decaro et al. (2011) utilizando-se o modelo Neighbor Joining (MEGA 4.1) para construção de árvore filogenética de genoma completo, demonstraram proximidade de identidade entre a estirpe italiana de *Pestivirus H* (Italy-1/10-01) e a estirpe (Th/04\_KhonKaen) ao qual formou-se um único cluster, distantes dos isolados de referência BVDV e do vírus da peste suína clássica (CSFV). Ao analisarem as árvores filogenéticas baseados nas sequências E2, 5'UTR e N<sup>Pro</sup>, observaram que a estirpe italiana apresentou maior semelhança com a estirpe Brasileira do que quando comparados ao isolado Tailandês, possivelmente, essas semelhanças entre os vírus italiano e Brasileiro estejam relacionadas ao uso de vacinas preparadas com soro fetal bovino contaminado.

Oliveira (2013) verificou que a frequência de lotes de SFB positivos para BVDV apresentou-se elevada por métodos diretos de diagnósticos, sendo a maior apresentada na RT-qPCR e apontaram divergência de resultados ao compará-los ao ELISA direto e sugeriu a possibilidade de diferenças antigênicas entre os *Pestivirus* Brasileiros e os dos outros países. Apontou ainda a necessidade de desenvolvimento de kits de ELISA direto utilizando-se os vírus regionais circulantes no Brasil.

As análises filogenéticas realizadas a partir dos *Hepacivirus* identificados em diversos hospedeiros revelaram que o *Hepacivirus* equino (EqHV, NPHV identificado em cavalos) e *Hepacivirus* canino (NPHV identificado em cães) estão estritamente relacionados ao HCV. A análise genética do NPHV (não-primata *Hepacivirus*) revelou que sua estrutura é semelhante a do HCV e que sua ORF (cadeia aberta de leitura) codifica 2.940-2.950 aminoácidos poliproteínas que geram o núcleo das proteínas estruturais E1 e E2, bem como as proteínas

não-estruturais p7, NS2, Ns3, Ns4A, NS4B, NS5A e NS5B. Consequentemente, existe agora interesse significativo em EqHV devido sua origem e reservatório natural do HCV, pois não está esclarecido e, somente, o modelo experimental chimpanzé está disponível para pesquisas e desenvolvimento de vacinas e drogas para HCV (KIM et al., 2017).

Canal et al. (2017) apontaram pela primeira vez a presença do *Hepacivirus* bovino (BovHepV) na região Sul do Brasil enquanto verificavam a presença de BVDV, e essa descoberta despertou preocupação quanto à disseminação mundial desse novo vírus, uma vez que pesquisas sugerem a existência de outras espécies animais infectadas com *Hepacivirus*.

Baechlein et al. (2019) avaliaram amostras de 282 bovinos, 117 equinos, 100 suínos e 200 humanos para a presença de anticorpos anti-NS3 e o RNA viral da hepatite viral bovina (BovHepV). Em 19,9% das amostras de soro bovino diagnosticou-se anticorpos para BovHepV, tendo sido detectado RNA em 8,2% (23/282) das amostras de sangue. Esse estudo, realizado ao longo de um ano, permitiu a distinção de fases da infecção aguda/crônica e possibilitou avaliar a presença de animais PI, sem a presença de anticorpos. As amostras equinas e humanas foram negativas ao BovHepV. Esses resultados permitiram verificar a especificidade de hospedeiros ao *Hepacivirus* bovino.

Deng et al. (2018) analisaram 131 amostras de soro de bovinos clinicamente saudáveis, provenientes de três regiões da China, sendo identificados 3,82% (5/131) de positividade para *Hepacivirus* bovino por meio da RT-PCR, baseado na região conservada NS3 do vírus que amplifica 310pb sendo utilizada a mesma região para análise filogenética.

### 3.5. Transmissão

O BVDV pode apresentar duas formas de transmissão, horizontal e vertical, sendo a primeira caracterizada por contato direto com secreções, excreções, enquanto a segunda está relacionada, principalmente, pela capacidade do vírus atravessar a barreira placentária, atingir o feto, e consequentemente causar abortamentos, reduzir taxa de natalidade, mal formações e nascimento de bezerros imunotolerantes PI (PETERHANS; SCHWEIZER, 2010), sendo a infecção pré-natal fator determinante para a geração destes animais (SANTOS et al., 2011).

A presença de animais PI no rebanho é considerada a principal fonte de infecção para animais suscetíveis, uma vez que podem excretar grandes quantidades de vírus na urina, fezes, leite e sêmen (OMSA, 2018) e, dessa forma, transmitir o BVDV com maior eficiência (WALZ et al., 2010).

O animal PI é imunotolerante, ou seja, não reconhece o antígeno viral como *non-self* e faz com que o sistema imune não seja ativado para combater a infecção, e desta forma apresenta-se como animal portador assintomático. Esse fenômeno ocorre durante a fase gestacional até os 125 dias de gestação, onde seu sistema imune ainda não é competente e o feto bovino é infectado pelo biotipo NCP do BVDV. Esse animal não apresentará alterações clínicas, nem resposta imune uma vez que o organismo não reconhece o vírus deixando de produzir resposta imune, tornando-se o principal disseminador do vírus entre os animais susceptíveis (PETERHANS; SCHWEIZER, 2010). A infecção persistente é uma característica de manutenção viral no rebanho (WALZ et al., 2020).

Quadros et al. (2016), com o objetivo de avaliarem a transmissibilidade do vírus entre animais de idades entre dois e quatro meses, para tanto utilizaram cinco animais, dos quais foram inoculados experimentalmente quatro animais por via intranasal com o vírus BVDV-1a (NCP) com alto título viral ( $10^{7.2}$  TCID<sub>50</sub> mL<sup>-1</sup>) e os mantiveram em contato com um bezerro negativo para o BVDV. O isolamento viral foi confirmado nas amostras de sangue e secreção nasal dos animais infectados, porém, o animal controle permaneceu negativo durante todo experimento, o que permitiu concluir que a via de transmissão horizontal representa baixo risco aos animais susceptíveis.

### 3.6. Sintomatologia

Inicialmente, a BVD foi relacionada à doença entérica e por esse motivo, recebeu tal denominação. Entretanto, com o avanço do conhecimento sobre a doença, observou-se que o vírus da BVD acomete diferentes sistemas incluindo o respiratório, gastroentérico, reprodutivo e neurológico (BOTTON et al., 1998; SANTOS et al., 2011; PITUCO, 2016; YEŞILBAĞ; ALPAY; BECHER, 2017) e, dependendo da estirpe de BVDV envolvida, trará diferentes consequências ao hospedeiro de acordo com o *status* imunitário do animal, idade gestacional, infecção fetal, e o quadro clínico apresentado pode ser agravado em associação à outros patógenos (WALZ et al., 2010; DECARO et al., 2013).

Os animais infectados no período gestacional entre os 100 e 150 dias podem apresentar maior incidência de más formações fetais (único indicativo da presença viral), principalmente, em sistema nervoso central e nos olhos além do déficit de crescimento (FLORES, 2007).

Na maioria dos casos, a presença de animais PI é o principal fator de risco na transmissão da doença, e este deve ser rapidamente identificado para tomada de medidas de controle da disseminação da doença no rebanho (OMSA, 2018). Durante a anamnese do

rebanho, se observa que os animais PI apresentam baixo crescimento e perda de peso quando comparado com os demais animais da mesma faixa etária (DECARO et al., 2013). Os índices de animais PI em um rebanho podem variar entre 0,5 e 2% e normalmente esses animais vão a óbito nos primeiros dois anos de vida, e podem eliminar o vírus constantemente pelas secreções, sendo a principal forma de manutenção da doença no rebanho (MAYA et al., 2016).

Pelos sinais clínicos, não se observa diferenças provocadas pelas três estirpes de BVDV, embora estas sejam antigenicamente distintas (BAUERMANN; FLORES; RIDPATH, 2012).

Santos et al. (2011) analisaram cinco animais PI pela estirpe NCP do BVD-2b, em rebanho do Rio Grande do Sul e, clinicamente destacaram o subdesenvolvimento dos animais, presença de secreção nasal e ocular, além de catarata congênita em dois animais; para caracterização patológica foram observadas o aumento dos linfonodos mesentéricos, evidencição das Placas de Peyer, pododermatite e lesões no plano nasal e periocular, e microscopicamente: infiltrado mononuclear na lâmina própria do intestino delgado e rarefação linfóide com infiltrado histiocitário nos centros foliculares linfonodos e placa de Peyer). A imuno-histoquímica permitiu visualização dos antígenos nos queratinócitos, epitélio de folículos pilosos, células mononucleares da derme de orelhas e pele, no citoplasma de neurônios, nas células da micróglia, no córtex cerebral e no hipocampo.

Decaro et al. (2013) observaram associação de Hobi-like com infecção fúngica por *Trichophyton verrucosum* em um rebanho na Itália, onde os animais apresentavam problemas respiratórios e alopecia associados demonstrando que a imunossupressão causada pelo BVDV pode facilitar a contaminação por outros agentes patogênicos.

A identificação dos subtipos de BVDV presentes na criação bovina e em outros hospedeiros é importante para adequação das medidas profiláticas com o uso de vacinas que contenham a estirpe viral circulante na propriedade e adoção de medidas quanto a ocorrência de outras doenças concomitante, pois podem interferir na eficácia da vacina (WALZ et al., 2020).

### 3.7. Diagnóstico

O diagnóstico da BVD deve considerar sinais clínicos apresentados pelos animais, dados epidemiológicos, histórico da propriedade e da região, e relacioná-los aos achados histopatológicos para a confirmação de diagnóstico e a utilização de técnicas direta ou indireta (PITUCO, 2016).



Segundo OMSA (2021) as pestivirose bovina são diretamente relacionadas ao isolamento do BVDV, qualquer detecção do antígeno viral ou material genético do vírus identificado por testes diagnósticos direto em amostras de animais hospedeiros, exceto os vírus vacinais.

O sucesso no diagnóstico da BVD depende de vários fatores, desde a suspeita clínica à colheita das amostras, acondicionamento adequado e envio ao laboratório juntamente com a ficha de requisição de exames devidamente preenchida com o máximo de informações acerca do rebanho, manejo, sinais clínicos observados e suspeita clínica, além, da expertise técnica para selecionar os melhores métodos diagnósticos (PITUCO et al., 2010).

Os procedimentos realizados na fase pré-analítica são importantes para que se obtenha resultados tecnicamente válidos (PITUCO, 2016), dependendo da qualidade das amostras, o laboratório escolherá o método mais apropriado para aquela condição. No caso de amostras autolisadas, como no caso de fetos abortados, os testes moleculares são os mais adequados, embora o RNA viral também possa apresentar-se comprometido, por esse motivo recomenda-se a inclusão de controle interno para avaliar a integridade do RNA extraído. Para a detecção do BVDV pelo ensaio imunoenzimático ELISA-Ag, o envelope viral necessita estar íntegro, portanto, é necessário maior rigor nos critérios de aceitação da amostra para evitar resultados falsos negativos (BAUERMANN; FLORES; RIDPATH, 2012).

As variações existentes entre as estirpes de BVDV podem ser verificadas por diferentes métodos diagnósticos (YEŞILBAĞ; ALPAY; BECHER, 2017), e os testes recomendados por Dubovi (2012), com a finalidade de apoiar os programas sanitários para o controle e erradicação da BVD são o isolamento viral, imunofluorescência/imunohistoquímica, ELISA de captura de antígenos, PCR e testes de detecção de anticorpos como a neutralização viral (VN) e o ELISA indireto (BAUERMANN; FLORES; RIDPATH, 2012), utilizados para o diagnóstico de animais PI (KHODAKARAM-TAFTI; FARJANIKISH, 20017). Títulos altos de anticorpos nos rebanhos no teste de neutralização viral (VN) possibilitam inferir a potencial presença do BVDV no rebanho, porém, em amostras de leite em tanques ou em amostras individuais de leite, o ELISA indireto e a VN raramente são empregadas (STURZA et al., 2011).

Dias et al. (2010) relataram discordância estatística no diagnóstico por meio de VN, em títulos de anticorpos para o BVDV1 e 2 e apontaram o risco de resultados falso negativo quando utilizado apenas um dos vírus mencionados, e destacaram a importância de utilizar as duas espécies virais para a realização da prova de VN.

Os diferentes métodos para diagnóstico do BVDV disponíveis podem apresentar maior confiabilidade quando a opção de adoção por determinado teste considera o tipo de amostra e a idade do animal (KHODAKARAM-TAFTI; FARJANIKISH, 2017).

Pelo exposto, o diagnóstico de BVDV deve compor um conjunto de ferramentas diagnósticas, capazes de demonstrar a presença de animais imunotolerantes, se as vacinas adotadas conferem proteção efetiva ou se está diante de casos de estirpe atípica. Com base na análise do conjunto é que a proposição de condutas para o controle do BVDV na propriedade deve ser estabelecida.

### **3.7.1. Isolamento viral**

O isolamento viral em cultivo celular é um método validado (WALZ et al., 2010) e considerado padrão ouro no diagnóstico do BVDV (Dubovi, 2012), seguido de identificação por provas imunoenzimáticas, como a imunoperoxidase (IPX), pois a maioria das estirpes são NCP (OMSA, 2018). Essa metodologia pode ser realizada a partir de diferentes amostras como soro, sangue total, secreções, diferentes tecidos e sêmen (WALZ et al., 2010). O vírus está presente com elevada carga viral no sangue, especialmente em leucócitos, de animais recentemente infectados e em animais PI (RIDPATH; FLORES, 2007).

O BVDV pode ser isolado em monocamadas de cultivo celular susceptíveis, provenientes de rim, pulmão ou testículo, essas culturas devem ser livres de contaminantes e de BVDV, esta exigência deve ser garantida através de análises para o monitoramento das células e insumos para o cultivo, com a finalidade de não comprometer o diagnóstico de BVD, para tanto, recomenda-se a aquisição dos insumos com certificação de livres para BVDV (STÄHL et al., 2007; OMSA, 2018). Portanto, para a incorporação do soro fetal bovino em culturas celulares é obrigatório a realização de testes que garantam a inexistência de contaminantes virais endógenos. Isso é uma medida que já foi prevista por (SWACK et al., 1975). Estes autores utilizaram o método de centrifugação a 25.000 x g na tentativa de recuperação de vírus presentes em soro fetal bovino, como o *Herpesvirus* tipo 1 (BoHV-1) e Parainfluenza vírus (PI-3). Entretanto, essa recuperação não foi bem sucedida devido a presença de anticorpos neutralizantes contra esses agentes infecciosos. Somente pelo uso do microscópio eletrônico, foi possível visualizar a presença de partículas virais de BoHV-1 e PI-3, sendo essa, portanto, uma importante ferramenta para identificação de patógenos.

A possibilidade de contaminação de soro fetal bovino com vírus adventícios e suas possíveis consequências para a produção de imunobiológicos e a interferência nos

diagnósticos laboratoriais despertaram a necessidade de realização de estudo retrospectivo nos anos de 2015 a 2019 com o SFB irradiado na Argentina para a presença de micoplasma, *Pestivirus* bovino, adenovírus bovino, língua azul, PI-3, raiva, parvovirus bovino, herpesvirus bovino, 1, vírus sincicial respiratório e reovírus. Após o isolamento em células e consecutivas passagens utilizando os soros irradiados foi verificada apenas a detecção de vestígios não infecciosos de material genético do *Mycoplasma* sp. e *Pestivirus* bovino na PCR demonstrando que o modelo de inativação por irradiação gama atende perfeitamente às necessidades a que se propõe para a inativação de agentes infecciosos (PECORA et al., 2020).

As empresas comerciais produtoras de soro fetal bovino têm usado dois métodos de inativação viral, como o tratamento térmico a 56°C por 30 a 45 minutos ou por irradiação gama, porém, o vírus ainda pode apresentar-se positivo nos testes moleculares (DALEY et al., 1998; OMSA, 2018).

O isolamento viral para o diagnóstico de BVD, por ser considerada uma técnica bastante onerosa foi amplamente substituído pela detecção de antígenos e/ou detecção de ácidos nucleicos (WALZ et al., 2010), sendo que os testes imunohistoquímicos e imunoenzimáticos se destacam por apresentarem custos mais acessível, maior rapidez e possuírem boa sensibilidade (FINO et al., 2012).

Nos estudos realizados por Szillat et al. (2020) foram produzidas cultura celular MDBK CD46-knockout, essa nova linhagem celular foi utilizada para esclarecer a adaptabilidade das diferentes estirpes de BVDV, independentemente do receptor CD46, necessário para entrada do vírus na célula. O BVDV 1 e 2 apresentaram menor taxa de infecção nesse tipo de célula, porém, após passagens sucessivas foi observado um processo de adaptação destes isolados pelo uso de sequenciamento completo, ao qual verificou-se a substituição de aminoácidos que facilitaram a entrada e replicação do vírus nas células, independentemente da presença desses receptores.

Botton et al. (1998) isolaram dezenove amostras de BVDV Brasileiros, sendo onze provenientes de fetos, seis amostras de animais clinicamente saudáveis e dois de animais com comprometimento gastroentérico. A caracterização quanto biotipo dos isolados foi representada por 16 amostras NCP e três amostras apresentaram-se CP, caracterizadas por vacuolização e destruição do tapete celular.

A capacidade de detecção do vírus em isolamento viral está diretamente associada à qualidade da amostra e será considerada fator limitante se não houver a presença de vírus

infeccioso, as limitações associadas a qualidade da amostra para detecção de antígenos podem ser contornadas utilizando-se os métodos de ELISA ou o RT-PCR em tempo real com alta capacidade analítica e comprovada sensibilidade (OMSA, 2018).

### **3.7.2. Ensaio imunoenzimático de adsorção – ELISA**

O ELISA é rotineiramente utilizado há mais de 40 anos para a detecção de antígenos e anticorpos em amostras clínicas dando suporte ao diagnóstico médico veterinário (DUBOVI, 2012). É caracterizado pela rapidez, pois, possibilita o diagnóstico em poucas horas (PITUCO, 2016). Os testes comerciais disponíveis no mercado podem ser diretos ou indiretos, dependendo da finalidade diagnóstica e podem identificar todas as espécies de BVDV.

O teste de ELISA direto (ELISA BVDV-Ag) pode se basear no método de captura e pode ser utilizado em diferentes matrizes, como plasma, sangue total, biópsia de orelha e de leite (OMSA, 2018).

No Brasil, Felicio et al. (2016), no período de Julho de 2015 a Julho de 2016, detectaram 0,02% (186/11.010) de bovinos positivos para BVDV pelo teste de ELISA BVDV Ag/Serum Plus (Idexx Laboratories HerdChek®). Esses animais eram provenientes de 12 Estados Brasileiros: São Paulo, Minas Gerais, Roraima, Rio Grande do Sul, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Bahia, Distrito Federal, Goiás, Rio de Janeiro, Paraná e Santa Catarina, das quais 118 pertenciam ao Estado de São Paulo, 13 de Roraima, 54 de Mato Grosso e um do Distrito Federal indicando a presença desse importante patógeno nos rebanhos Brasileiros e da necessidade de mais estudos quanto a genotipagem com a finalidade de ações profiláticas efetivas.

Sturza et al. (2011) compararam os testes de ELISA indireto e neutralização viral na detecção de anticorpos em tanque de leite e em amostras de leite individual com a finalidade de detecção de níveis de anticorpos e, posteriormente orientar a busca de animais PI na propriedade, pois esses animais são responsáveis em disseminar o vírus entre os animais susceptíveis. O aprimoramento da técnica de Vírus Neutralização (VN) para utilização em amostras de leite constitui importante avanço na técnica, com a finalidade de reduzir o efeito tóxico do leite sobre as células, simulando a VN na ausência do vírus e observação da citotoxicidade até a diluição aproximada de 1:40 - 1:80 com incubação da mistura leite-vírus com os cultivos celulares durante 20h) durante o teste e estimar a exposição dos rebanhos ao BVDV. Pelo índice Kappa que foi de 0.82 observou-se ótima concordância entre os testes

diagnósticos, sendo identificados 177 animais positivos no ELISA e 139 no VN, sendo que esta última demonstrou 76,8% de sensibilidade e 99,5% de especificidade.

Os testes para anticorpos anti-BVDV não são considerados adequados para verificação de animais PI nos rebanhos e, portanto, testes adicionais para antígeno devem ser realizados para diferenciação de animais PI dos animais temporariamente infectados com a finalidade de apoiar os programas de controle e erradicação de BVD (RICHTER et al., 2019).

### 3.7.3. Diagnóstico molecular

A PCR, do inglês *Polimerase Chain Reaction* (reação em cadeia pela polimerase) trata-se de uma técnica que representou grande avanço no diagnóstico laboratorial de doenças (CAVÉ et al., 2003), pois permitiu a detecção de material genético de agentes patogênicos (DNA ou RNA) baseado em sua amplificação exponencial (BRASIL, 2015). A biologia molecular permite ainda análise de expressão gênica (CAVÉ et al., 2003).

O BVDV, por se tratar de um RNA vírus é necessário que seja realizada a transcrição reversa (RT-PCR) para conversão do RNA em DNA complementar (cDNA) pela enzima transcriptase reversa (BRASIL, 2015).

A técnica de PCR, basicamente, requer a utilização de Termociclador, equipamento específico com finalidade de realização de ciclos consecutivos de aumento e diminuição da temperatura por determinado tempo para a multiplicação do número de sequências alvo. Para tanto, é necessária a abertura das duplas fitas de DNA pelo aumento da temperatura. Esta primeira etapa é chamada de desnaturação. O anelamento dos *primers* iniciadores à fita DNA ocorre em temperaturas específicas e logo a enzima *taq polimerase* passa a incorporar os nucleotídeos à fita de DNA. Na fase de extensão ocorrerá aumento da temperatura com a finalidade de potencialização da enzima para a incorporação rápida dos deoxinucleotídeos. Os *amplicons* serão aplicados em gel de agarose ou poliacrilamida com intercalante fluorescente e os resultados serão visualizados por meio de luz ultravioleta (BRASIL, 2015).

A importância da PCR no diagnóstico é refletida na compreensão dos diferentes genótipos de BVDV, pois contribuiu para o refinamento das técnicas diagnósticas (DUBOVI, 2012) e permitiu a análise qualitativa e quantitativa, sequenciamento e filogenia do vírus (PITUCO, 2016).

Weinstock; Bhudevi e Castro (2001) desenvolveram a técnica de RT-PCR, inicialmente, como opção de método diagnóstico para a pesquisa de BVDV em amostras biológicas de bovinos, utilizando-se *primers* da região 5'UTR.

NEILL (2013) afirma que os avanços no diagnóstico molecular relacionado ao BVDV possibilitaram maior entendimento sobre a patologia, facilitando o diagnóstico e vacinas.

A PCR apresenta-se capaz de identificar quantidades mínimas do material genético viral em amostras de sangue e tecidos (FINO et al., 2012), sendo mundialmente utilizada para o diagnóstico do BVDV, a detecção do RNA por meio das técnicas qualitativa e RT-qPCR como prova quantitativa (PITUCO, 2016), dessa forma os ensaios por PCR permitem identificar os animais PI, os infectados na fase aguda, e os animais vacinados com vacinas vivas modificadas (DUBOVI, 2012). Por conta dessa eficiência, a RT-qPCR passou a ser o método diagnóstico molecular frequentemente utilizado (ÛN et al., 2022).

A estratégia para monitoramento periódico de rebanhos para BVDV passou por um processo de otimização com o advento das análises por PCR em amostras sob a forma de *pools* (agrupamento de um determinado número de amostras para análise e posterior desmembramento), conferindo maior agilidade na determinação de animais positivos e facilita a identificação dos animais PIs (WEINSTOCK; BHUDEVI; CASTRO 2001, WEBER et al., 2014 SILVEIRA et al., 2018, UN et al, 2022).

KALAIYARASU et al. (2022) utilizaram os oligonucleotídeos recomendados por Hoffmann et al. (2006) por meio do equipamento da Roche Light Cycler 480, 10pmol dos *primers* BVD190-F (HOFFMANN et al., 2006), V326 (VILCEK et al., 1994) e 2pmol de sonda TQ-Pest (GAEDE et al., 2005).

A seleção adequada de *primers* representa ponto crítico no diagnóstico desse grupo viral e permite identificar todas as estirpes de *Pestivirus*, bem como distinguir os três genótipos virais de importância para a pecuária nacional (PITUCO, 2016).

#### **3.7.4. Sequenciamento genético**

O método de Sanger baseia-se na presença dos quatro dNTPs marcados, a DNA polimerase inicia a produção de nova fita de DNA quando um pequeno molde de fragmento de *primer* for hibridizado ao DNA molde de fita simples.

O primeiro sequenciador comercial de leitura de sequências gênicas foi produzido por Lee Hood em parceria com Mike Hunkapiller da empresa Applied Biosystems, Inc., (1986)

que permitiu a leitura de fragmentos corados. O sequenciamento automatizado foi desenvolvido a partir da conjugação de corante fluorescentes diferentes a cada uma das quatro reações de ddNTP aplicados em um gel poliacrilamida. Os marcadores fluorescentes detectados conforme os fragmentos de terminação migravam pelo gel e passavam em um ponto determinado sobre o qual incide um laser de Argônio, que quando atinge um terminador fluorescente, emite determinado comprimento de onda que é interpretado por um programa de computador que constrói uma imagem simulada do gel sob a forma de bandas de DNA coloridas conforme elas passavam pelo laser detector durante a eletroforese chamado eletroferograma (MIKLOS; FREYER; CROTTY, 2005).

Segundo Giammarioli et al. (2015), o sequenciamento genético, importante ferramenta utilizada para genotipagem, facilita a distinção entre as estirpes de BVDV-1, BVDV-2 e BVDV-3.

Flores et al. (2018), em análise retrospectiva de 20 anos (1998-2018) sobre a frequência de *Pestivirus* no Brasil, oriundos de diversas regiões apresentando contexto epidemiológico e sintomatologia clínica diferente, encontraram mais de 300 genotipagens parciais ou completas para os BVDV, sendo o mais frequente com 54,4% BVDV-1, os subgenótipos BVDV-1a (33,9%) e BVDV-1b (16,3%); os subgenótipos de menor frequência BVDV-1d, BVDV-1e e BVDV-1i. A incidência de genotipagem do BVDV-2 foi de 25,7% e dos seus subgenótipos o BVDV-2b (84,8%) e, em menor frequência o BVDV2-a (8,86%). O *Pestivirus* H, anteriormente, designado como HoBiPev ou BVDV-3, representado por 19,9% dos sequenciamentos, está presente em maior quantidade no Nordeste Brasileiro.

Fritzen et al. (2021) identificaram no Brasil o BVDV1a, pelo sequenciamento parcial dos produtos amplificados para as regiões Npro e 5'UTR que amplificam respectivamente, 288 e 438 pares de bases, partindo-se do RNA extraído de amostras de órgãos de um feto bovino mumificado.

### 3.8. Controle e erradicação

O controle e erradicação do BVDV, no Brasil e na América do Sul, de forma geral, ocorre de forma voluntária por propriedades ou em determinadas regiões com interesse econômico em minimizar os prejuízos causados por esses agentes (BAUERMANN; RIDPATH, 2021).

A presença de diferentes estirpes de BVDV nos rebanhos pode interferir no controle e erradicação da doença (CORTEZ et al., 2006). As estratégias de controle dessa enfermidade

devem ser realizadas por meio da identificação de animais PI, principais fonte de infecção, vacinação e medidas de biossegurança (WALZ et al., 2020) porém, a profilaxia do BVDV nos rebanhos regularmente vacinados pode ficar comprometida caso ainda permaneçam animais PI no rebanho e a estirpe circulante seja diferente da estirpe vacinal (DEZEN et al., 2013; CORTEZ et al., 2006), bem como o valor para manter o esquema o vacinal eficiente pode comprometer o controle da doença (BAUERMANN; RIDPATH, 2021).

A caracterização epidemiológica considerando as diferenças genéticas e antigênicas existentes entre os vírus de *Pestivirus A*, *B* e o *Pestivirus H* demonstra muita importância para o desenvolvimento de vacinas e de diagnósticos laboratoriais eficientes (YEŞILBAĞ; ALPAY; BECHER, 2017; DECARO et al., 2011; SANTOS et al., 2011).

Os relatos da crescente heterogeneidade das estirpes de BVDV-1 despertam preocupações quanto ao surgimento e disseminação de novas variantes com possíveis implicações na saúde animal e na forma do controle da BVD (GIAMMARIOLI et al., 2015).

A necessidade de desenvolvimento de novas vacinas para o BVDV devido às diferenças genéticas e antigênicas existentes entre os BVDV1, BVDV2 e o *Pestivirus H*, vem sendo constantemente destacada, pois as vacinas comercializadas desconsideram a existência do HoBiPeV (DECARO et al., 2011). Em 2020, o mesmo autor considerou a importância do *Pestivirus H* na reprodução, destacando-se a necessidade de testes diagnósticos de alta especificidade e alta sensibilidade para esse agente, além da necessidade de estudos mais robustos em relação a proteção cruzada das vacinas de BVDV.

O interesse em impedir a disseminação de HoBiPev nas áreas endêmicas tem orientado novas formulações de vacinas para BVDV (BAUERMANN; RIDPATH, 2021).

Os rebanhos fechados de gado de corte onde não ocorreu a entrada de novos animais geralmente criados em sistema extensivo e, portanto, não adotaram a vacinação como prática para o controle da BVD, pois os parâmetros reprodutivos e clínicos não apresentaram sinais sugestivos da doença (RIDPATH; FLORES, 2007), sugere-se a quarentena dos animais como indispensável para impedir a introdução do BVDV em criações susceptíveis e livres desse vírus (FINO et al., 2012). Para Flores (2003), a decisão de vacinar o rebanho deve ser muito criteriosa, devido ao custo e a eficácia questionável das vacinas.

Para Walz et al. (2020), existe a dificuldade de controle da BVD, apesar de todos os estudos publicados até o momento destacarem a ineficiência nas medidas de controle da doença, principalmente, no que se refere às novas estirpes virais, vacinas ineficazes, e a diversidade de espécies hospedeiras.



FOUNTAIN et al. (2022) recomendaram a adoção de medidas de biossegurança (quarentena e cerca dupla na propriedade) para os produtores como prática de prevenção contra a entrada e disseminação da BVDV, com o objetivo de tornar o rebanho mais lucrativo.

### 3.9. Protocolos de exportação

No Brasil, existem requisitos sanitários a serem atendidos pelas Centrais de Coleta e Processamento de Sêmen (CCPS) para a admissão de touros, conforme Instrução Normativa 40/2007 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA, que incluem testes negativos para brucelose, tuberculose, campilobacteriose, tricomonose e BVD. Portanto, os animais devem apresentar condições sanitárias adequadas e não registrarem a ocorrência de doenças infecciosas transmissíveis nos últimos noventa dias.

Nas CCPS é proibida a entrada de animais PI pelo BVDV, sendo necessária a realização de dois testes, com intervalo mínimo de 20 dias, para determinar a positividade do animal (quadro agudo) ou se é um PI, por meio de exames laboratoriais como RT- qPCR, isolamento viral seguido de imunofluorescência ou IPX ou ELISA para detecção do antígeno.

O atendimento das exigências do protocolo de exportação e importação de material genético da SISREC/MAPA (Sistema de Informação de Requisitos e Certificado da Área Animal) determina a necessidade de atestar as condições sanitárias dos animais por meio de provas diagnósticas como o isolamento viral ou ELISA, para detecção de antígeno em amostra de sangue total ou sêmen congelado.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Seleção de amostras para o estudo

Realizou-se, inicialmente, um estudo piloto com 683 amostras de sangue total bovino em anticoagulante com EDTA com status desconhecido para o BVDV (setembro de 2017). Dos resultados encontrados no estudo piloto foram incluídas 9.026 amostras de sangue de bovinos com idade até 15 meses, provenientes de diferentes regiões do Brasil, para a detecção de *Pestivirus* e *Hepacivirus* e de outras matrizes, como soro fetal bovino (SFB) comercial (2 lotes encaminhados para certificação sanitária) e fetos abortados (2 animais). Todas essas amostras são oriundas da rotina diagnóstica do Laboratório de Vírus de Bovídeos-Instituto Biológico (LBV/IB). O delineamento experimental está retratado na Figura 4.

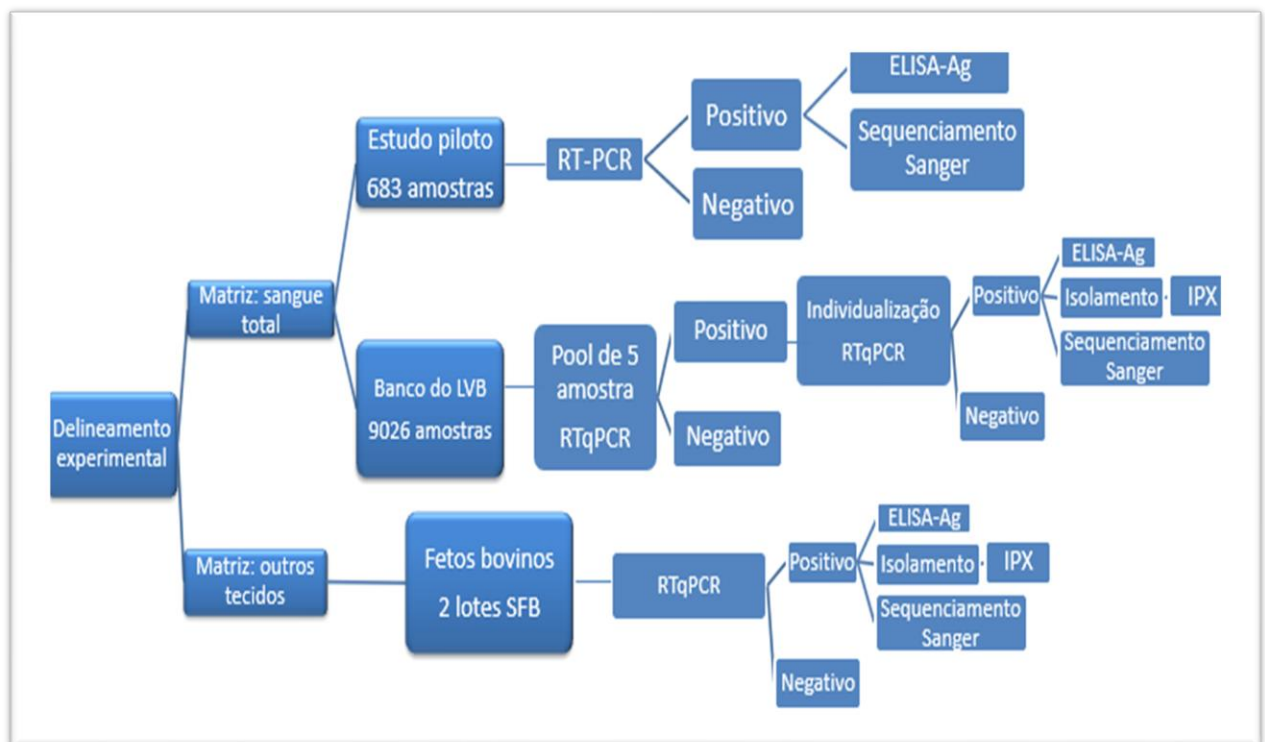


Figura 4 - Delineamento experimental do projeto com os métodos para o estudo.

### 4.2. Processamento das amostras

#### 4.2.1. Amostras de sangue

Inicialmente foram separadas alíquotas de sangue total para análise molecular, isolamento viral e ELISA antígeno. Em sequência, o restante do sangue total foi centrifugado (2.000 r.p.m por 15 minutos a 5°C) e alíquotas de plasma e papa de leucócitos foram

separadas, mantidas em tubos tipo Eppendorf devidamente identificadas e armazenadas em freezer -20°C no LVB/IB em banco de amostras.

#### 4.2.2. Amostras para isolamento viral

Para o isolamento viral, as amostras de sangue total bovino e leucócitos foram submetidas ao tratamento prévio com SFB. Para tanto, amostras foram diluídas 1:5, 1:10 e 1:20 em SFB, acrescidos de 1% de antibióticos: Penicilina G Potássica 11.200 UI/mL; Estreptomicina 0,01 g/mL; Gentamicina 0,01 g/mL e L-Glutamina 0,029 g/mL (aminoácido) e do antifúngico Anfotericina B 0,5 mg/mL (Cultilab<sup>®</sup>), mantidas sob refrigeração em temperatura de 4°C por 24 horas antes do isolamento em cultivo de células Madin Darby Bovine Kidney (MDBK). As amostras de sangue total sem tratamento prévio com SFB também foram utilizadas para o isolamento de BVDV.

As amostras de líquido torácico fetal foram diluídas (1:5) em Meio MEM acrescido de 1% de antibiótico (ATB) e os tecidos fetais foram macerados em Meio MEM na proporção de 200mg de tecido para 800µL de Meio MEM acrescido de 1% de antibióticos, aminoácido e antifúngico: Penicilina G Potássica 11.200 UI/mL; Estreptomicina 1%; Gentamicina 1%; L-Glutamina 2,9% e Anfotericina B 0,5% (Cultilab<sup>®</sup>), congelados a -20°C para inoculação em monocamada confluyente de célula MBDK.

#### 4.3. Testes moleculares

Para identificação de *Pestivirus A*, *B*, *H* e *Hepacivirus* bovino foram utilizadas as técnicas de RT-PCR e RT-qPCR nas amostras selecionadas. Para isso, foi extraído o material genético (RNA) em extrator automatizado de ácidos nucleicos QIACube HT<sup>®</sup> (QIAGEN<sup>®</sup>) por colunas de membranas de sílica, a partir de amostras de sangue total, órgãos fetais e soro fetal bovino, utilizando-se kit Cador<sup>®</sup> Pathogen 96 QIACube HT<sup>®</sup> de acordo com orientações do fabricante QIAGEN<sup>®</sup> (estação de trabalho robótica QIACube HT<sup>®</sup> - QIAGEN<sup>®</sup>),

No projeto piloto foram extraídas individualmente 683 amostras de sangue total bovino (Figura 4) e posteriormente, as 9.026 amostras foram extraídas sob a forma de *pools* de cinco animais diferentes provenientes da rotina diagnóstica do LVB/IB (Figura 5), utilizando-se 40µL de cada indivíduo, totalizando 200µL por cavidade. Após a execução da PCR foi identificado o *pool* positivo, e as amostras de sangue foram analisadas individualmente para identificar qual animal era positivo para BVDV. O material genético extraído foi mantido nas placas de armazenamento em freezer -20°C, devidamente

identificadas até o momento da realização da RT-PCR convencional, RT-qPCR e sequenciamento, conforme a Figura 5.

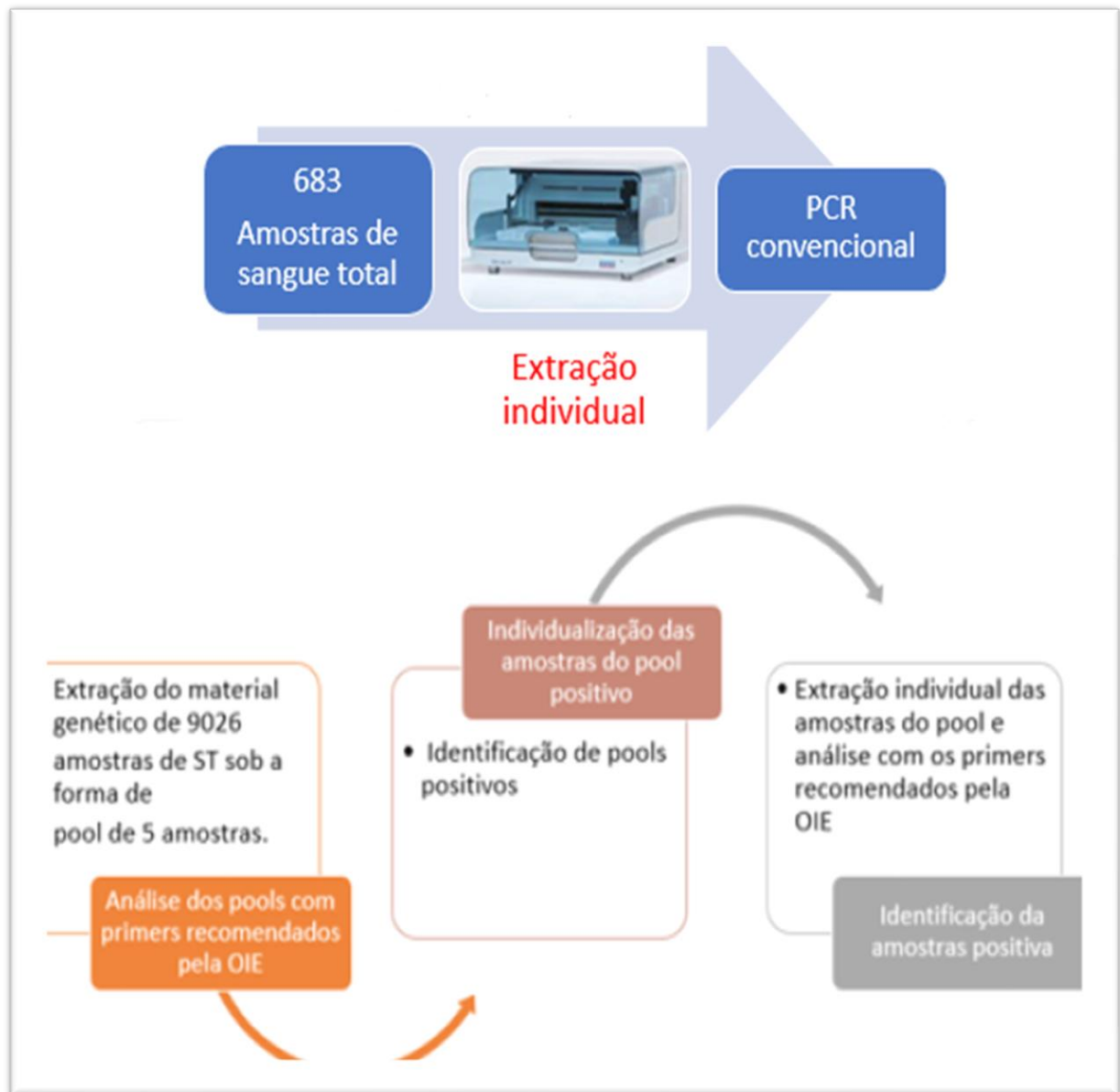


Figura 5 - Extração e análise do material genético individualmente e sob a forma de *pool* de cinco amostras.

#### 4.3.1. RT-PCR convencional

A amplificação do material genético extraído foi realizada para BVDV utilizando-se os *primers* descritos por Weinstock; Bhudevi e Castro (2001). Esses *primers* detectam regiões comuns dos *Pestivirus* A, B e H (BVDV-1, BVDV-2, Hobi-like), baseadas na sequência de 290 nucleotídeos, localizados na região (5'UTR), que é altamente conservada no genoma

viral. No Quadro 2 estão descritos os oligonucleotídeos selecionados para o diagnóstico da BVD por meio da técnica de RT-PCR convencional.

Quadro 2 - Descrição dos *primers* da região 5'UTR que amplificam 290 pares de bases (Pb) por meio da RT-PCR convencional selecionados para o diagnóstico da BVD

Identificação	Sequência	Tamanho do amplicon	Referência
BVD 103 (senso)	5'- TAGCCATGCCCTTAGTAGGAC-3'	290Pb	Weinstock et al. (2001)
BVD 372 (anti-senso)	5'- ACTCCATGTGCCATGTACAGC-3'		

Para a reação de RT-PCR *one-step* foi utilizado o kit AccessQuick™ RT-PCR System da Promega®, conforme orientações do fabricante (Quadro 3).

Quadro 3 - Descrição dos insumos utilizados na RT-PCR de BVDV

REAGENTES	VOL. PARA UMA AMOSTRA
	X1 AMOSTRA (µL)
NUCLEASE FREE WATER (NFW)	5
BVD 103 10 pmol 625nM	1
BVD 372 10 pmol 625 nM	1
AccessQuick™ RT-PCR System	12,5
ENZIMA AMV (RT)	0,5
VOL TOTAL	20
RNA	2,5

A amplificação foi realizada em termociclador BioRAD utilizando-se o programa identificado como BVD 103, conforme especificado no Quadro 4.

Quadro 4 - Ciclo de amplificação da RT-PCR convencional para BVDV

Etapa	No. Ciclos	Temperatura	Tempo
Transcrição reversa	1	45°C	45 minutos
Desnaturação	1	94°C	5 minutos
Amplificação	40	94°C	30 segundos
		57°C	30 segundos
		72°C	30 segundos
Extensão final	1	72°C	3 minutos
Resfriamento	1	4°C	∞

Após a amplificação do material genético, 2µL de “*amplicons*” foram adicionados de 3µL de corante (2µL de blue Juice - Load Invitrogen ThermoFisher 10x Blue Juice, Gel Loading Buffer e 1 µL de GelRed® Nucleic Acid Gel Stain – Biotium 1:500) submetidos à eletroforese em gel de agarose (Promega) a 1,5%, 100V, 400A por 60 minutos. A leitura foi realizada em sistema de fotodocumentador E-gel imager LIFE Technologies® e as imagens editadas e armazenadas em formulário elaborado em Excel pelo LVB/IB.

#### 4.3.2. RT-PCR em tempo real para BVDV

A RT-qPCR consiste na detecção e mensuração da fluorescência gerada durante amplificação do material genético em que novas cópias da região alvo são geradas. Esses dados são analisados em programa específico de acordo com o fabricante do kit. Foram padronizadas no Laboratório de Vírus de Bovídeos as técnicas de RT-qPCR para identificação dos *Pestivirus* (A, B e H) e *Hepacivirus*, com os *primers* e sondas de hidrólise e seus respectivos genes representados no Quadro 5.

Quadro 5 – Oligonucleotídeos e genes utilizados na padronização RT-qPCR para detecção do BVDV, diferencial entre BVDV-1/BVDV-2 e BovHepV.

Autores	Primer/Sonda	Sequência de RNA (5'-3')	Gene
HOFFMAN et al. (2015). (OMSA)	190-F	GRAGTCGTCARTGGTTCGAC	5' NTR
	V326-R	TCAACTCCATGTGCCATGTAC	5' NTR
	TQ-PEST	FAM-TGCYAYGTGGACGAGGGCATGC-TAMRA	5' NTR
BHUDEVI; WEINSTOCK (2001)	103F	TAGCCATGCCCTTAGTAGGAC	5' UTR (BVDV)
	176R	GACGACTACCCTGTACTCAGG	5' UTR (BVDV)
	BVDV1 145	FAM AACAGTGGTGAGTTCGTTGGATGGCTT TAMRA	5' UTR (BVDV 1)
	BVDV2 147	VIC AGCAGTGAGTCCATTGGATGGCCGA TAMRA	5' UTR (BVDV 2)
BAECHLEIN et al. (2015)	BovHepV -F	5'- GCTCGGCTTACATACTCTAC -3'	NS3 (BovHepV)
	BovHepV - R	5'- GAATGGTAGTGGAATCGGTG -3'	NS3 (BovHepV)
	BovHepV	FAM-TTTACCATCCGCCAAAAATCTGCCATAA-BHQ	NS3 (BovHepV)

#### 4.3.3. Análise das sequências de primers utilizando-se o BLAST

As sequências de primers descritas por Hoffman et al. (2015), Bhudevi; Weinstock (2001) e Baechlein et al. (2015) foram analisadas utilizando-se a ferramenta de pesquisa para alinhamento local BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), esta permite evidenciar regiões que apresentam maior similaridade entre as sequências de nucleotídeos ou proteínas e por fim calcula a significância estatística ao compará-las com bancos de dados.

#### 4.3.4. Oligonucleotídeos preconizados pela OMSA - (2018)

A triagem das amostras de sangue bovino foi realizada utilizando-se conjunto de primers e sonda recomendados pela OMSA *Primer Reverse V326*, a sonda marcada com

FAM TQ-Pest ao *Primer Forward* F190 descritos respectivamente por Hoffman et al. (2006), representados no Quadro 5.

Esta técnica foi padronizada no LVB/IB utilizando o equipamento LightCycler 480 II (Roche®), com os *primers* recomendados pela OMSA para o diagnóstico da BVD, inicialmente com 25µL volume final com o kit Promega®. Posteriormente, foi realizada a otimização do protocolo para a redução de 50% do volume final da reação sem prejuízos quanto a sensibilidade e especificidade, passando ao volume total de reação para 12,5µL. Com a finalidade de minimizar desvios de pipetagem foi utilizada a plataforma de pipetagem automatizada Eppmotion – Eppendorf.

Para a amplificação dos produtos da RT-qPCR foi utilizado o kit GoTaq® Probe 1-Step RT-qPCR System - Promega® (5,0 µL Go Taq qPCR 2x, 0,25 µL Script RT mix 1-step, 3,25 µL NFW, 500nm *primer* 190-F, 500nm *primer* V326, e 150nm de Probe: TQ-PEST para um volume total de reação de 10µL (Quadro 6).

Quadro 6 - Quantidade de reagentes e oligonucleotídeos para o preparo do Master Mix para RT-qPCR para o diagnóstico da BVD

AMPLIFICAÇÃO	REAGENTES	VOL. PARA UMA AMOSTRA
FABRICANTE		X1 AMOSTRA (µl)
PROMEGA	GoTaq probe qPCR 2x	5
	Go Script RT mix 1 step 50x	0,25
	Nuclease Free Water NFW	3,25
	<i>Primer</i> BVD 190F1 10pmol	0,5
	<i>Primer</i> BVD V326R 10pmol	0,5
	Probe BVDV 3 pmol	0,5
	VOL TOTAL	10



Quadro 7 - Ciclo de amplificação RT-qPCR para o diagnóstico da BVD com os oligonucleotídeos recomendados pela OMSA utilizando-se o Kit de amplificação GoTaq® Probe 1-Step RT-qPCR System (Promega®)

Etapa da RT-qPCR	Temperatura	Tempo	Aquisição	Ciclos
Transcrição reversa	48°C	15 min	None	1
Desnaturação	95°C	10 min	None	1
Amplificação	95°C	15 seg	None	45
	60°C	1min	Single	
Resfriamento	40°C	∞	-	1

#### 4.3.5. Oligonucleotídeos para diagnóstico diferencial de BVDV 1 e BVDV 2, descritos por Bhudevi; Weinstock (2001)

Após a triagem do material genético extraído do sangue total dos bovinos utilizando-se o conjunto de *primers* e sonda recomendados pela OMSA, as amostras dos *pools* desmembrados que se apresentaram como positivas, foram analisadas individualmente, por meio do conjunto *primers* multiplex, descritos por Bhudevi; Weinstock (2001), representados no Quadro 9, que são capazes de identificar e diferenciar o BVDV-1 e o BVDV2- por meio de sondas específicas marcadas pelos fluoróforos FAM e VIC.

Para a amplificação dos produtos da RT-qPCR (Quadro 10), foi utilizado o kit GoTaq® Probe 1-Step RT-qPCR System - Promega® (5,0 µL Go Taq qPCR 2x, 0,25 µL Script RT mix 1-step, 3,25 µL nuclease free water (NFW), 500nm *primer* 103F, 176R, BVDV-1 145, BVDV-2 147, para volume total de reação de 11,5µL (Quadro 8).

Quadro 8 - Quantidade de reagentes e *Primers* para o preparo do Mix para RT-qPCR para o diagnóstico diferencial da BVD

FABRICANTE	REAGENTES	VOL. PARA UMA AMOSTRA
		X1 AMOSTRA (µl)
PROMEGA	GoTaq probe qPCR 2x	5
	Go Script RT mix 1 step 50x	0,25
	NFW	1,2
	BVD 103 F 10 pmol	1
	BVDV 176 R 10pmol	1
	PROBE BVDV 1,5pMol	0,3
	PROBE BVDV 2,5pMol	0,25
	VOL TOTAL	9
	RNA	2
	total reação	11

Quadro 9 - Ciclo de amplificação RT-qPCR para oligonucleotídeos *para* RT-qPCR multiplex que diferenciam BVDV-1 e BVDV-2, descritos por Bhudevi; Weinstock (2001), utilizando-se o Kit de amplificação GoTaq<sup>®</sup> Probe 1-Step RT-qPCR System (Promega<sup>®</sup>)

Etapa da RT-qPCR	Temperatura	Tempo	Aquisição	Ciclos
Transcrição reversa	45°C	15 min	None	1
Desnaturação	95°C	10 min	None	1
Amplificação	95°C	15 seg	None	45
	*60°C	1min	Single	
Resfriamento	40°C	∞	-	1

Captura do sinal fluorescente (\*) durante o ciclo de amplificação na fase anelamento.

#### 4.3.6. Kit comercial Virotype<sup>®</sup> BVDV RT-PCR (Indical Bioscience)

A avaliação do kit comercial para detecção de RNA para BVDV foi utilizado para testar as amostras individuais, identificadas como positivas no teste de triagem com o conjunto de *primers* e sonda recomendados pela OMSA.

O Kit comercial Virotype® BVDV RT-PCR (Indical Bioscience) possui os reagentes necessários para detecção do RNA viral nas amostras extraídas. Os controles positivo e negativo são fornecidos pelo fabricante. A transcrição reversa e a PCR ocorrem em única reação, o que reduz o risco de contaminações cruzadas entre as amostras. Partindo-se das combinações de *primers* e sonda específicas com a utilização de fluoróforos específicos FAM (465-510) e HEX (533-580) que respectivamente possibilitam avaliar a presença da RNA viral. O controle interno da extração, auxilia na identificação e exclusão de resultados falsos negativos, contribuindo para a credibilidade dos resultados.

Inicialmente, foram realizadas as curvas para o Kit frente aos vírus BVDV-1 e BVDV-2, titulados para avaliar a sensibilidade do teste. O procedimento de preparo do mix para a reação de RT-qPCR foi realizado de acordo com orientações descritas pelo fabricante (Quadro 10).

Quadro 10 - Preparo do Master Mix Kit comercial Virotype® BVDV RT-PCR (Indical Bioscience) para cada amostra

Reagentes	V( $\mu$ L)
RT-PCR MIX	19,7
Enzima MIX	0,25
Volume total	20
RNA	5
Total de reação	25

Para minimizar desvios e formação de aerossóis durante as fases de pipetagens do mix e das amostras foi utilizado o pipetador automático Eppmotion (Eppendorf).

A reação de RT-qPCR foi realizada em placas de 96 cavidades para Real-time recomendadas pelo fabricante do equipamento Roche Lightcycle 480. Para a reação de RT-PCR foram adicionados em cada cavidade da placa de reação 20 $\mu$ L de Master Mix e 5 $\mu$ L de amostra de RNA, totalizando 25 $\mu$ L de volume final de reação. A cada reação foram incluídos os controles (positivo e negativo) fornecidos pelo fabricante para validação da prova. No Quadro 11, estão descritos o ciclo e amplificação, segundo orientações do fabricante.

Quadro 11 - Ciclo de amplificação RT-PCR para Kit comercial Virotype® BVDV RT-PCR (Indical Bioscience)

Etapa da RT-qPCR	Temperatura (°C)	Tempo	N. de Ciclos
Transcrição reversa	50°	20 min	1
Desnaturação	95 °	15 min	1
Amplificação	95 °	30 seg	40
	*57°	45 seg	
	68°	45 seg	
Resfriamento	40°	∞	1

Captura do sinal fluorescente (\*) durante o ciclo de amplificação na fase anelamento.

A interpretação dos resultados e validação do ensaio foi realizada após a avaliação dos resultados dos valores produzidos pelo controle positivo fornecido no kit, com valores de Ct < 36 para os Fluoróforos FAM e HEX. O controle negativo não deve produzir sinal fluorescente no filtro de leitura FAM, enquanto que o controle positivo deve produzir sinal fluorescente em ambos os filtros, quando não há produção e captura de sinal fluorescente a reação passa a ser caracterizada como uma reação inconclusiva.

#### 4.3.7. Padronização da RT-qPCR para diagnóstico do *Hepacivirus* bovino

Para o diagnóstico do *Hepacivirus*, foram selecionados *primers* descritos por Baechlein et al. (2015), baseados no gene NS3, conforme descrito a seguir.

A padronização do diagnóstico do *Hepacivirus* bovino com o conjunto de *primers* para RT-qPCR descrito por Baechlein et al. (2015), foi realizada em etapas:

- Inicialmente foram verificadas as temperaturas de “*Melting*” por meio do programa de análises de sequências de *primers* disponível no site IDT OligoAnalyzer Tool - *primer analysis* Oligo Analyzer (idtdna.com), no qual foram sugeridas as seguintes temperaturas: para o *primer* BovHepV Foward 53°C, BovHepV Reverse 46,7°C.
- O gradiente de temperatura foi realizado no termociclador Veriti®, conforme escala determinada de 54°C, 56°C, 57°C e 59,2°C;
- preparo e análise de três diferentes mix utilizando-se o kit Acess Quick™ e enzima AMV (RT) e diferentes concentrações de *primers* HepBovV (400nM, 320nM e 200nM);
- preparo do mix Acess Quick™, NFW, enzima AMV (RT) e 200nM de *primers* adicionados de diferentes quantidades de RNA (5, 4, 3 e 2µL).

Todas as reações foram realizadas em triplicatas. O ciclo de amplificação RT-PCR para BovHepV é descrito no Quadro 12.

Quadro 12 – Ciclo de amplificação RT-PCR para o BovHepV

Etapa da RT-qPCR	Temperatura (°C)	Tempo	Ciclos
Transcrição reversa	45°	45 min	1
Desnaturação	94 °	5 min	1
Amplificação	94 °	30 seg	40
	57°	30 seg	
	72°	30 seg	
Extensão	72 °	3 min	1
Resfriamento	4°	∞	1

Após essa etapa, os “*amplicons*” foram submetidos a eletroforese em cuba específica em 100V, 400A por 60 minutos e a leitura realizada em sistema de fotodocumentador E-gel imager LIFE Technologies®. As imagens foram editadas e armazenadas em software específico.

Na Figura 6 estão demonstradas a formação de bandas em triplicata no gel de agarose 1,5% mediante diferentes gradientes de temperatura.

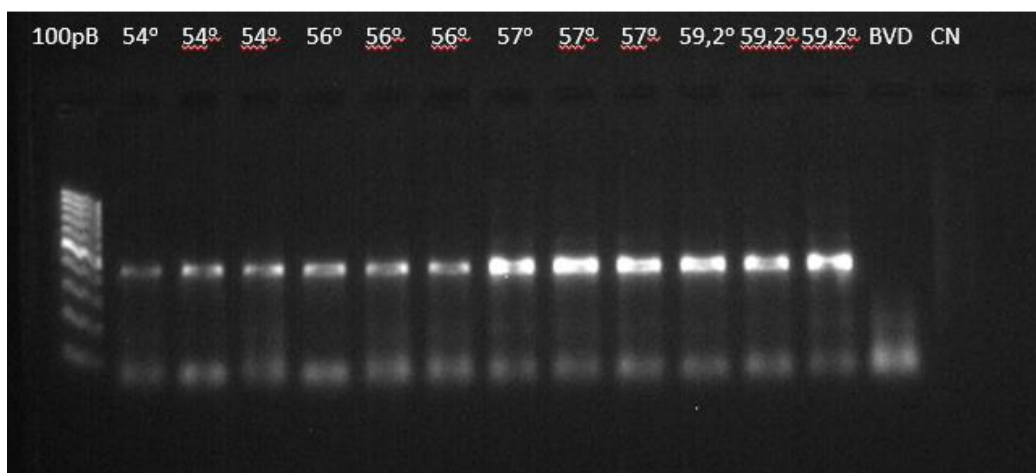


Figura 6 – Eletroforese da RT-PCR do *Hepacivirus* bovino para diferentes gradientes de temperatura (°C).

Após a análise das bandas formadas no gel de agarose em diferentes temperaturas de anelamento em RT-PCR convencional utilizando-se quantidades de *primers* e de material genético anteriormente descritos, foi observado que a padronização estabelecida foi

temperatura de 57°C, concentração mínima de *primers* 200nM e quantidade mínima 2µL RNA para um volume final de 25µL de reação (Figura 6).

Quadro 13 - Quantidade de reagentes para o preparo do mix de RT-qPCR para o diagnóstico de *Hepacivirus* bovino com *primers* 500nM e probe 100nM

Fabricante	□ Primers e Sonda	Reagentes	Vol/Amostra
			X1 Amostra (µL)
Promega		GoTaq probe qPCR 2x	10
		Go Script RT mix 1 step 50x	0,4
		NFW	4,9
	500nM	<i>primer</i> HEP F 10pmol	1
	500nM	<i>primer</i> R Hep 10pmol	1
	100nM	Probe HEP 10 pmol	0,20
VOL TOTAL			17,5
RNA			2,5

Quadro 14 - Quantidade de reagentes para o preparo do mix de RT-qPCR para o diagnóstico de *Hepacivirus* bovino com *primers* 500nM e probe 150nM

Fabricante	□ Primers e Sonda	Reagentes	Vol/Amostra
			X1 Amostra (µL)
Promega		GoTaq probe qPCR 2x	10
		Go Script RT mix 1 step 50x	0,4
		NFW	4,8
	500nM	<i>primer</i> HEP F 10pmol	1
	500nM	<i>primer</i> HEP R 10pmol	1
	150nM	Probe HEP 10 pmol	0,30
VOL TOTAL			17,5
RNA			2,5

Quadro 15 - Quantidade de reagentes para o preparo do Mix de RT-qPCR para o diagnóstico de *Hepacivirus* bovino com *primers* 500nM e probe 200nM

Fabricante	□ Primers e Sonda	Reagentes	Vol/Amostra
			X1 Amostra (μL)
Promega		GoTAq probe qPCR 2x	10
		Go Script RT mix 1 step 50x	0,4
		NFW	4,7
	500nM	<i>primer</i> HEP F 10pmol	1
	500nM	<i>primer</i> HEP R 10pmol	1
	200nM	Probe HEP 10 pmol	0,4
VOL TOTAL			17,5
RNA			2,5

Quadro 16 - Quantidade de reagentes para o preparo do Mix de RT-qPCR para o diagnóstico de *Hepacivirus* bovino com *primers* 500nM e probe 300nM

Fabricante	□ Primers e Sonda	Reagentes	Vol/Amostra
			X1 Amostra (μL)
Promega		GoTAq probe qPCR 2x	10
		Go Script RT mix 1 step 50x	0,4
		NFW	4,6
	500nM	<i>primer</i> HEP F 10pmol	1
	500nM	<i>primer</i> HEP R 10pmol	1
	300nM	Probe HEP 10 pmol	0,6
VOL TOTAL			17,5
RNA			2,5

#### 4.4. Análise de reações cruzadas entre *Pestivirus* e *Hepacivirus*

Inicialmente, foram realizadas análises *in silico* de sequências nucleotídicas 5'UTR do BVDV e *Hepacivirus* disponíveis no GenBank para a verificação de reações cruzadas. Para tanto, as sequências de BVDV selecionadas foram: BVDV-1:FJ895328.1, KM007118.1, JX122862.1, JQ513586.2; BVDV-2: KM007130.1, EF683554.1, KP715140.1, JN967743.1 e BVDV-3 HOBI: KC465391.1, KC465389.1, KP715144.1, JN967727.1 e para *Hepacivirus*, HCV 1A EU747798.1, EU747795.1, EU747793.1, EU747791.1; HCV 1B EU747810.1, EU747805.1, EU747803.1, EU747799.1 e HCV 3A EU747824.1, EU747819.1, EU747814.1 EU747811.1. O alinhamento das sequências foi realizado utilizando-se o programa Seaview4.

#### 4.5. ELISA-Ag direto de competição para BVDV

Para a avaliação quanto à sensibilidade e especificidade das provas moleculares (RT-PCR e RT-qPCR) para o *Pestivirus* e *Hepacivirus*, as amostras positivas foram analisadas no ELISA, utilizando-se o Kit Comercial BVDV Ag/Serum Plus (Idexx Laboratories HerdChek<sup>®</sup>), de acordo com as recomendações do fabricante, conforme descritos a seguir.

O ELISA direto de competição foi realizado seguindo orientações do fabricante utilizando-se os controles positivo e negativo do kit, assim como as amostras de sangue total foram diluídas em partes iguais na solução tampão específica, para detecção de antígeno em placa previamente sensibilizada por anticorpos monoclonais específicos (E<sup>ms</sup>). A placa foi incubada em estufa em temperatura de 37°C por duas horas. Transcorrido o tempo, a placa foi submetida a três lavagens utilizando-se 300 µL de solução de lavagem do kit (wash solution) previamente diluída na proporção de 1:10. Em seguida, foram adicionados 100 µL de conjugado e incubado por 30 minutos em temperatura ambiente. Na sequência, o procedimento de lavagem foi repetido; na sequência foram adicionados 100 µL do substrato TMB e após 10 minutos foram adicionados 100 µL de *stop solution* para bloquear a reação. A mensuração da absorbância foi realizada em espectrofotômetro específico (Multiscan Ascent - Thermofisher<sup>®</sup>) para placas de 96 cavidades equipado com filtro de 450nm e 650nm. A validação do teste, bem como a interpretação dos resultados, foi realizada mediante instruções fornecidas pelo kit, por meio da avaliação do cálculo da densidade óptica (DO) obtida.

Os resultados do ELISA BVDV antígeno Idexx<sup>®</sup> foram expressos nos valores de absorbâncias (Quadro 18) aferidos em densidade óptica (D.O.), com comprimentos de ondas (450nm e 650nm) sendo resultados  $\leq 0,200$  considerados negativos; 0,2 a 0,300 suspeitos e  $\geq 0,300$  positivos.



#### 4.6. Isolamento viral

##### 4.6.1. Manutenção das células

A linhagem de células utilizada para o isolamento viral foi a de rim fetal bovino “Madin Darby Bovine Kidney” (MDBK – ATCC CCL22) pertencente ao banco de células do LVB/IB. A linhagem celular foi mantida em garrafas de poliestireno estéril próprias para cultivo celular (TPP, Techno Plastic Products AG<sup>®</sup>, Switzerland e Costar, Corning Incorporated<sup>®</sup>, USA) em meio de crescimento, composto por Meio Essencial Mínimo (MEM acrescido de HEPES – Cultilab<sup>®</sup>, Campinas, Brasil), acrescido de bicarbonato de sódio, L-Glutamina, antibiótico e 25mM de HEPES suplementado de 10% de soro fetal bovino, inativado e livre de *Mycoplasma* e *Pestivirus* (SFB Cultilab<sup>®</sup>, Campinas, Brasil), mantidas em estufa à temperatura de 37°C.

Para a manutenção das linhagens, o repique das células foi realizado com intervalo de três a cinco dias, utilizando-se solução de Tripsina-Versene (Sigma- Aldrich<sup>®</sup>, Steinheim, Alemanha) para a individualização das células e mantidas em concentração de  $2 \times 10^5$ -cels/mL e acrescido de meio MEM tamponado com HEPES e 10% de SFB.

##### 4.6.2. Isolamento viral em células Madin Darby Bovine Kidney (MDBK)

As amostras clínicas de sangue total e leucócito positivas na RT-PCR, RT-qPCR e ELISA-Ag, assim como fragmentos de tecidos fetais e SFB comerciais foram inoculadas em placas de 24 cavidades contendo monocamada de células MDBK pré-formada, na concentração de  $1,5 \times 10^5$  células/mL, preparada com 24 horas de antecedência.

As placas inoculadas com o material positivo para BVDV foram incubadas em estufa (SANYO – COM-18 AIC UV) na temperatura de 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> por uma hora para adsorção do vírus às células. Após esse período, o inóculo foi desprezado e cada amostra foi submetida a lavagem com MEM, descartado e adicionado 100 µL do meio de manutenção contendo MEM tamponado com HEPES e acrescido de 5% SFB à monocamada. A placa foi submetida a leitura em microscópio invertido para avaliar a integridade do tapete. A placa foi incubada nas mesmas condições anteriores, durante o período de sete dias, e monitorado diariamente para avaliar citotoxicidade e efeito citopático. Decorrido o período, a placa foi congelada, descongelada e submetida à nova passagem em célula MDBK. No caso de não se observar efeito citopático, as amostras em isolamento foram submetidas até terceira passagem. Decorrido o período do isolamento viral, uma alíquota de 100 µL foi destinada ao RT-qPCR com o Kit comercial Virotype<sup>®</sup> BVDV RT-PCR (Indical Bioscience) para

confirmação do sucesso do isolamento viral que também foi submetida ao teste de IPX para avaliação quanto a presença do BVDV NCP.

As amostras de SFB positivas ao BVDV pelos testes moleculares e imunoenzimáticos foram inoculadas em suspensão, na proporção de 5% na concentração de  $2 \times 10^5$  células/mL de células MDBK.

O isolamento do BVDV, a partir de amostras de líquido torácico e os tecidos fetais, foi realizado com 200mg de amostras de tecidos fetais identificadas como positivas no ELISA BVDV Ag macerados em 800  $\mu$ L de meio MEM adicionado de 10% de SFB e 1% de antibiótico.

#### **4.6.3 Determinação do título viral**

Para determinação do título viral, as estirpes padrões de BVDV 1 e BVDV 2 foram submetidas às diluições seriadas em base 10. Para tanto, oito tubos de 15mL foram identificados, respectivamente, como sendo  $10^{-1}$  a  $10^{-8}$  e foi utilizado o meio MEM como diluente. Dessa maneira, para cada tubo foram adicionados 4,5mL de meio MEM e 0,5mL do vírus no primeiro tubo, que corresponde à diluição  $10^{-1}$ , foi homogeneizado com a pipeta e, para cada diluição trocou-se a ponteira. Para cada vírus, essa análise foi realizada em duplicata. Na sequência, cada diluição foi transferida para a microplaca de 96 cavidades (TPP, Techno Plastic Products AG<sup>®</sup>, Switzerland). As amostras foram distribuídas nas colunas de 1 até 8, conforme diluição e, posteriormente, foram e acrescidas de 100 $\mu$ L de células, na concentração de  $3 \times 10^5$  células/mL. As colunas 11 e 12, reservadas ao controle de células, aos quais adicionaram-se 100 $\mu$ L de Meio MEM e 100 $\mu$ L de suspensão de célula MDBK ( $3,5 \times 10^5$  células/mL).

As placas foram mantidas em estufa com umidade controlada, temperatura de 37°C e injeção de 5% de CO<sub>2</sub>, por até quatro dias, quando foi realizada a leitura da reação em microscópio óptico invertido. O cálculo do título foi feito pelo método de Reed e Muench (1938), segundo o Quadro 17.

Foram reservadas alíquotas das diluições ( $10^{-1}$  a  $10^{-8}$ ) dos vírus titulados BVDV-1 NADL e BVDV-2 para realização da extração do material genético, a fim de determinar o limiar de detecção dos ensaios de diagnósticos de RT-PCR e RT-qPCR.

Quadro 17 - Cálculo do título viral BVDV-2

Diluição	Cultivos celulares		Índice acumulados		Acumulado (NI + I)	(I/I+ NI)	%
	Ausência de ECP	Presença de ECP	Infectados (I)	Não infectados (NI)			
10 <sup>-1</sup>	0	8	27	0	27	27/27	100
10 <sup>-2</sup>	0	8	19	0	19	19/19	100
10 <sup>-3</sup>	0	8	11	0	11	11/11	100
10 <sup>-4</sup>	5	3	3	5	8	3/8	37,5
10 <sup>-5</sup>	8	0	0	13	13	0/13	0
10 <sup>-6</sup>	8	0	0	21	21	0/21	0
10 <sup>-7</sup>	8	0	0	29	29	0/29	0
10 <sup>-8</sup>	8	0	0	37	37	0/37	0

A distância proporcional entre as duas diluições (DP) é calculada por meio da fórmula:

$$(\% \text{ de positivos acima de } 50\%) - 50$$

$$(\% \text{ de positivos acima de } 50\%) - (\% \text{ de positivos abaixo de } 50\%).$$

#### 4.6.4. Diluições das estirpes BVDV-1 NADL e BVDV-2 para a realização da curva padrão em RT-qPCR

A padronização da curva padrão foi realizada com amostras de vírus padrão BVDV-1 NADL de título de 10<sup>5,6</sup> TCID<sub>50</sub>/mL e BVDV-2 de título 10<sup>4,8</sup> TCID<sub>50</sub>/mL.

Foram realizadas diluições seriadas na base 10 de (10<sup>-1</sup>) a (10<sup>-8</sup>). As amostras foram analisadas em triplicatas para cada diluição viral, com finalidade de verificação da concordância entre os resultados de mensuração encontrados, com objetivo de conferir a repetibilidade e o grau de concordância entre os resultados encontrados.

Nas Tabelas 1 e 2 são demonstradas as diluições seriadas na base 10 (10<sup>-1</sup>a 10<sup>-8</sup>), o número de doses infectantes e a quantidade de TCID<sub>50</sub>/mL.

Tabela 1 - Diluição seriada na base 10 do vírus padrão BVDV-1 NADL de título de  $10^{5,6}$  TCID<sub>50</sub>/mL

Diluição	Dose infectante	TCID <sub>50</sub> /mL
$10^{-1}$	100.000	$10^5$
$10^{-2}$	10.000	$10^4$
$10^{-3}$	10.00	$10^3$
$10^{-4}$	100	$10^2$
$10^{-5}$	10	$10^1$
$10^{-6}$	1	$10^0$
$10^{-7}$	0,1	$10^{-1}$
$10^{-8}$	0,01	$10^{-2}$

Tabela 2 - Diluição seriada na base 10 do vírus padrão BVDV-2 de título de  $10^{4,8}$  TCID<sub>50</sub>/mL

Diluição	Dose infectante	TCID <sub>50</sub> /mL
$10^{-1}$	10.000	$10^4$
$10^{-2}$	1.000	$10^3$
$10^{-3}$	100	$10^2$
$10^{-4}$	10	$10^1$
$10^{-5}$	1	$10^0$
$10^{-6}$	0,1	$10^{-1}$
$10^{-7}$	0,01	$10^{-2}$
$10^{-8}$	0,001	$10^{-3}$

As estirpes de vírus BVDV-1 NADL e BVDV-2 foram utilizadas para a avaliação da sensibilidade analítica da RT-qPCR quantitativa.

#### 4.7. Reação de imunoperoxidase para BVDV não citopatogênico (NCP) (PITUCO, 1995)

As placas de isolamento em cultivo celular, na quinta passagem da amostra, foram submetidas ao processo de fixação pelo calor, em estufa com ventilação forçada a 80°C. Para tanto, o sobrenadante de cada amostra foi desprezado em cuba contendo hipoclorito 2% e cada cavidade da placa foi submetida a uma lavagem com 1000 µL de Solução salina fosfatada tamponada (PBS), pH 7,3-7,5 (ANEXO 1). O sobrenadante foi desprezado e a placa foi invertida e seca em papel toalha para remover o excesso de PBS. Em seguida, a placa foi

colocada em forno a 80°C por quatro horas para promover a fixação das células ao plástico da placa. Transcorrido esse período, a placa foi armazenada no freezer na temperatura de -20°C.

Para a IPX inicialmente preparou-se a solução de PBS/T20 na proporção de 0,05% Tween-20 que foi utilizada como diluente para o anticorpo monoclonal C16 anti-BVDV e sistema biotina-streptoavidina. O anticorpo monoclonal anti-BVDV foi diluído, na proporção de 1:800 e 100 µL deste foi adicionado em cada uma das 96 cavidades da placa de isolamento, que foi mantida em câmara úmida a 37°C por 60 minutos. Posteriormente, a placa foi submetida a três lavagens utilizando PBS/IPX diluído (1:3) em água ultra pura com o auxílio de pipeta multicanal, e a secagem realizada. Em seguida foi preparado o anticorpo anti-mouse IgG biotilado (GE Healthcare Life Sciences), na proporção de 1:100 em PBS/T20 e aplicados 100µL em cada cavidade, seguido de incubação 37°C por 60 minutos, repetido o processo de lavagem e aplicado o reagente Streptoavidina biotilado (GE Healthcare Life Sciences) na proporção de 1:100 em PBS/T20 e aplicados 100µL deste em cada cavidade. A placa foi mantida nas condições de temperatura e umidade e, terminado o tempo de incubação de 60 minutos, foi lavada conforme anteriormente. Foram preparados cinco mL de substrato cromógeno utilizando-se 2,0g de 3-amino 9-etil carbazole (AEC), 0,3mL de dimetilformamida (DMF), 4,7mL de Acetato de sódio (pH 5,0) e 2,5µL de Peroxido de hidrogênio 30%. Após a aplicação de 100µL do substrato em cada cavidade, a placa foi incubada em temperatura ambiente por até 30 minutos. A reação foi bloqueada com água destilada, e em seguida adicionado 1000µL de água destilada para proceder a leitura em microscópio óptico invertido, para visualização da coloração marrom-carmim no citoplasma das células infectadas e confirmação do BVDV NCP. As placas foram examinadas sob microscopia digital de luz invertida EVOS XL core sob aumento de 40x.

#### 4.8. Sequenciamento de Sanger

O sequenciamento pelo método de Sanger e análise filogenética das amostras positivas para BVDV foram realizados utilizando-se o conjunto de *primers* da 5'UTR descrito por WEINSTOCK; BHUDEVI e CASTRO (2001), que detectam regiões comuns para BVDV-1, BVDV-2 e BVDDV-3, baseadas na sequência de 290 nucleotídeos. A partir do produto obtido na RT-PCR convencional foi realizada a purificação das amostras utilizando-se o Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega®), seguindo as instruções do kit. Para cada amostra foi adicionado igual volume do *Membrane Binding Solution* e o volume total foi transferido para as minicolunas, incubado por um minuto em temperatura ambiente e, em seguida foi

submetido a centrifugação em 14.000rpm/1minuto (Herolab – modelo: UniCen<sup>®</sup> MR). O sobrenadante foi descartado e cada minicoluna foi lavada com 700µL da solução de lavagem com etanol e centrifugado novamente por 14.000rpm/1minuto. Nova etapa de lavagem foi realizada com 500µL e centrifugado novamente por 14.000rpm/5 minutos. Após desprezar o conteúdo no fundo do tubo coletor foi realizada a centrifugação por um minuto para retirada do etanol residual. A minicoluna foi, então, transferida para microtubo de 1,5mL e adicionados 50µL de água livre de nuclease (NFW) diretamente na minicoluna e incubado em temperatura ambiente por um minuto e, finalmente, centrifugado em 14.000 rpm/1 minuto.

Após a etapa de purificação das amostras, essas foram aplicadas em gel de agarose 1,5% para avaliar a viabilidade e qualidade das bandas purificadas. Posteriormente, as amostras selecionadas foram congeladas em temperatura de -20°C até o momento da realização do sequenciamento por Sanger.

A reação de sequenciamento foi realizada a partir das amostras purificadas utilizando-se o BigDye<sup>®</sup> Terminator 3.1 cycle sequencing Kit (Applied Biosystems<sup>®</sup> by Life Technologies<sup>™</sup>). Para tanto foram preparados o mix contendo 1µL do Big Dye, 3µL de Buffer de sequenciamento 5x, 4µL do *primer forward* e 4µL do *primer reverse* na concentração de 3,2pmol/µL e 2µL do DNA purificado, totalizando 10µL de reação. Para avaliar a qualidade do sequenciamento foi incluído o controle pGEM do kit da Applied Biosystems. A reação foi realizada em termociclador sob o ciclo de sequenciamento: 95°C /1min, 35 ciclos de 95°C /30s, 50°C /15s, 60°C /4min, 72°C/5min e 4°C ao final da reação. Após a reação, cada amostra foi transferida para a placa de sequenciamento e submetida a precipitação com o kit BigDye Xterminator Purification KIT (Applied Biosystems<sup>®</sup>), na proporção de 45 µL do BigDye e 10 µL do SAM. A placa após ficar sob agitação na velocidade de 1500 rpm por 30 minutos foi centrifugada a 6000 rpm por 2 minutos e colocada no sequenciador 3500 Series Genetic Analyzer (Applied Biosystems<sup>®</sup>).

Os dados gerados do sequenciamento de Sanger foram analisados pelo programa BIOEDIT (Sequence Alligment Editor) versão 7.0.5.3. 10/28/05, e comparadas aos dados de seqüências depositadas no GenBank NCBI por meio do Blast Software ([Nucleotide BLAST: Search nucleotide databases using a nucleotide query \(nih.gov\)](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)). A construção da árvore filogenética foi realizada no programa MEGA X versão 10.2.5 (1993-2022).

#### 4.9. Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa IBM SPSS Statistics, para a verificação do índice de concordância *Kappa test*, descrito por Tang et al. (2015), com nível

de confiança de 95%. As margens dos valores do *Kappa test* e o grau de concordância entre os valores foram descritos na Tabela 3.

Tabela 3 - Valores utilizados para a avaliação do grau de concordância entre as variantes utilizando-se o índice *Kappa* por meio do programa IBM SPSS *Statistics*

Índice <i>Kappa</i>	Medida de Concordância
menor que zero	Ausente
0 a 0,2	Insignificante
0,2 a 0,4	Baixo
0,4 a 0,6	Moderado
0,6 a 0,8	Bom
0,8 a 1,0	Muito bom

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Análise *in silico* de reações cruzadas entre *Pestivirus* e *Hepacivirus*

Pela análise *in silico* foi constatado que não houve grau de identidade expresso em porcentagem (%) entre os membros do *Pestivirus* e *Hepacivirus* humano, no entanto, foi possível verificar o alinhamento entre os membros do mesmo gênero *Pestivirus* A, B, H e o *Hepacivirus* bovino, demonstrando, desta forma a necessidade de análise para seleção de marcadores específicos para o desenvolvimento de kits diagnósticos com o propósito de diagnóstico molecular.

#### 5.1.1. Análise *in silico* dos *Primers*

Os *primers* utilizados neste trabalho foram analisados pelo Nucleotide BLAST: Basic Local Alignment Search Tool, visando as sequências de alta similaridade (Megablast).

Ao analisar conjunto de *primers* e sonda recomendados pela OMSA: *Primer Reverse* V326, a sonda TQ-Pest e o *primer Forward* F190 descritos respectivamente por Hoffman et al. (2006). Utilizando-se BLAST, verificou-se que a sequência do *primer* 190F foi capaz de identificar os *Pestivirus* A, B e H com cobertura de 94,44% e identidade de 90% e E-value 65. O *primer reverse* V326 apresentou 100% de identidade e cobertura para os vírus *Pestivirus* A, C, H e I com E-value de 0,31, enquanto que a Probe TQPest demonstrou cobertura de 90,91% e identidade de 100% e E-value de 4,1 para os *Pestivirus* A, B, C, D e I.

Os oligonucleotídeos descritos por Bhudevi; Weinstock (2001), *primer* 103F conferiu cobertura e identidade de 100% e E-value de 0,31 para os *Pestivirus* A, B e C; o *primer* 176R identificou apenas o *Pestivirus* A com 100% de cobertura e identidade com E-value de 0,31; BVDV1 145 identificou apenas o *Pestivirus* A com 100% de cobertura e E-value de 2e-04, já o *primer* 147 BVDV2 identificou o *Pestivirus* A, B e C com 100% de cobertura e identidade com E-value de 0,003 a 0,63.

Para o diagnóstico do *Hepacivirus*, foram selecionados oligonucleotídeos descritos por Baechlein et al. (2015), baseados no gene NS3. Ao analisar as sequências no BLAST, o *primer* BovHepV-F permitiu verificar 100% de cobertura e identidade, com E-value de 1,2 para *Hepacivirus* Bovino e *Hepacivirus* N. Identificaram-se ainda identidades de 100% para *Pseudomonas* sp., enquanto que para ACM7 cromossomo e *Escherichia coli* a cobertura foi de 85 e 80%, respectivamente. O *primer* BovHepV - R apresentou identidade de 100% para o *Hepacivirus* Bovino e *Hepacivirus* N e cobertura de 95-100% e E-value de 1,2 e 4,9, esse



mesmo *primer* identificou com identidade de 100% a *Pseudomonas* sp, o *Haemonchus contortus* e vírus Hepatitis C, com cobertura de 90%, 85 e 85, respectivamente. A análise da Probe BovHepV permitiu verificar identidade de 100% para o *Hepacivirus* bovino e *Hepacivirus* N de 96,43 a 100% e valores de cobertura entre 96 e 100% e E-values variando entre 0,015 e 6e-0,5.

A análise das sequências do Kit comercial Virotype<sup>®</sup> BVDV RT-PCR (Indical Bioscience) para diagnóstico da BVD não foi realizada pois não são disponibilizadas pelo fabricante.

## 5.2. Resultados do projeto piloto

### 5.2.1. RT-PCR convencional (WEINSTOCK et al., 2001)

Durante a fase de projeto piloto deste trabalho, foram analisadas 683 amostras de sangue pela RT-PCR convencional, sendo identificadas sete amostras positivas para BVDV no gel de agarose a 1,5%.

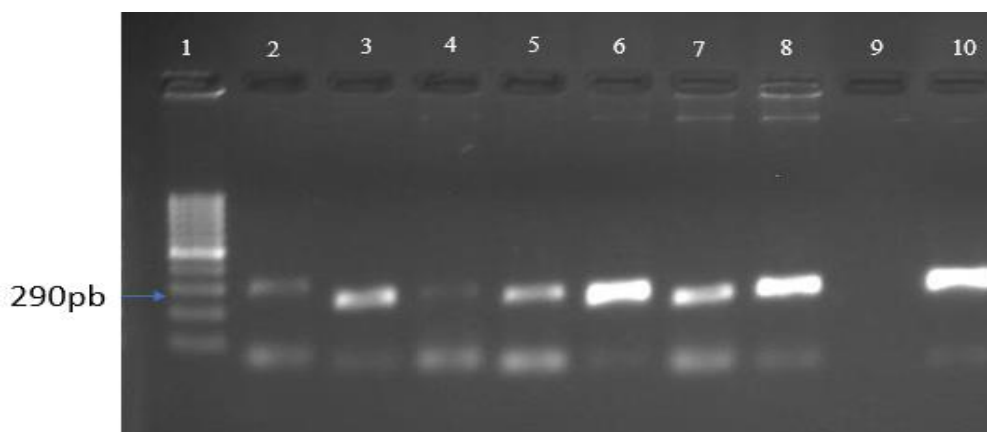


Figura 7 - Eletroforese da RT-PCR para BVDV utilizando o set de primers da região 5'UTR para BVDV. Nas canaletas (1) Marcador 100 pares de base (pb), (2) LVB17/EXP 11.946, (3) LVB17/EXP12.078, (4) LVB17/EXP12.080, (5) LVB17/EXP12.083, (6) LVB17/EXP11.986, (7) LVB17/EXP11.979, (8) LVB17/EXP 3432, (9) CN, (10) Controle positivo BVDV NADL.

Na figura 7, são observadas as canaletas de 1 a 10 onde estão distribuídas as amostras (1) Marcador 100 pares de base (pb), (2) LVB17/EXP 11.946, (3) LVB17/EXP12.078, (4) LVB17/EXP12.080, (5) LVB17/EXP12.083, (6) LVB17/EXP11.986, (7) LVB17/EXP11.979, (8) LVB17/EXP 3432, (9) CN, (10) Controle positivo BVDV NADL

### 5.2.2. ELISA-Ag BVDV - IDEXX<sup>®</sup>

As amostras consideradas positivas na RT-PCR convencional foram analisadas no ensaio imunoenzimático ELISA-Ag BVDV - IDEXX<sup>®</sup>, das quais seis apresentaram-se

negativas e uma amostra (LVB17/EXP 3432) foi considerada positiva ao ELISA para BVDV-Ag IDEXX®.

### **5.2.3. Análises pelo método de Sanger**

Conforme a Figura 7, após a identificação das amostras positivas, foi realizado o sequenciamento parcial pelo método de Sanger, utilizando os *primers* que codificam a região 5'UTR, tendo sido verificado que as amostras um a seis (LVB17/EXP 11.946, LVB17/EXP12.078, LVB17/EXP12.080, LVB17/EXP12.083, LVB17/EXP11.986 e LVB17/EXP11.979)) apresentaram 96,9% de identidade com o BovHepV e a amostra sete (LVB17/EXP 3432) apresentou 99% de identidade com o BVDV-3 (HoBi-*like*), utilizando-se a plataforma Blastn. Os resultados obtidos no sequenciamento parcial mostraram a importância da seleção de oligonucleotídeos para uso diagnóstico. Dessa forma, a recomendação da OMSA para aplicar a RT-qPCR na rotina diagnóstica mostra que essa técnica melhora a especificidade do teste, visto que o anelamento com a sonda marcada somente ocorrerá após o pareamento da sequência específica.

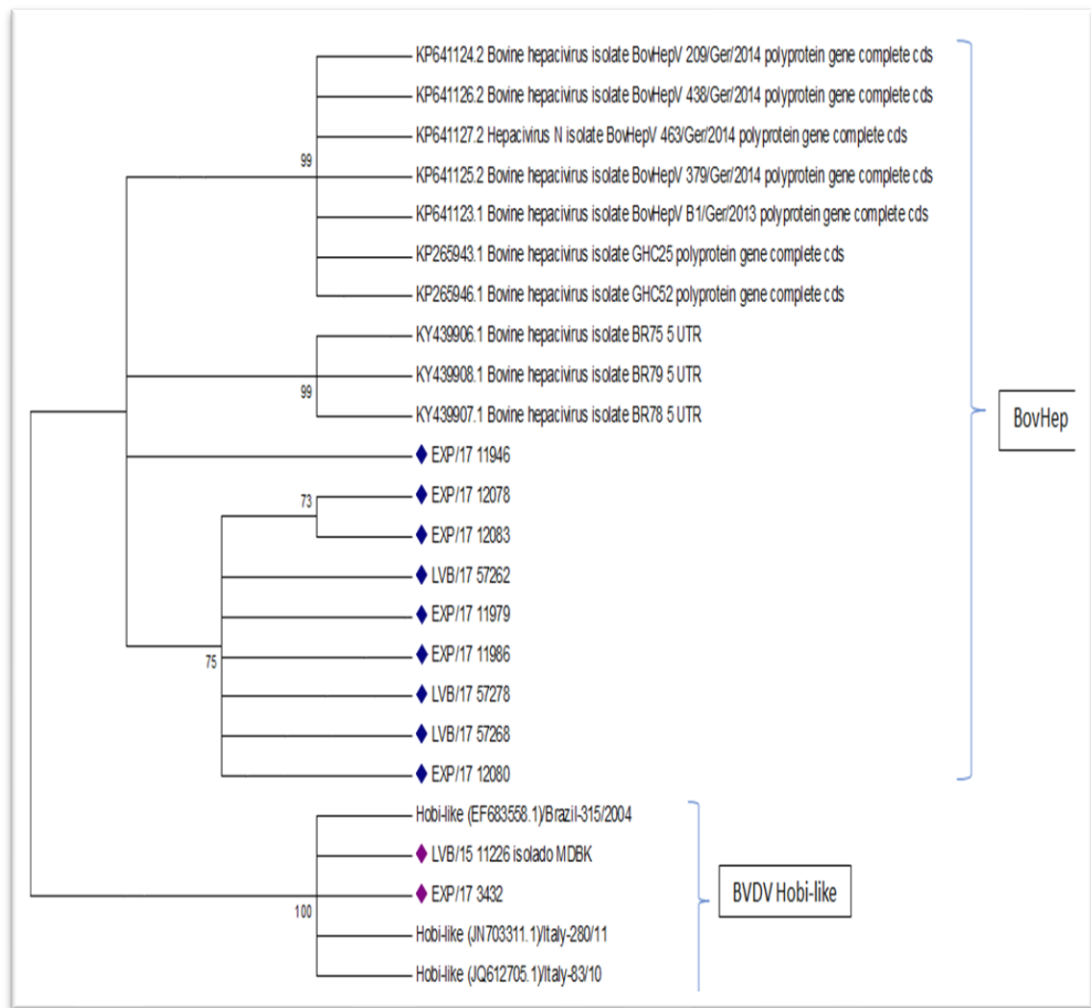


Figura 8 - Árvore filogenética da família *Flaviviridae*: *Pestivirus* H e *Hepacivirus* bovino pelo método de máxima verossimilhança, Bootstrap 1000 replicatas, modelo Tamura Nei, para as amostras identificadas por (◆) LVB17/EXP 11.946, LVB17/EXP12.078, LVB17/EXP12.080, LVB17/EXP12.083, LVB17/EXP11.986, LVB17/EXP11.979 são *Hepacivirus* bovino; e a amostras (◆) LVB17/EXP 3432 foi identificada como *Hobi-like* vírus.

Na análise filogenética (Figura 8) baseado no gene 5'UTR pelo Método de Máxima Verossimilhança, 1000 replicatas e modelo Tamura-Nei, foi possível observar que as amostras (LVB17/EXP 11.946), (LVB17/EXP12.078), (LVB17/EXP12.080), (LVB17/EXP12.083), (LVB17/EXP11.986) e (LVB17/EXP11.979) demonstraram proximidade de identidade e formaram um único cluster com membros do gênero *Hepacivirus* bovino (BovHepV), enquanto que a amostras LVB17/EXP 3432 foi identificada como *Pestivirus* H e formou um único cluster com as amostras Hobi-like (EF683558.1) Brazil-315/2004, do isolado LVB/15 11.226 do LVB-IB (dados não publicados), Hobi Like (JN703311.1) e Hobi Like (JQ612705.1), sendo essas duas últimas de origem italiana, evidenciando a relação de proximidade de identidade existente entre as estirpes.

### 5.3. RT-qPCR para BVDV

#### 5.3.1. Sensibilidade analítica

Os testes para avaliar a sensibilidade analítica para os diagnósticos para BVD por meio da RT-qPCR foram conduzidos utilizando-se as estirpes padrões BVDV-1 NADL e o BVDV-2 e titulados (item 4.6.4. Tabelas 1 e 2, respectivamente) para o conjunto de oligonucleotídeos recomendados pela OMSA para o BVDV-1 NADL e para o BVDV-2 a sensibilidade foi de 10 TCID<sub>50</sub>/mL. A análise da sensibilidade analítica para as estirpes avaliadas utilizando-se os oligonucleotídeos descritos por Bhudevi; Weinstock (2001) foi de 100 TCID<sub>50</sub>/mL para o BVDV-1 NADL, enquanto que para o BVDV-2 foi de 10 TCID<sub>50</sub>/mL; já o Kit comercial Virotype® BVDV RT-PCR (Indical Bioscience) apresentou sensibilidade de 10 TCID<sub>50</sub>/mL para o BVDV-1 NADL (semelhante aos resultados obtidos para os oligonucleotídeos recomendados pela OMSA) e para o BVDV-2 a sensibilidade foi de 1 TCID<sub>50</sub>/mL.

##### 5.3.1.1. RT-qPCR para BVDV recomendados pela OMSA descritos por Hoffman et al. (2006)

A padronização da curva com o conjunto de *primers* e sondas recomendados pela OMSA, foi realizada partindo-se dos vírus padrão BVDV-1 NADL de título de 10<sup>5,6</sup> TCID<sub>50</sub>/mL e o BVDV-2 de título de 10<sup>4,8</sup> TCID<sub>50</sub>/mL. Para tanto, foram realizadas em diluições seriadas na base 10 (Tabela 1 e 2), as quais permitiram a obtenção de resultados das triplicatas com Cts positivos nas diluições de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-4</sup> (100.000 a 100 cópias infectantes /mL), descritos na Tabela 4, para o BVDV-1 NADL, e dos resultados em triplicatas nas diluições de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-4</sup> (10.000 a 10 cópias infectantes/ mL), Tabela 5, para o BVDV-2.

##### 5.3.1.1.1. BVDV - 1 NADL

A curva padrão e o limiar de detecção (Figura 15) para o conjunto de *primers* e sonda recomendados pela OMSA foram realizadas com o vírus padrão BVDV-1 NADL título de 10<sup>5,6</sup> TCID<sub>50</sub>/mL em diluição seriada na base 10, a qual permitiu a obtenção de resultados em triplicatas de Ct positivos nas diluições de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-4</sup> (Tabela 4).

Tabela 4 - Resultados valores de Ct, em triplicatas, para as diluições virais na base 10 do vírus padrão BVDV-1 NADL em triplicatas utilizando-se o conjunto com Oligonucleotídeos recomendados pela OMSA, sob o filtro de leitura FAM (465-510)

Diluição	TCID <sub>50</sub> /mL	Valor de Ct1	Valor de Ct2	Valor de Ct3	Média de valores de Ct
10 <sup>-1</sup>	10 <sup>5,6</sup>	21,38	22,26	22,63	22,09
10 <sup>-2</sup>	10 <sup>4,6</sup>	25,78	25,84	25,73	25,78
10 <sup>-3</sup>	10 <sup>3,6</sup>	28,92	28,82	28,92	28,89
10 <sup>-4</sup>	10 <sup>2,6</sup>	32,47	32,65	31,76	32,29

Ao analisar a tabela 4 foi possível observar a variação da média dos valores de Ct entre 22,09 e 32,29.

Na Figura 9, são apresentadas as curvas de amplificação para os oligonucleotídeos recomendados pela OMSA frente ao vírus padrão BVDV-1 NADL de título 10<sup>5,6</sup> TCID<sub>50</sub>/mL (diluição do vírus 10<sup>-1</sup>), nas diluições de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-5</sup> TCID<sub>50</sub>/mL, e controle negativo. A curva padrão foi gerada a partir de dados do gráfico de amplificação. Valores da reação: Erro = 0,0970; Eficiência = 2,041; Slope = -3,227.

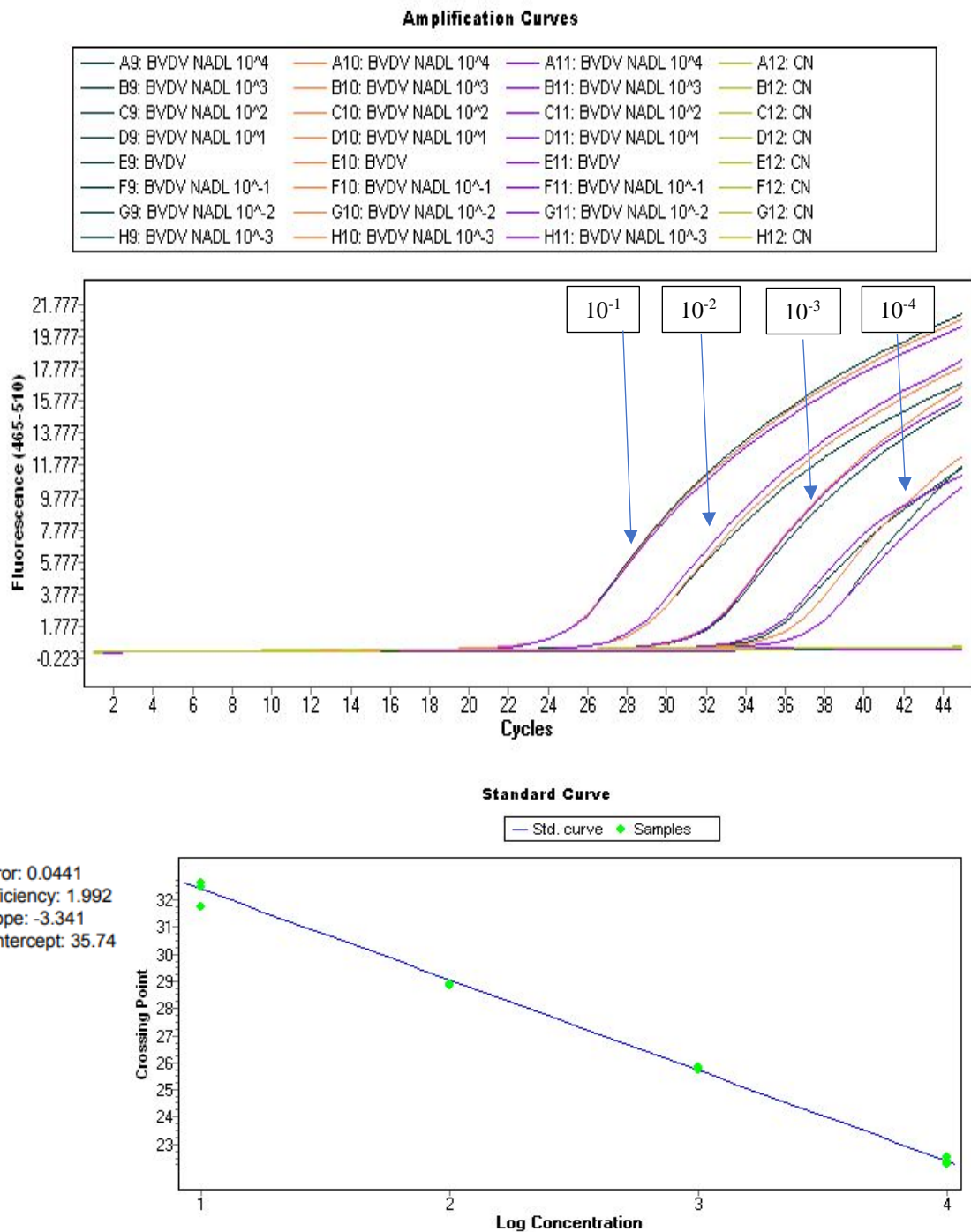


Figura 9 – Curva Padrão de amplificação por meio da RT-qPCR com oligonucleotídeos recomendados pela OMSA para o BVDV-1 NADL.

A análise da curva permitiu determinar a sensibilidade do teste com a utilização dos pares de *primers* recomendados pela OMSA, na diluição seriada em base 10, conforme demonstrado na Tabela 4 e Figura 9, o limiar de detecção de  $10^{2.6}$  TCID<sub>50</sub>/mL de BVDV-1 NADL por mL.

### 5.3.1.1.2. BVDV - 2

A obtenção da curva padrão (Figura 10) para o conjunto de *primers* e sondas recomendados pela OMSA foi realizada com o vírus padrão BVDV-2 de título de  $10^{4,8}$  TCID<sub>50</sub>/mL, em diluição seriada na base 10, a qual permitiu a obtenção dos resultados em triplicatas de Ct positivos nas diluições de  $10^{-1}$  a  $10^{-4}$  (Tabela 5).

Tabela 5– Resultados valores de Ct para as diluições virais na base 10 do vírus padrão BVDV-2 em triplicatas, utilizando-se o conjunto com Oligonucleotídeos recomendados pela OMSA sob o filtro de leitura FAM (465-510)

Diluição	TCID <sub>50</sub> /mL	Valor de Ct1	Valor de Ct2	Valor de Ct3	Média de valores de Ct
$10^{-1}$	$10^{4,8}$	22,38	22,26	22,53	21,35
$10^{-2}$	$10^{3,8}$	25,78	25,84	25,73	24,66
$10^{-3}$	$10^{2,8}$	29,16	28,82	29,09	28,45
$10^{-4}$	$10^{1,8}$	32,47	32,62	32,50	31,76

Ao analisar a Tabela 5 foi possível determinar a variação da média de valores de Ct entre 21,35 a 31,76.

Na Figura 10 estão representadas as curvas de amplificação utilizando-se os oligonucleotídeos recomendados pela OMSA para o vírus padrão BVDV-2 de título  $10^{4,8}$  TCID<sub>50</sub>/mL, nas diluições de  $10^{-1}$  a  $10^{-4}$  TCID<sub>50</sub>/mL, e controle negativo. A curva padrão foi gerada a partir de dados do gráfico de amplificação. Valores da reação: Erro = 0,00472; Eficiência = 1,966; Slope = -3,331.

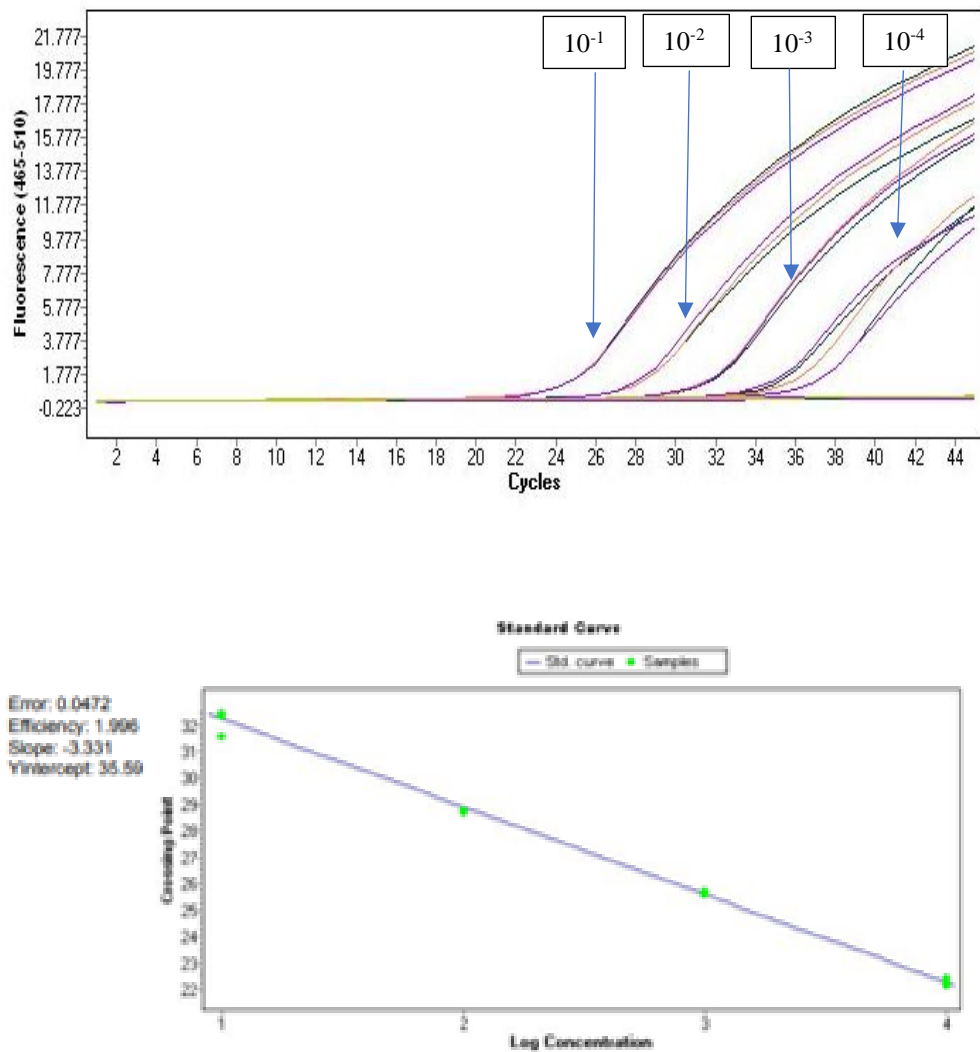


Figura 10 – Curva padrão de amplificação por meio da RT-qPCR, utilizando-se o conjunto de *primers* recomendados pela OMSA frente ao vírus padrão BVDV-2.

A análise da curva permitiu avaliar a sensibilidade do teste utilizando-se os pares de *primers* e sondas recomendados pela OMSA, para os vírus BVDV-2, na diluição seriada em base 10, conforme demonstrando na Tabela 5 e Figura 10, o limiar de detecção de  $10^{1,8}$ TCID<sub>50</sub>/mL para BVDV-2.

O limiar de detecção da prova para o conjunto de *primers* recomendados pela OMSA foi de  $10^{2,6}$  TCID<sub>50</sub>/mL e  $10^{1,8}$ TCID<sub>50</sub>/mL, respectivamente para o BVDV-1 e BVDV-2 (Tabelas 4 e 5).



### 5.3.1.2. RT-qPCR diagnóstico diferencial entre BVDV 1 e 2 descritos por Bhudevi; Weinstock (2001)

A padronização da curva para os oligonucleotídeos descritos por Bhudevi; Weinstock (2001), foi realizada partindo-se dos vírus padrão BVDV-1 NADL de título de  $10^{5,6}$  TCID<sub>50</sub>/mL e o BVDV-2 de título de  $10^{4,8}$  TCID<sub>50</sub>/mL. Para tanto, foram realizadas as diluições seriadas na base 10 (Tabela 1 e 2), utilizadas para a obtenção dos valores de resultados das triplicatas para valores de Cts positivos.

#### 5.3.2.2.1. BVDV – 1 NADL

A padronização e obtenção da curva padrão e detecção do limiar de sensibilidade (Figura 11) para o conjunto com Oligonucleotídeos descritos por Bhudevi; Weinstock (2001), foi realizada com o vírus padrão BVDV-1 NADAL de título de  $10^{5,6}$  TCID<sub>50</sub>/mL em diluição seriada na base 10, ao qual permitiu a obtenção de resultados em triplicatas de Ct positivos nas diluições de  $10^{-1}$  a  $10^{-4}$  (Tabela 6).

Tabela 6 – Resultados valores de Ct para as diluições virais na base 10 do vírus padrão BVDV-1 NADL de título  $10^{5,6}$  TCID<sub>50</sub>/mL em triplicatas utilizando-se o conjunto com oligonucleotídeos descritos por Bhudevi; Weinstock (2001) sob o filtro de leitura FAM (465-510)

Diluição	TCID <sub>50</sub> /mL	Valor de Ct1	Valor de Ct2	Valor de Ct3	Média de valores de Ct
$10^{-1}$	$10^{5,6}$	25,43	25,51	26,64	25,86
$10^{-2}$	$10^{4,6}$	28,62	28,60	28,53	28,58
$10^{-3}$	$10^{3,6}$	31,34	31,55	31,48	31,46
$10^{-4}$	$10^{2,6}$	34,72	34,86	34,96	34,84

Na Figura 11, foram representadas as curvas de amplificação para o conjunto de oligonucleotídeos descritos por Bhudevi; Weinstock (2001) para o vírus padrão BVDV-1 NADL de título  $10^{5,6}$  TCID<sub>50</sub>/mL, nas diluições de  $10^{-1}$  a  $10^{-5}$  TCID<sub>50</sub>/100 $\mu$ L, e controle negativo. A curva padrão foi gerada a partir de dados do gráfico de amplificação. Valores da reação: Erro = 0,0544; Eficiência = 2,105; Slope = -3,093.

Ao analisar a Tabela 6 foi possível determinar a variação da média de valores de Ct entre 25,86 e 34,84.

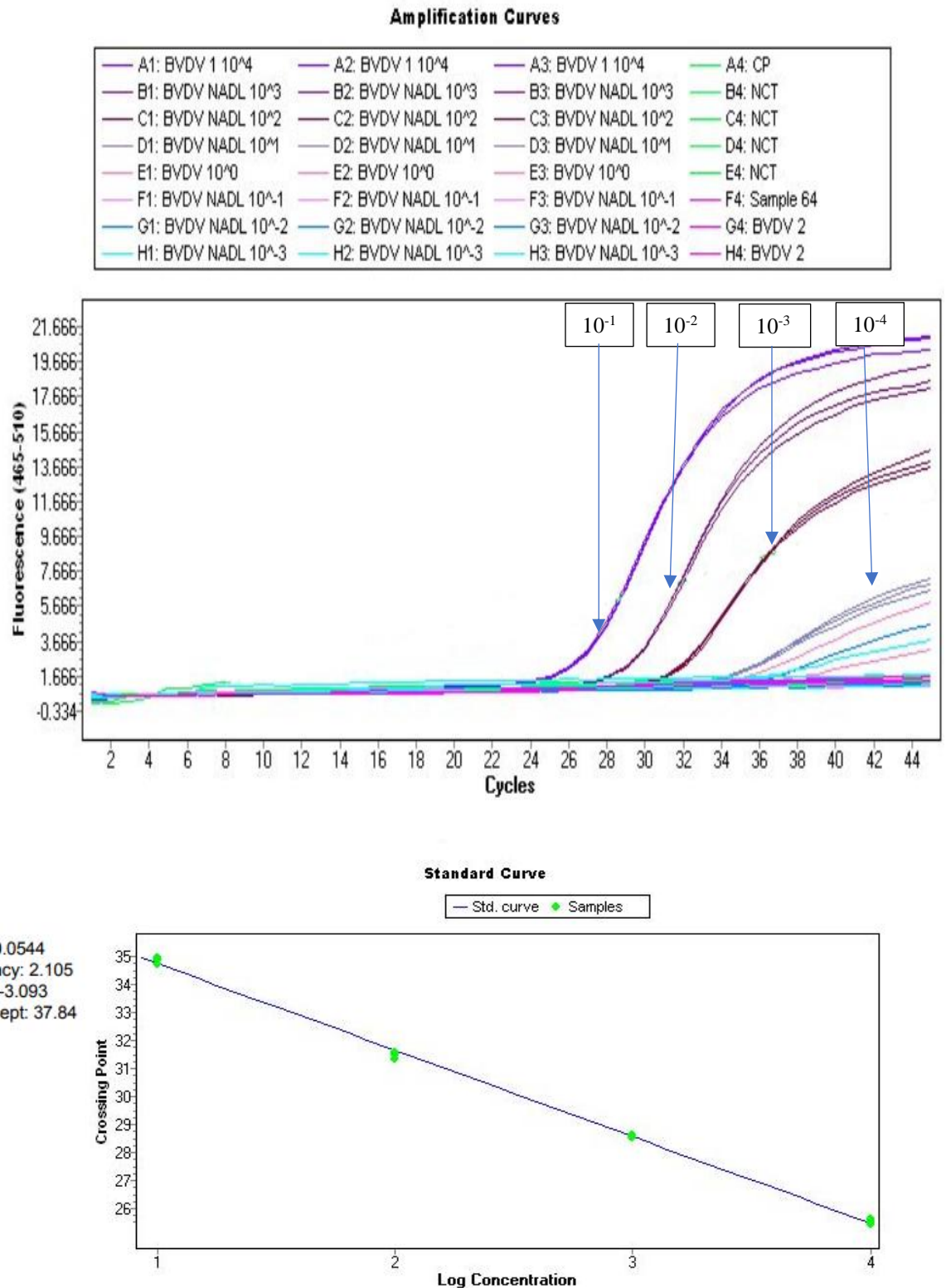


Figura 11 – Curva Padrão de amplificação por meio da RT-qPCR, utilizando-se o conjunto com Oligonucleotídeos descritos por Bhudevi; Weinstock (2001) frente ao vírus padrão BVDV-1 NADL, sob o filtro de leitura FAM (465-510).

O limiar de detecção da prova utilizando-se o conjunto com Oligonucleotídeos descritos por Bhudevi; Weinstock (2001) para o BVDV-1 NADL foi de  $10^{2.6}$ TCID<sub>50</sub>/mL.

### 5.3.2.2.2. BVDV-2

A obtenção da curva padrão (Figura 12) para o conjunto com Oligonucleotídeos descritos por Bhudevi; Weinstock (2001) foi realizada com o vírus padrão BVDV-2 de título de  $10^{4,8}$  TCID<sub>50</sub>/mL em diluição seriada na base 10, ao qual permitiu a obtenção de resultados em triplicatas de Ct positivos nas diluições de  $10^{-1}$  a  $10^{-4}$  (Tabela 7).

Tabela 7 – Resultados valores de Ct para as diluições virais na base 10 do vírus padrão BVDV-2 em triplicatas utilizando-se o conjunto com Oligonucleotídeos descritos por Bhudevi; Weinstock (2001), sob o filtro de leitura VIC (533-580)

Diluição	TCID <sub>50</sub> /50μL	Valor de Ct1	Valor de Ct2	Valor de Ct3	Média de valores de Ct
$10^{-1}$	$10^{4,8}$	24,15	23,87	23,64	23,89
$10^{-2}$	$10^{3,8}$	26,41	26,83	27,31	26,85
$10^{-3}$	$10^{2,8}$	29,60	29,35	29,96	29,63
$10^{-4}$	$10^{1,8}$	32,64	32,53	32,43	32,53

Ao analisar a Tabela 7 foi possível determinar a variação da média de valores de Ct entre 23,89 e 32,53.

Na Figura 12, foram representadas as curvas de amplificação para o conjunto de oligonucleotídeos descritos por Bhudevi; Weinstock (2001) para o vírus padrão BVDV-2 de título  $10^{4,8}$  TCID<sub>50</sub>/mL, nas diluições de  $10^{-1}$  a  $10^{-4}$  TCID<sub>50</sub>/mL, e controle negativo. A curva padrão foi gerada a partir de dados do gráfico de amplificação. Valores da reação: Erro = 0,0196; Eficiência = 2,228; Slope = -2,874.

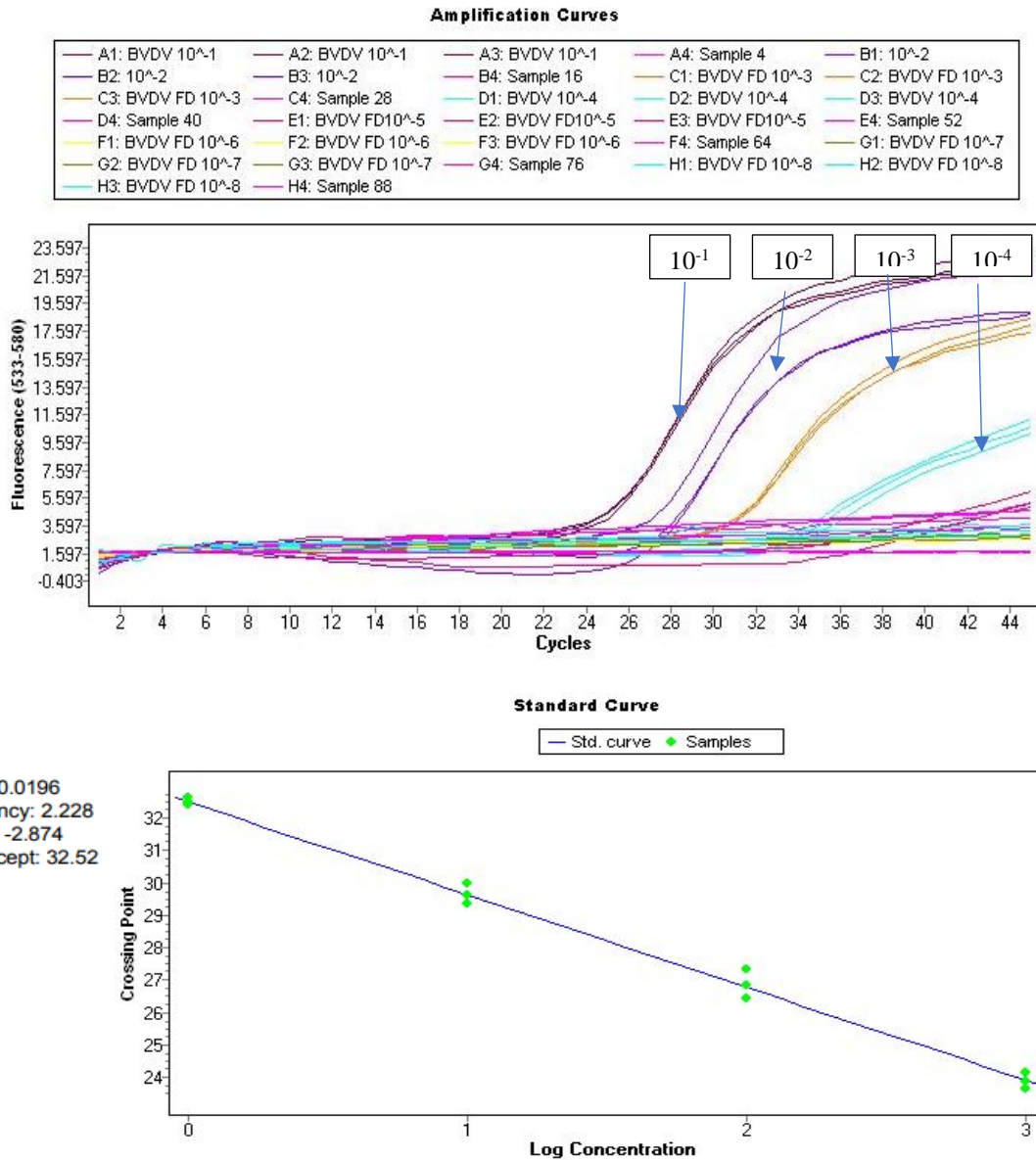


Figura 12 – Curva Padrão de amplificação por meio da RT-qPCR, utilizando-se o conjunto de oligonucleotídeos descritos por Bhudevi; Weinstock (2001) frente ao vírus padrão BVDV-2, sob o filtro de leitura VIC (533-580).

A análise da curva permitiu avaliar a sensibilidade do teste, utilizando-se o conjunto de *primers* e sondas descritos por Bhudevi; Weinstock (2001) para o vírus BVDV-2 na diluição seriada em base 10, conforme demonstrando na Tabela 7 e Figura 12, o limiar de detecção foi de  $10^{1,8}$  TCID<sub>50</sub>/mL para BVDV-2 por mL.

Os valores do limiar de detecção da prova para o conjunto de *primers* recomendados pela Bhudevi; Weinstock (2001) foi de  $10^{2,6}$  TCID<sub>50</sub>/mL para o BVDV-1 NADL e  $10^{1,8}$  TCID<sub>50</sub>/mL para o BVDV-2 (Tabelas 6 e 7).

### 5.3.3.1. RT-qPCR com Kit comercial Virotype® BVDV RT-PCR (Indical Bioscience)

Inicialmente, foram utilizadas para a realização do limiar de detecção do Kit Comercial Virotype® BVDV RT-PCR e verificação das curvas de amplificação para os vírus BVDV-1 NADL e o BVDV-2, as amostras previamente tituladas conforme as Tabelas 3 e 4, respectivamente.

#### 5.3.3.1.1. BVDV-1 NADL

A obtenção da curva padrão (Figura 13) utilizando-se o Kit Comercial Virotype® BVDV RT-PCR foi realizada com o vírus padrão BVDV-1 NADL de título de  $10^{5,6}$  TCID<sub>50</sub>/mL em diluição seriada na base 10, ao qual permitiu a obtenção de resultados em triplicatas de Ct positivos nas diluições de  $10^{-1}$  a  $10^{-5}$  (Tabela 8).

Tabela 8 - Resultados de valores de Ct para as diluições virais na base 10 do vírus padrão BVDV-1 NADL em triplicatas para BVDV com Kit Comercial Virotype® BVDV RT-PCR, sob o filtro de leitura FAM (465-510)

Diluição	TCID <sub>50</sub> /mL	Valor de Ct1	Valor de Ct2	Valor de Ct3	Média de valores de Ct
$10^{-1}$	$10^{5,6}$	20,11	20,24	20,33	20,23
$10^{-2}$	$10^{4,6}$	23,33	23,58	23,70	23,54
$10^{-3}$	$10^{3,6}$	27,04	26,86	26,89	26,93
$10^{-4}$	$10^{2,6}$	30,58	30,14	30,07	30,26
$10^{-5}$	$10^{1,6}$	33,02	33,09	33,17	33,09

Ao analisar a tabela 8 foi possível determinar a variação da média de valores de Ct entre 20,23 e 33,09.

Na Figura 13 foram representadas as curvas de amplificação para o Kit Virotype (Fluoróforo FAM) para o vírus padrão BVDV-1 NADL de Título 5,6 em diluições seriadas na base 10. Valores da reação: Erro = 0,0386; Eficiência = 2,034; Slope = -3,242.

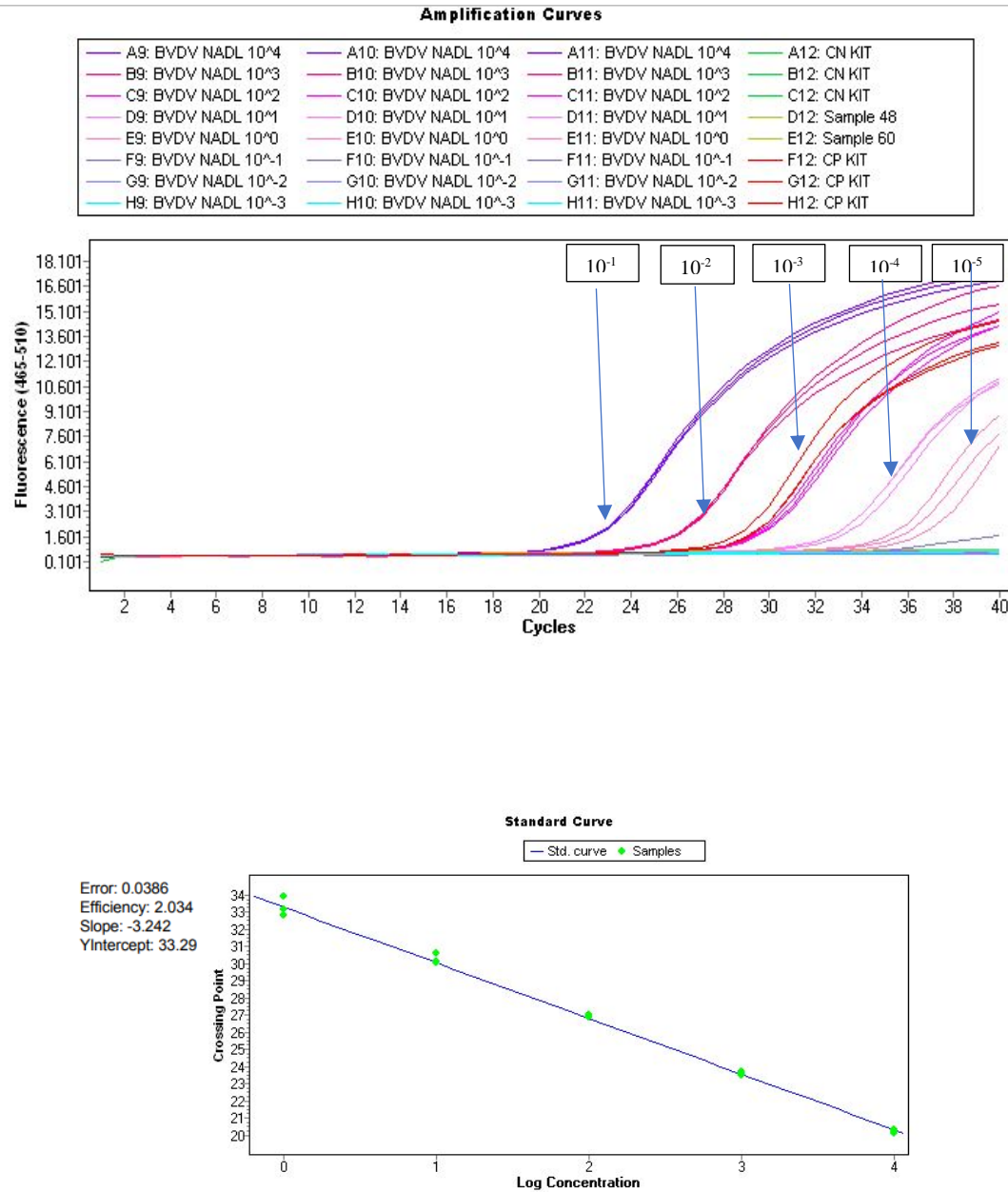


Figura 13 - Curvas de amplificação realizadas para o KIT Virotype utilizando-se o vírus BVDV-1 NADL, sob filtro de leitura FAM (465-510).

As curvas produzidas (Figura 14) sob o filtro de leitura HEX (533-580), para o Kit Comercial Virotype<sup>®</sup> BVDV RT-PCR utilizando-se o vírus BVDV-1 NADL de Título 5,6 em diluições seriadas na base 10, permitiu observar a amplificação do material genético em todas as diluições.

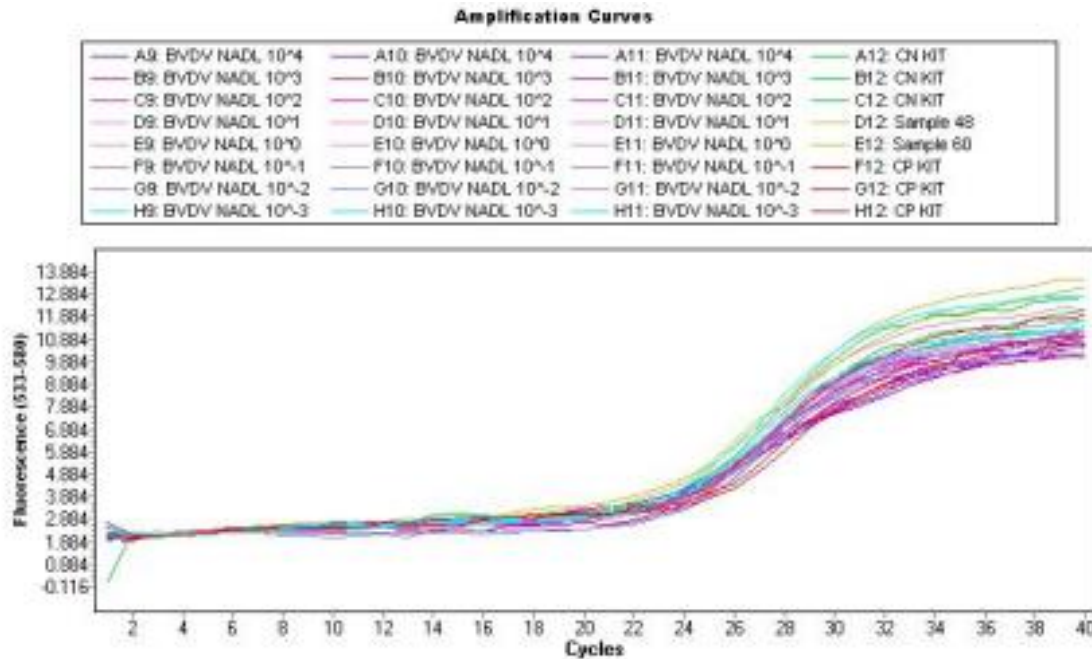


Figura 14 - Curvas de amplificação do controle endógeno para o Kit Comercial Virotype® BVDV RT-PCR sob o filtro de leitura HEX (533-580).

### 5.3.3.1.2. BVDV-2

A obtenção da curva padrão (Figura 15) utilizando-se o Kit Comercial Virotype® BVDV RT-PCR, para o vírus padrão BVDV-2 de título de  $10^{4,8}$  TCID<sub>50</sub>/mL em diluição seriada na base 10 (Tabela 2), permitiu a obtenção de resultados em triplicatas de Ct positivos nas diluições de  $10^{-1}$  a  $10^{-5}$  (Tabela 9).

Tabela 9 - Resultados de valor de Ct para as diluições em base 10 para o vírus BVDV-2 de título de  $10^{4,8}$ TCID<sub>50</sub>/mL nas triplicatas para BVDV-2 com Kit Comercial Virotype® BVDV RT-PCR, sob o filtro de leitura FAM (465-510)

Diluição	TCID50/mL	Valor de Ct1	Valor de Ct2	Valor de Ct3	Média de valores de Ct
$10^{-1}$	$10^{4,8}$	21,38	21,51	21,59	21,49
$10^{-2}$	$10^{3,8}$	23,86	23,89	23,99	23,91
$10^{-3}$	$10^{2,8}$	27,60	27,67	27,49	27,58
$10^{-4}$	$10^{1,8}$	30,76	30,77	30,58	30,70
$10^{-5}$	$10^{0,8}$	33,73	34,49	34,30	34,03

Ao analisar a tabela 9 foi possível determinar a variação da média de valores de Ct entre 21,49 e 34,03.

Na Figura 15, foram representadas as curvas de amplificação para o Kit Virotype (Fluoróforo FAM) para o vírus padrão BVDV-2 de Título 4,8 em diluições seriadas na base 10. Valores da reação: Erro; 0,135 Eficiência = 2,036; Slope= -3,238.

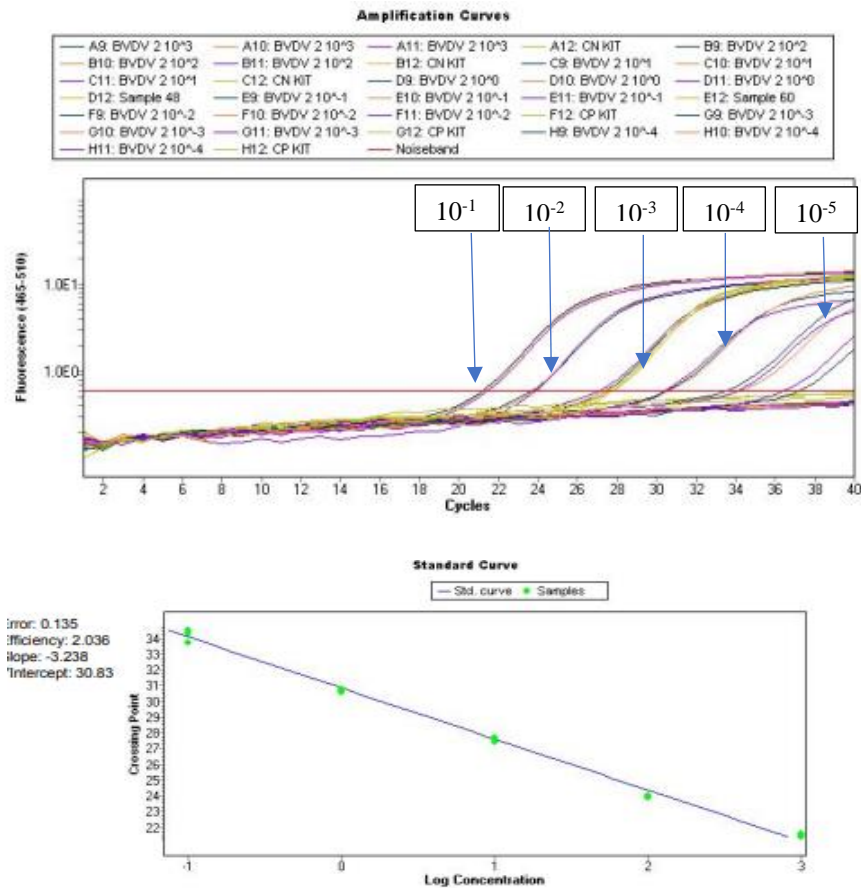


Figura 15 - Curvas de amplificação realizada para o Kit comercial Virotype® BVDV RT-PCR (Indical Bioscience) utilizando-se o vírus BVDV-2, sob o filtro de leitura FAM (465-510), de Título 4,8 em diluições seriadas na base 10. Valores da reação: Erro = 0,135 Eficiência = 2,036; Slope= -3,238.

O limiar de detecção da prova utilizando-se Kit Comercial Virotype® BVDV RT-PCR para o BVDV-1 NADL foi de  $10^{1.6}$  TCID<sub>50</sub>/mL e de  $10^{0.8}$  TCID<sub>50</sub>/mL para o BVDV-2, em que todas as amostras em triplicata foram amplificadas (Tabelas 8 e 9).

#### 5.4. RT-qPCR para *Hepacivirus* bovino (HepBovV)

As amostras identificadas no sequenciamento de Sanger para *Hepacivirus* bovino como positivas foram testadas em triplicata para os mix descritos nos quadros (15, 16, 17 e 18) com as diferentes concentrações de probe e não houve formação da curva de amplificação utilizando-se o conjunto de *primers* e sonda descritos por Baechlein et al. (2015).



## 5.5. Resultado das amostras de campo

### 5.5.1. RT-qPCR com oligonucleotídeos recomendados pela OMSA para triagem

As 9.026 amostras de sangue total bovino foram analisadas pela técnica de RT-qPCR, utilizando *primers* e sonda recomendados pela OMSA. A fim de reduzir custos e insumos, essas amostras foram primeiramente analisadas na forma de 1.805 *pools* de cinco amostras e identificaram-se 6,38% (115/1.805) *pools* positivos (Gráfico 1), os quais ao serem desmembrados possibilitaram determinar 1,43% (129/9.026) como amostras positivas para *Pestivirus* (Gráfico 2).

Gráfico 1 - Frequência de *pools* positivos para *Pestivirus* na RT-qPCR, utilizando-se os oligonucleotídeos recomendados pela OMSA.

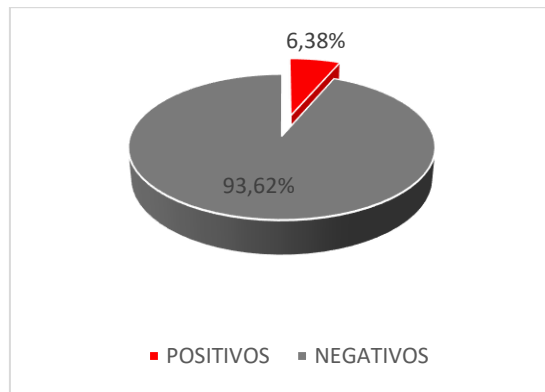
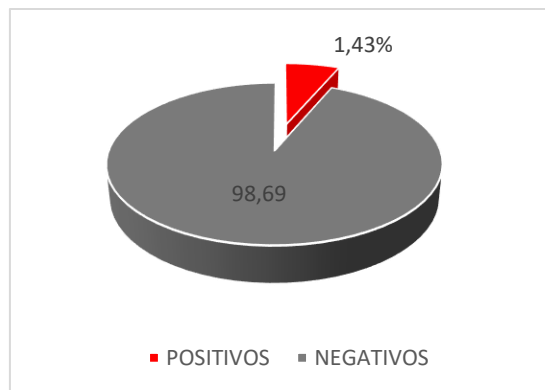


Gráfico 2 - Frequência de animais positivos para BVDV individualizados na RT-qPCR/OMSA.



### 5.5.1.1. Análise dos *pools* desmembrados

#### 5.5.1.1.1. RT-qPCR *Primers* recomendados pela OMSA

Os 115 *pools* positivos foram desmembrados resultando em 571 amostras e foram analisadas por meio da RT-qPCR utilizando os oligonucleotídeos recomendados pela OMSA descritos por Hoffman et al. (2006), o conjunto de *primers* e sondas descritos por Bhudevi; Weinstock, (2001) e o Kit comercial Virotype® BVDV RT-PCR (INDICAL BIOSIENGE).

Na análise das amostras desmembradas de sangue total bovino (Gráfico 3) utilizando-se o conjunto de *primers* e sonda recomendados pela OMSA, descritos por Hoffman et al. (2006) verificaram-se 129 amostras positivas e 442 negativas para BVDV (Apêndice B).

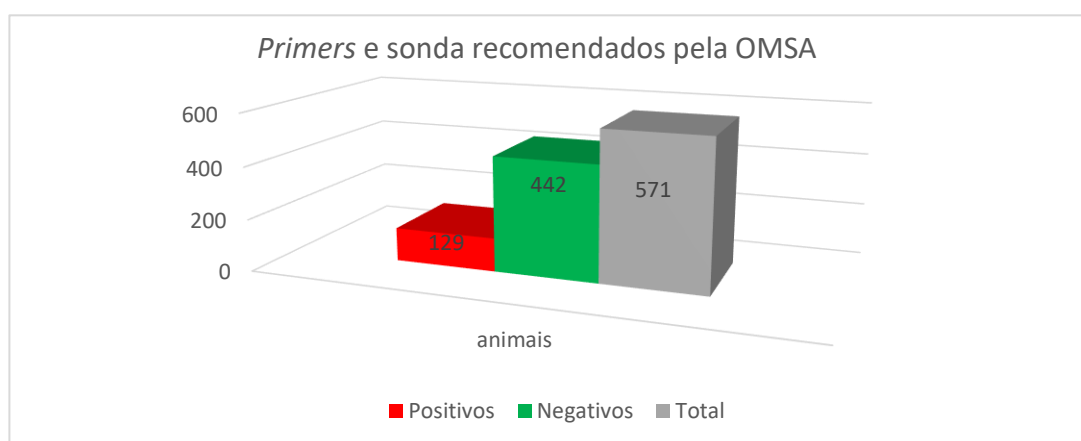


Gráfico 3 -Resultado do teste de RT-qPCR para os animais provenientes de *pools* positivos utilizando-se os oligonucleotídeos recomendados pela OMSA.

#### 5.5.1.1.2. *Primers* e sondas multiplex para diagnóstico diferencial de BVDV-1 e BVDV-2

Pela análise de RT-qPCR das amostras desmembradas para o diagnóstico do BVDV-1 e BVDV-2 com o set de *primers* e sondas descritos por Bhudevi; Weinstock (2001), foram identificadas 10 amostras positivas (Gráfico 4), sendo quatro amostras positivas para BVDV-1 (620, 842, 1235, 2652), duas amostras positivas BVDV-2 (2010, 8098) e quatro amostras (1181, 1507, 1525, 1850) para o BVDV-1 e 2 apresentando curvas de amplificação nos dois fluoróforos FAM e VIC (Apêndice B).

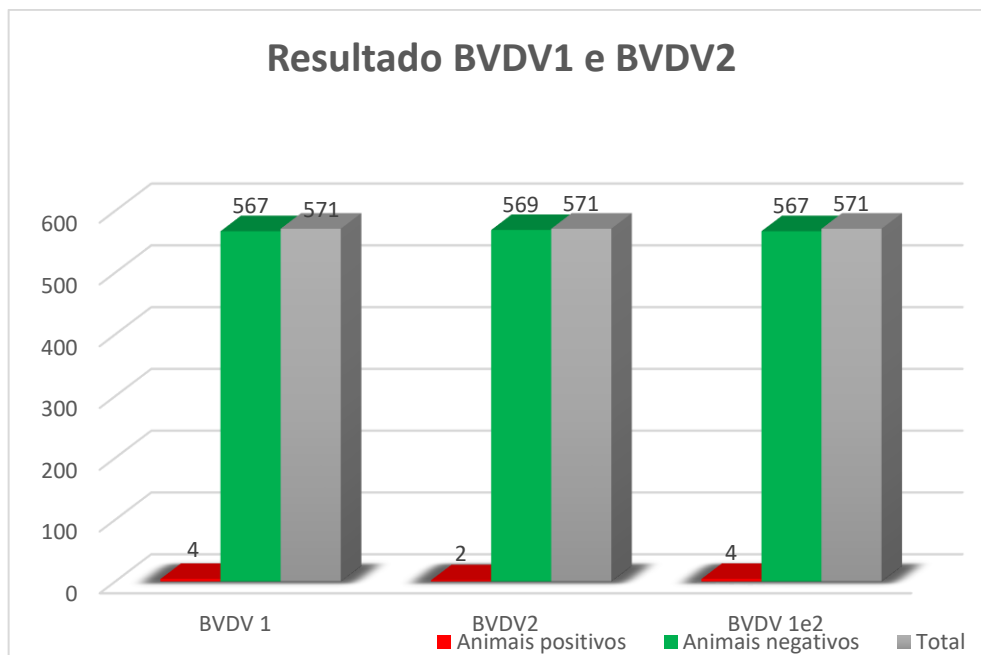


Gráfico 4 - Resultados dos testes de RT-qPCR para os animais provenientes de *pools* positivos, utilizando-se o conjunto de *primers* recomendados descritos por Bhudevji; Weinstock (2001).

#### 5.5.1.1.3. Kit comercial Virotype® BVDV RT-PCR (Indical Bioscience)

O Kit Comercial Virotype® BVDV RT-PCR foi utilizado para detecção de RNA viral do BVDV, a partir de 571 amostras desmembradas dos *pools* identificados como positivos pelo teste de triagem com o conjunto de *primers* e sonda recomendados pela OMSA.

Os resultados obtidos com a utilização do Kit comercial Virotype® BVDV RT-PCR (Indical Bioscience) identificaram 91 amostras positivas, 55 foram consideradas inconclusivas e 425 negativas (Gráfico 5; Apêndice B).

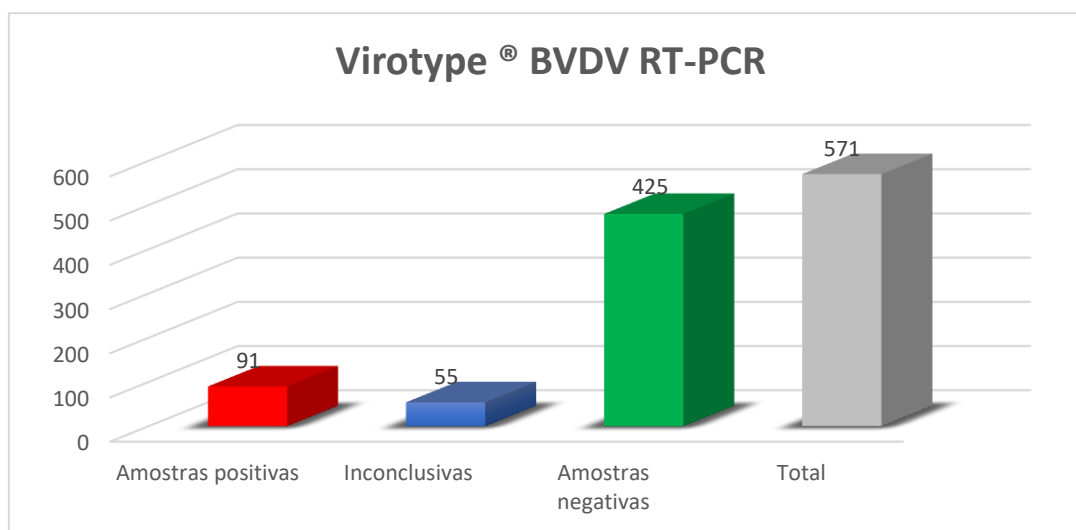


Gráfico 5 - Resultados dos testes de RT-qPCR para os animais provenientes de *pools* desmembrados com o Kit comercial Virotype® BVDV RT-PCR (Indical Bioscience).

### 5.6. Resultados ELISA-Ag BVDV - IDEXX®

Cento e vinte nove amostras de sangue total bovino, amostras de tecidos e órgãos de dois fetos e dois lotes de SFB comercial, consideradas positivas por meio da RT-qPCR com oligonucleotídeos recomendados pela OMSA, foram submetidas ao ensaio imunoenzimático ELISA-Ag BVDV - IDEXX®. Foram considerados positivos para BVDV, 60 amostras de sangue total, todas as amostras de órgãos fetais em suspensão e as duas partidas comerciais de soro fetal bovino.

### 5.7. Isolamento em cultivo celular

O isolamento viral foi realizado em cultivo de célula MDBK, para amostras identificadas como positivas para BVDV (sangue total bovino, soro fetal bovino comercial e amostras de tecidos de origem fetal).

Das 129 amostras de sangue total identificadas na RT-qPCR, seis amostras foram consideradas impróprias e não foram incluídas no isolamento por apresentarem-se hemolisadas e, portanto, citotóxicas às células. As amostras de sangue total e leucócitos que foram submetidas ao tratamento prévio com soro fetal bovino nas diluições (1:5, 1:10 e 1:20), com a finalidade de reduzir o risco de toxicidade às células, apresentaram-se negativas ao isolamento após três passagens.

Diante desses resultados foi proposta a utilização das amostras de sangue total sem diluição prévia, as quais 123 amostras foram mantidas por até três passagens consecutivas e observadas diariamente por sete dias. Nesse período, não foi evidenciado efeito citopatogênico. Entretanto, quatro amostras apresentaram-se impróprias durante o período de isolamento por apresentarem toxicidade às células e foram descartadas.

A reação de IPX foi realizada em isolados de 119 amostras de sangue total para confirmar o isolamento do BVDV.

### 5.8. Reação de Imunoperoxidase

A confirmação do isolamento viral nas células foi realizada pela IPX, na qual 15,97% (19/119) das amostras isoladas foram consideradas positivas e 84,03% (100/119) das amostras apresentaram-se negativas.

A IPX foi utilizada como método confirmatório de detecção de antígenos virais (BVDV) no interior do citoplasma das células pela coloração em vermelho-carmim. Na Figura 16 foram representadas a imagem da IPX positiva (A) e IPX negativa (B).

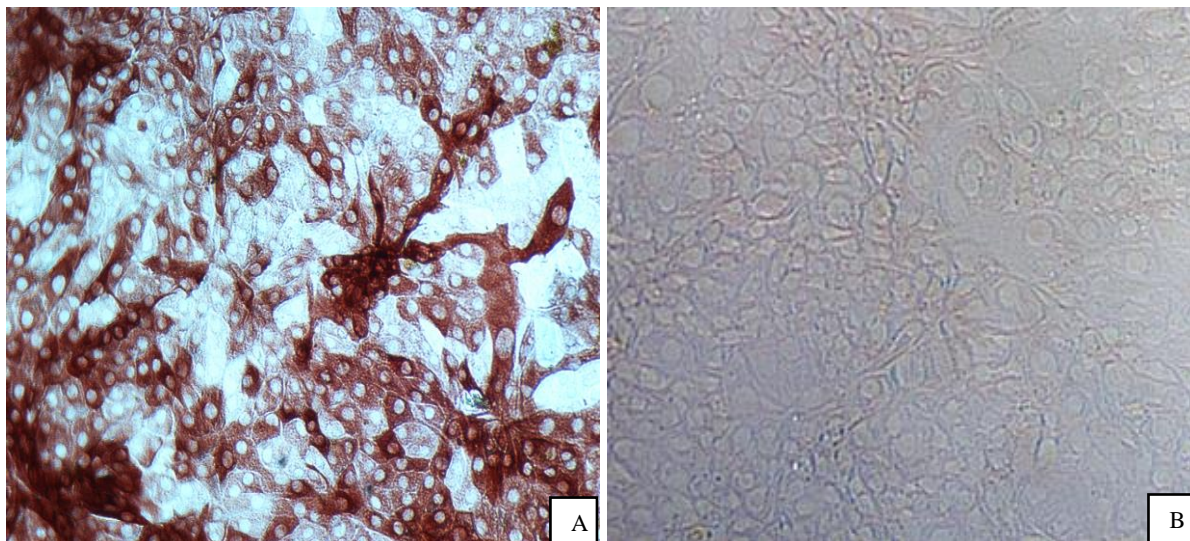


Figura 16 - Reação de IPX para a detecção de antígenos virais (BVDV) no interior do citoplasma das células corados em vermelho-carmim. (A). IPX positiva; (B) IPX negativa.

Os dois lotes de soro fetal bovino comercial (LVB 6284/20 e 6285/20) foram identificados como positivos pelo ELISA-Ag, mas quando foram submetidos ao isolamento em cultura de células MDBK até a 6a. passagem, demonstraram-se negativos ao teste de ELISA-Ag Idexx e na IPX, permitindo inferir que o processo de inativação viral utilizado pela indústria foi eficiente, por não apresentarem partículas viáveis ao isolamento viral em cultura de células.

#### 5.9. Resultados das amostras fetais

Os tecidos fetais provenientes de uma propriedade leiteira com problemas reprodutivos foram encaminhados para diagnóstico diferencial de doenças reprodutivas por meio do ELISA BVDV IDEXX laboratories® e RT-qPCR.

As amostras foram identificadas como (LVB 9929/20 e LVB9931/20) para o Feto 1 e as amostras (LVB 9930/20 e LVB 9932/20) referem-se ao Feto 2. As análises foram realizadas de forma concomitantemente com a finalidade de confirmação do isolamento viral.

No Quadro 20 foram apresentadas as amostras teciduais de dois fetos, suas respectivas identificações e os resultados de ELISA (BVDV Ag - IDEXX laboratories®) onde as amostras

foram identificadas por siglas (LT, *POOL*, COFI e SNC) onde LT (líquido torácico), *POOL* (fígado rim e timo), COFI (coração e fígado) e SNC (Sistema nervoso central)

### 5.9.1. ELISA BVDV IDEXX

No Quadro 18 foram apresentados os resultados das amostras teciduais dos dois fetos, suas respectivas identificações e os resultados de ELISA (BVDV Ag - IDEXX laboratories®).

Quadro 18 – Resultados dos valores de absorbância ELISA BVDV antígeno em amostras de fetos abortados e de isolados na 3<sup>a</sup>. passagem em célula MDBK

AMOSTRA	ID. AMOSTRA	MATRIZ	RESULTADO ELISA Ag			
			Susp. de tecidos Fetais		Isolamento	
			D.O.	Resultado	D.O.	Resultado
FETO 1	LVB9929/20	LT	1,5017	POS	3,647	POS
	LVB9931/20 <i>POOL</i>	Tecidos fetais	1,0708	POS	0,0702	NEG
	LVB9931/20 COFI		1,1763	POS	0,0674	NEG
	LVB9931/20 SNC		1,1106	POS	3,6962	POS
FETO 2	LVB9930/20	LT	1,83	POS	3,6301	POS
	LVB9932/20 <i>POOL</i>	Tecidos fetais	1,0449	POS	0,089	NEG
	LVB9932/20 COFI		0,9665	POS	3,38	POS
	LVB9932/20 SNC		3,5605	POS	0,084	NEG

Foi possível detectar a presença do BVDV nas suspensões de amostras de líquido torácico (LT), coração, fígado (COFI), baço, fígado, rim e timo (*POOL*) e SNC dos dois fetos utilizando-se o ELISA/Ag BVDV IDEXX. Evidenciou-se o sucesso do isolamento viral em cultivo celular pelos valores de absorbância obtidos no teste de ELISA BVDV Ag na 3<sup>a</sup>. passagem em cultivo de célula MDBK, partindo-se de suspensão a 20% da amostra original (Figura 17).

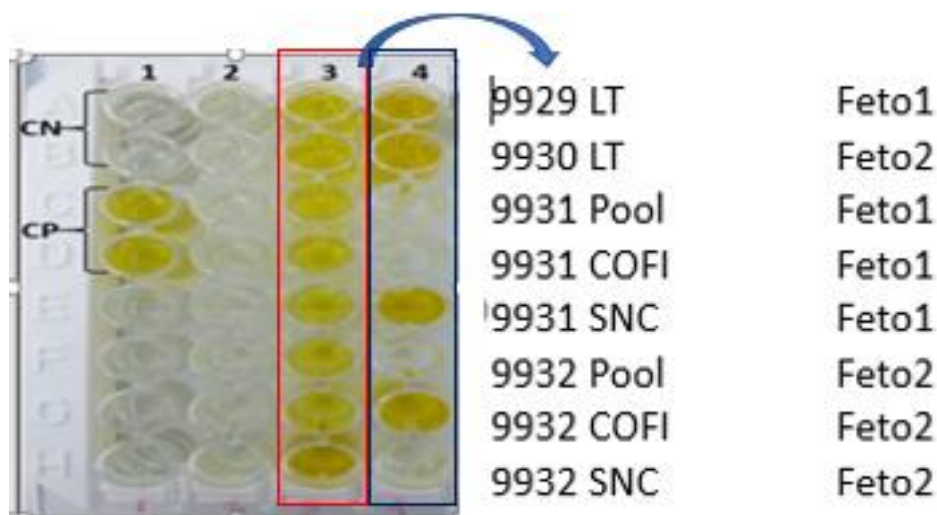


Figura 17 - Placa de ELISA captura de antígenos: Kit de ELISA BVDV Ag - IDEXX laboratories®. A positividade dos fetos em todos os macerados de órgão fetais (coluna 3). O isolamento viral foi confirmado em terceira passagem no cultivo celular (coluna 4) em amostras de líquido torácico nas posições (4A) e (4B) e em SNC (4E) do feto 1 e *pool* de amostras de coração e fígado (COFI) na posição 4G.

Na Figura 17, colunas 3 e 4, foram apresentados os resultados das análises no ELISA teste para detecção de antígenos (BVDV Ag - IDEXX laboratories®) para o feto 1 (LVB 9929/20 e LBV 9931/20) destacados nas posições (A, C, D e E) e o feto 2 (LVB 9930/20 e 9932/20) nas posições de (B, F, G e H), na coluna 2 foram analisadas amostras negativas.

### 5.9.2. RT-qPCR Kit comercial Virotype® BVDV (Indical Bioscience)

No Quadro 19 foram apresentados os resultados das amostras teciduais dos dois fetos, suas respectivas identificações e os resultados do Kit comercial Virotype® BVDV RT-PCR (Indical Bioscience).

A RT-qPCR das amostras fetais foram identificadas por siglas (LT, *POOL*, COFI e SNC), LT (líquido torácico), *POOL* (baço, fígado, rim e timo), COFI (coração e fígado) e SNC (Sistema nervoso central).

Quadro 19 - Resultados das análises utilizando-se o Kit comercial Virotype® BVDV RT-PCR (Indical Bioscience) para as amostras de fetos abortados e de isolados na 3ª. passagem em células MDBK

AMOSTRA	ID. AMOSTRA	MATRIZ	RESULTADO Virotype			
			Susp de tecidos Fetais		Isolamento	
			C.t.	Resultado	C.t	Resultado
FETO 1	LVB9929/20	LT	24,82	POS	22,56	POS
	LVB9931/20 <i>POOL</i>	Tecidos fetais	33,95	POS	36,40	NEG
	LVB9931/20 COFI		34,48	POS	37,85	NEG
	LVB9931/20 SNC		37,74	NEG	20,87	POS
FETO 2	LVB9930/20	LT	24,79	POS	20,69	POS
	LVB9932/20 <i>POOL</i>	Tecidos fetais	35,26	POS	32,19	POS
	LVB9932/20 COFI		35,70	POS	22,71	POS
	LVB9932/20 SNC		26,86	POS	36,28	NEG

A RT-qPCR permitiu identificar as amostras de suspensão de órgãos e do LT (fetos 1 e 2), as amostras de *POOL* de órgãos e COFI do (feto 1) e as amostras de *POOL*, COFI e SNC (feto 2). Ao isolamento viral em cultivo celular foram positivas as amostras de LT (fetos 1 e 2), no isolado de SNC do feto 1. No, feto 2, foram verificadas a presença do agente nas amostras de *POOL* de órgãos e *POOL* de amostras de coração e fígado (COFI).

### 5.9.3. Sequenciamento de Sanger e análise filogenética

O sequenciamento pelo método de Sanger das amostras fetais LVB 9931/20 e LVB 9932/20, utilizando os *primers* da região conservada 5'UTR, que amplificam 290pb, detectou o BVDV-1a com 98,25% de identidade (Figura 18) sendo considerado o agente causal desses abortamentos.



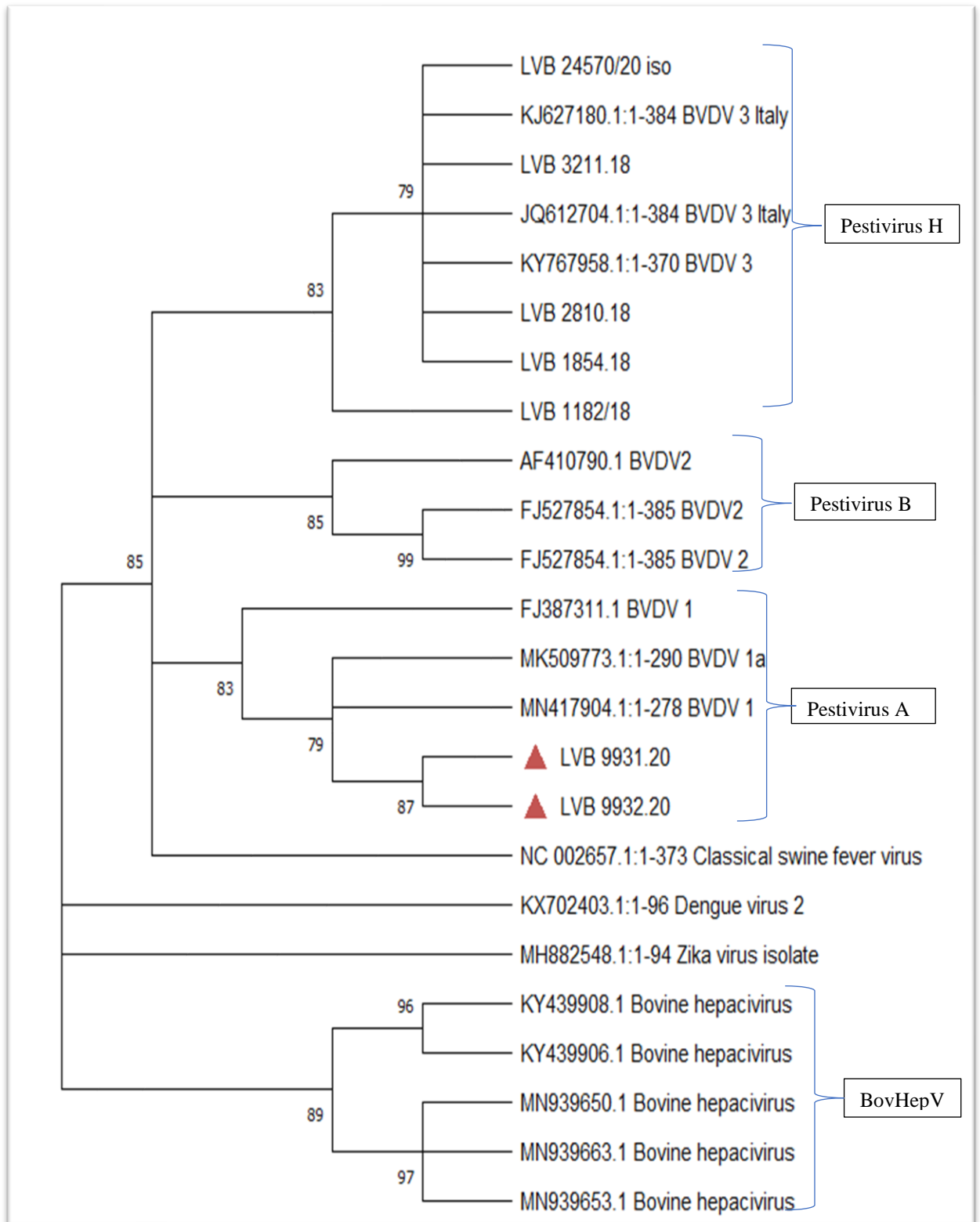


Figura 18 - Árvore filogenética da família *Flaviviridae* demonstrando a genotipagem dos vírus isolados de dois fetos no LVB/ IB (LVB 9931/20 e LVB 9932/20) (▲) BVDV-1a da região 5'UTR, utilizando o método de máxima verossimilhança, 1000 replicatas e modelo Kimura 2 + G Nei model.

#### 5.10. Análises filogenéticas das amostras de sangue total e de isolados

Na Figura 19 foi demonstrada a árvore filogenética referente ao sequenciamento genético parcial por Sanger para as seguintes amostras de sangue: (LVB/EXP 1446/18, LVB/EXP 1612/18, LVB/EXP 1718/18 (HepBovV), LVB/EXP 1737/18, LVB/EXP 1781/18, LVB/EXP 1847/18, LVB/EXP 1854/18, LVB/EXP 1879/18, LVB/EXP 2148/18, LVB/EXP 2652/18, LVB/EXP 4362/18, LVB/EXP 4629/18, LVB/EXP 4863/18, LVB/EXP 5023/18, LVB/EXP 6844/18, LVB/EXP 7457/18, LVB/EXP 7927/18, LVB/EXP 8192/18, LVB/EXP 8807/18, LVB/EXP 8809/18, LVB/EXP 8830/18, LVB/EXP 8834/18, LVB/EXP 8869/18, LVB/EXP 8873/18, LVB/EXP 8900/18, LVB/EXP 8901/18, LVB/EXP 8902/18, LVB/EXP 8930/18, LVB/EXP 8970/18, LVB/EXP 24570/19). Das amostras analisadas, 20 apresentaram identidades compatíveis com o *Pestivirus* H (BVDV-3), e uma amostra (1718/18) com o HepBovV- N. Ao sequenciamento por Sanger dos isolados, partindo-se das amostras de campo, foi possível identificar os seguintes genótipos: uma amostra com 99,30% de identidade para BVDV-1d (2780/18) e três amostras de BVDV-3 (ISO 1876/18; ISO 8192/18 ISO 8279/18) com identidades de 99,29%; 98,80; 90 e 90.9%), respectivamente.

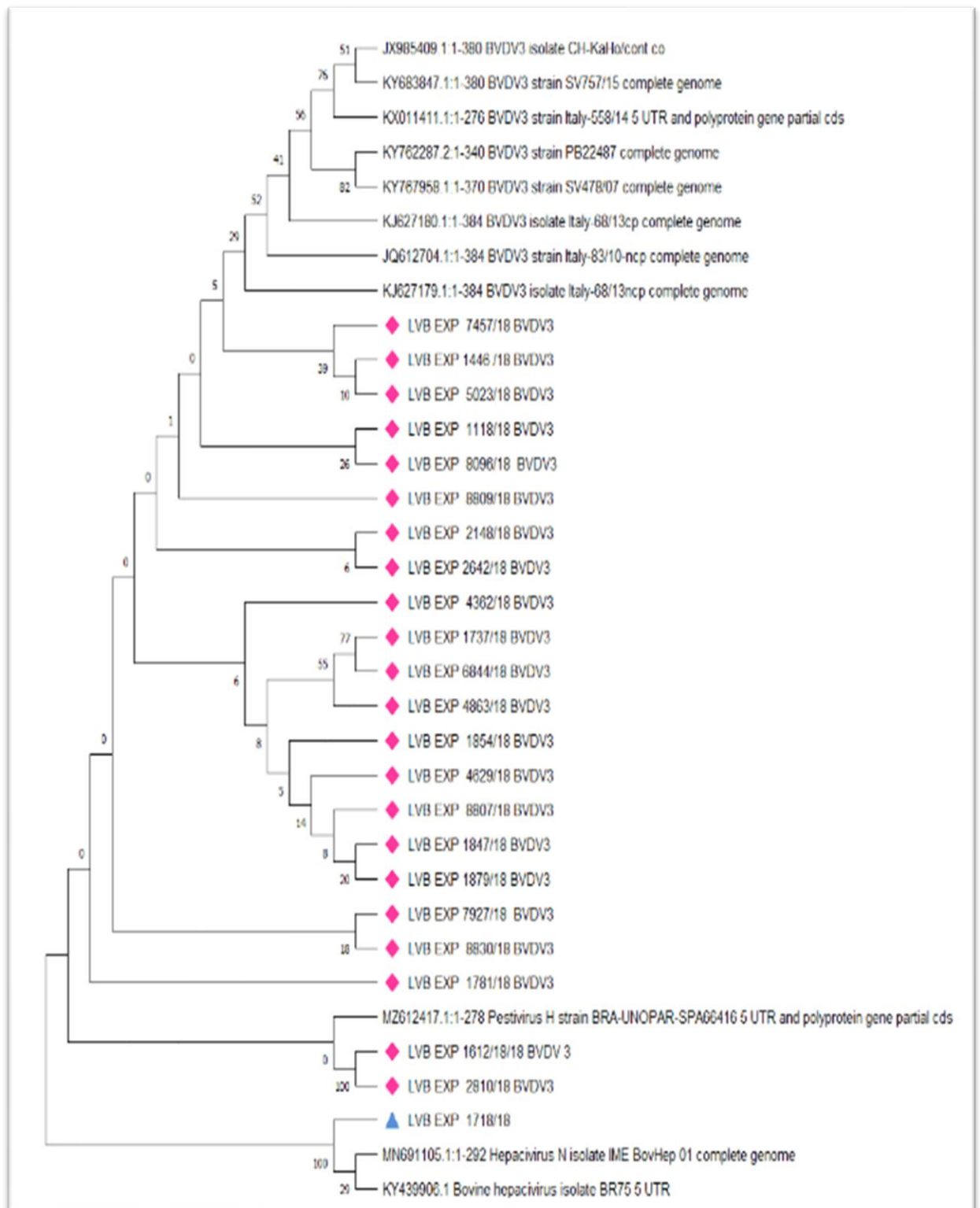


Figura 19 - Árvore filogenética da família *Flaviviridae*: *Pestivirus* H (BVDV-3) e *Hepacivirus* (HepBovV) demonstrando a genotipagem dos vírus encontrados nas amostras de sangue identificadas como (♦) para BVDV 3 e (▲) para HepBovV, utilizando-se *primers* da região 5'UTR, por meio do método de máxima verossimilhança, 1000 replicatas e modelo Kimura 2 + G Nei model.

Na árvore filogenética (Figura 20), a amostra viral (LVB/IB 24570/20) foi isolada em células MDBK a partir de amostras de sangue total e a sua identificação foi realizada utilizando-se o sequenciamento parcial de Sanger. O isolado (LVB/IB 24570/20 ISO) apresentou identidade como o *Pestivirus H*.

Os vírus BVDV-1a foram isolados de tecidos fetais (LVB/IB 9931/20 e LVB/IB 9932/20). As amostras de campo LVB/IB (3211/18, 2810/18, 1854/18, 1182/18) foram identificadas como *Pestivirus H*.

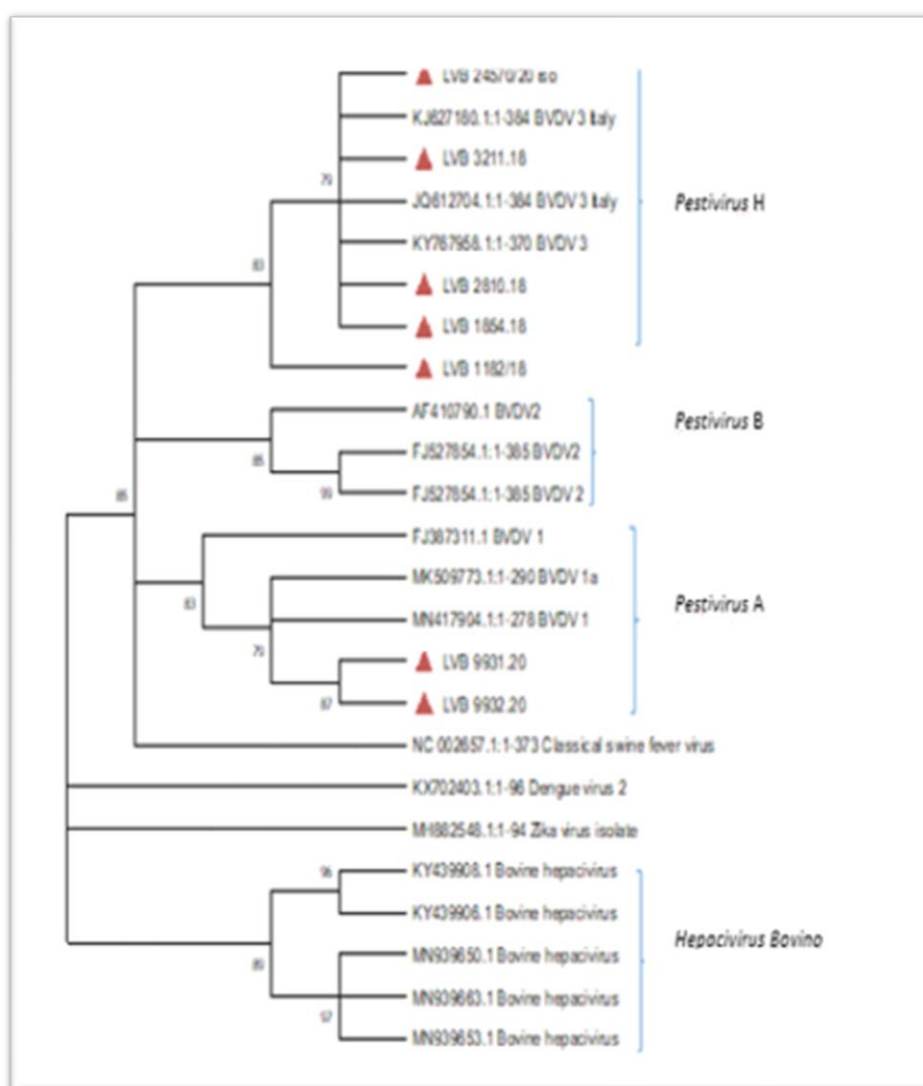
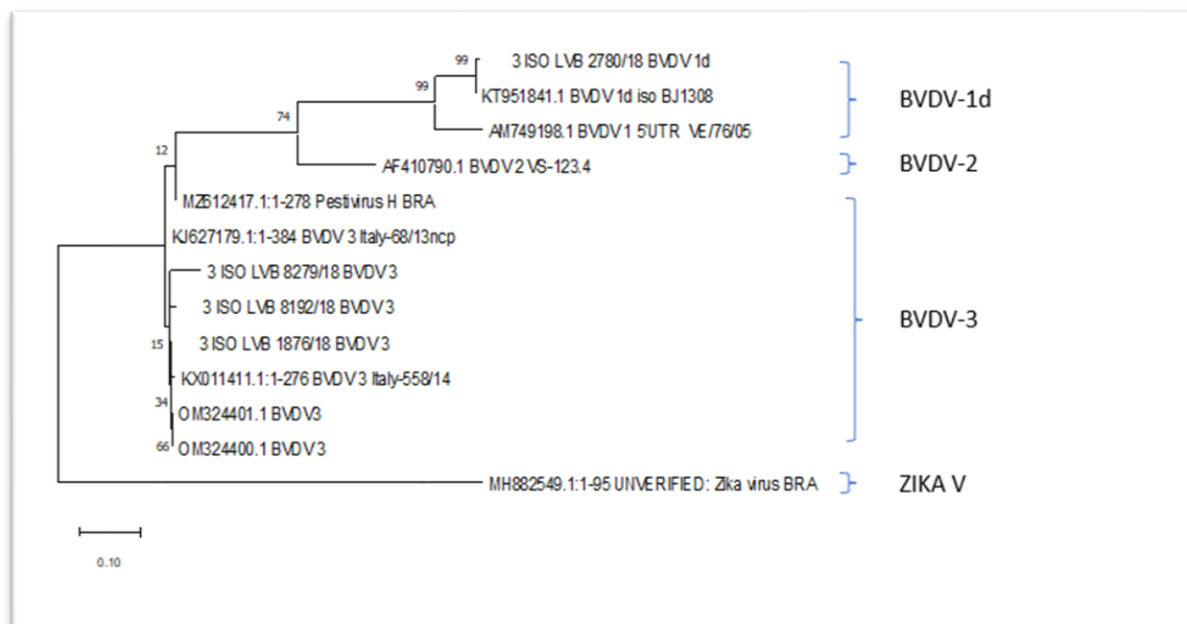


Figura 20 - Árvore filogenética da família *Flaviviridae*: *Pestivirus* (A, B, H,) e *Hepacivirus* (HepBovV), *Pestivirus C* (peste suína clássica) e os *Flavivirus* (Dengue vírus tipo 2 e Zika vírus) e a genotipagem dos vírus isolados das amostras de campo LVB/IB 24570/20, LVB/IB 9931/20 e LVB9932/20, utilizando-se os *primers* da região 5'UTR, por meio do método de máxima verosimilhança, 1000 replicatas e modelo Kimura 2 + G Nei model.

Na Figura 21, foram demonstradas as relações filogenéticas dos vírus isolados em células MDBK, partindo-se das amostras de campo de sangue total bovino (2780/18, 1876/18, 8192/18 e 8279/18). No sequenciamento por Sanger, foi possível identificar as seguintes

espécies virais: uma amostra com 99,30% de identidade para BVDV-1d (2780/18) e três amostras de BVDV-3 (ISO 1876/18; ISO 8192 /18 ISO 8279/18) com identidades de 99,29%; 98,80%; 90,9%, respectivamente.



**Figura 21** - Árvore filogenética da família *Flaviviridae* Pestivirus (BVDV-1d, BVDV2, BVDV3) e Zika vírus demonstrando a genotipagem dos vírus isolados em células MDBK, a partir das amostras de campo/LVB-IB, utilizando-se *primers* da região 5'UTR, por meio do método de máxima verossimilhança, 1000 replicatas e modelo Kimura 2.

### 5.11. Análises estatísticas

Para a análise estatística utilizou o programa, IBM SPSS *Statistics*, para a verificação do índice de *Kappa* por meio do grau de concordância dos resultados obtidos entre os testes: RT-qPCR com *primers* e sonda recomendados pela OMSA (Hoffman et al., 2006) em amostras de sangue total bovino e o Kit comercial Virotype® BVDV RT-PCR (Indical Bioscience); ELISA (BVDV Ag - IDEXX laboratories®) e o Kit comercial Virotype® BVDV RT-PCR (Indical Bioscience) para as amostras de tecidos fetais.

Tabela 10 - Análise de concordância *Kappa* entre os testes de RT-qPCR/OMSA, descritos por Hoffman et al. (2006) e o Kit comercial Virotype® BVDV RT-PCR (Indical Bioscience), das 571 amostras de RNA, provenientes de sangue total bovino LVB/IB, o valor da medida de concordância *Kappa* foi de 0,500, utilizando-se IBM SPSS *Statistics*, portanto o índice de considerado foi considerado moderado.

### Tabulação cruzada Virotype \* OIE

		OIE		Total	
		Não	Sim		
Virotype	INC	Contagem	41	13	54
		% em Virotype	75,9%	24,1%	100,0%
		% em OIE	9,3%	10,1%	9,5%
	Não	Contagem	386	41	427
		% em Virotype	90,4%	9,6%	100,0%
		% em OIE	87,3%	31,8%	74,8%
	Sim	Contagem	15	75	90
		% em Virotype	16,7%	83,3%	100,0%
		% em OIE	3,4%	58,1%	15,8%
Total	Contagem	442	129	571	
	% em Virotype	77,4%	22,6%	100,0%	
	% em OIE	100,0%	100,0%	100,0%	

### Medidas Simétricas

		Valor	Erro Padrão Assintótico <sup>a</sup>	T Aproximado <sup>b</sup>	Significância Aproximada
Medida de concordância	Kappa	,500	,037	14,766	<,001
N de Casos Válidos		571			

a. Não considerando a hipótese nula.

b. Uso de erro padrão assintótico considerando a hipótese nula.

Para as amostras sangue total o teste *Kappa* indicou grau de concordância moderado entre os testes de RT-qPCR para diagnóstico de BVDV, utilizando-se os *primers* recomendados pela OMSA e o Kit comercial Virotype® BVDV RT-PCR (Indical Bioscience), com medida de concordância de 0,500 e  $p < 0,001$  (Tabela 10).

Tabela 11 - Análise de concordância *Kappa* entre os testes diagnósticos ELISA (BVDV Ag - IDEXX laboratories®) e o Kit comercial Virotype® BVDV RT-PCR (Indical Bioscience) em amostras de suspensão de órgãos fetais.

ELISA BVDV/Ag	RT-qPCR Virotype		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	4 50%	0	4 50%
Negativo	1 12,5%	3 37,5	4 50%
Total	5 62,5%	3 37,5	8 100%
Índice Kappa	0,750		

Na tabela 11, o teste *Kappa* indica o grau de concordância muito bom, entre os resultados ELISA (BVDV Ag - IDEXX laboratories®) e o Kit comercial Virotype® BVDV RT-PCR (Indical Bioscience) para amostras de suspensão de órgãos fetais, com medida de concordância de 0,750 e  $p < 0,001$ .

### 5.12. Formação de banco amostras positivas e vírus isolados

A partir das amostras de campo (tecidos fetais e sangue total bovino), formou-se um banco de amostras positivas identificadas previamente por sequenciamento de Sanger (Tabela 12).

Tabela 12 - Espécies virais identificadas pelo sequenciamento parcial de Sanger, a partir de amostras de campo para formação de banco de amostras positivas (quantidade de materiais, origem das amostras e espécie viral).

Tipo de amostra	Quantidade	Estado	Espécie viral
Amostras fetais	02	MG	BVDV-1
Amostras de Sangue total bovino	30	PA	BVDV-3
	01	PA	BVDV-1d
	07	PA	BovHepV
	01	MG	BVDV-3
Total de amostras identificadas	41		

As amostras virais que tiveram a confirmação do isolamento em cultivo de células MDBK pela PCR e seguidos de sequenciamento por Sanger, foram centrifugadas e o sobrenadante foi transferido para criotubos de 2,0mL e armazenadas em caixas devidamente identificadas para congelamento em Freezer -80°C, obtendo-se um banco de isolados LVB, com as espécies BVDV 1a, BVDV 1d e BVDV-3 NCP (Tabela 13).

Tabela 13 – Espécies virais isoladas em cultivo de célula MDBK, identificadas pelo sequenciamento parcial de Sanger (quantidade de materiais, Estado de origem das amostras e biótipo das amostras isoladas).

Tipo de amostra	Quantidade	Estado	Espécie	biótipo
Feto abortado	02	MG	BVDV-1a	NCP
Amostras de Sangue total bovino	03	PA	BVDV-3	NCP
	01	PA	BVDV-1d	NCP
	01	MG	BVDV-3	NCP



### 5.13. Análise econômica para *pool* de amostras

O custo diagnóstico para o produtor é um fator limitante para envio de material e confirmação da suspeita clínica pelos métodos laboratoriais. No Laboratório de Viroses de Bovídeos, o valor do diagnóstico para BVDV, respectivamente é de R\$ 35,00 por amostra para ELISA-Ag e R\$ 120,00 por amostra pela RT-qPCR. O presente estudo avaliou 9.026 amostras de sangue total. Se o produtor fosse pagar por análise individual, o custo do exame de ELISA-Ag seria de R\$ 315.910,00. Como foi realizado o teste por *pool* de cinco amostras, foram avaliados 1805 *pools*, totalizando R\$ 63.175,00, ou seja, houve uma redução do valor do exame de 20%. Por sua vez, ao identificar um *pool* positivo foi necessário individualizar as amostras para detectar o animal positivo para BVDV. Considerando que a identificação de animal PI para BVDV está em torno de 1 a 2%, das 9.026 amostras analisadas, aproximadamente 129 animais seriam positivos para BVDV. A vantagem de se trabalhar com *pool* de amostras, além de agilizar na identificação dos animais positivos, o que contribui para tomada de decisão mais efetiva, como eliminação do animal PI do rebanho e avaliação de necessidade de introduzir vacina para controle do BVDV no rebanho, também reduz o custo dos kits diagnósticos, redução de insumos como ponteiras e placas auxiliares, contribuindo para a sustentabilidade ambiental, uma vez que reduz o descarte de plásticos.

## 6. Discussão

O BVDV é um patógeno endêmico em nosso país e reconhecido mundialmente como causa de prejuízos econômicos aos rebanhos bovinos (KHODAKARAM-TAFTI.; FARJANIKISH, 2017). O BVDV é um RNA vírus de fita simples com sentido positivo de leitura, envelopado (KAI et al., 2021), durante seu processo de replicação podem ocorrer mutações que contribuem para o surgimento de novos tipos virais (FLORES et al., 2005, CORTEZ et al., 2006), sendo assim, essas mutações pontuais contribuem para a geração de vírus considerados regionais (MAYA et al., 2019) e dificultam o controle da BVD (PITUCO, 2016, WALZ et al., 2020) por meio de vacinações (DEZEN et al., 2013).

Os estudos do gênero *Pestivirus* têm demonstrado avanços que permitem correlacionar a identificação dos agentes virais por meio de sequenciamento genético, análise filogenética, patogenia e o histórico da doença na região.

A presença de diferentes estirpes de BVDV nos rebanhos pode causar falhas no controle e erradicação do BVDV (CORTEZ et al., 2006), portanto, a caracterização epidemiológica considerando as diferenças genéticas e antigênicas existentes entre o *Pestivirus* A, B e H são importantes para o desenvolvimento de vacinas e a realização de propostas para o desenvolvimento de novas plataformas de diagnósticos laboratoriais que garantam alta sensibilidade e especificidade (YEŞILBAĞ; ALPAY; BECHER, 2017; DECARO et al., 2011; SANTOS et al., 2011). No presente trabalho foram observados resultados discordantes entre a prova de RT-PCR convencional e o teste de ELISA, o que indicou a necessidade de maiores estudos quanto a possibilidade da ocorrência de reações cruzadas com outros membros da família *Flaviviridae*.

Na reclassificação proposta por Smith et al. (2017), o gênero *Pestivirus*, da família *Flaviviridae*, recebeu a inclusão de sete novas espécies e o *Pestivirus* H permitiu caracterizar o vírus BVDV-3 (HoBi like), pois desde sua descoberta o HoBi-like era considerado um vírus atípico devido às suas características genéticas e antigênicas, singulares e distintas aos demais BVDV.

A execução deste trabalho foi realizada em duas etapas: no experimento piloto, utilizando-se a RT-PCR convencional para BVDV analisaram-se 683 amostras de sangue total bovino analisados individualmente, quando foi possível identificar sete amostras positivas, que ao serem testadas pelo Kit de detecção ELISA BVDV-Ag Idexx, verificou-se a positividade apenas para uma amostra, sugerindo a possibilidade de reações cruzadas com outros vírus da família *Flaviviridae*. Porém, por meio do sequenciamento parcial de Sanger

juntamente com a análise filogenética foram verificadas seis amostras com 96,90% de identidade para o HepBovV e uma amostra com 99,00% de identidade com o BVDV-3 (*Pestivirus H*).

Diante desses dados de sequenciamentos, confirmou-se a ocorrência de reações cruzadas entre membros da família *Flaviviridae* (*Pestivirus* e *Hepacivirus*) e, mediante a análise dos *primers* 103 e 372 (Weinstock; Bhudevi; Castro, 2001), isoladamente, por meio do BLAST (NCBI) verificou-se alinhamentos com sequências de diferentes tipos virais (*Pestivirus A, B e H* além do *Hepacivirus* bovino). Dessa forma, pode-se considerar que esses *primers* possuem amplo espectro de detecção para membros da família *Flaviviridae*, porém não possuem o poder de distinção entre eles, dificultando a orientação quanto a tomada de decisão para adesão de medidas profiláticas.

Na segunda etapa, após a padronização da RT-qPCR com o conjunto de *primers* e sonda recomendados pela OMSA (HOFFMANN et al., 2006), a amostragem foi ampliada para 9.026 amostras de sangue total bovino. A análise dessas amostras para BVDV, inicialmente, foram realizadas com o material genético extraído sob a forma de *pools* de cinco amostras, garantindo a agilidade na determinação do animal positivo, sendo realizado após essa análise o desmembramento das amostras que compõem os *pools*. A utilização da RT-qPCR, com o conjunto de *primers* e sonda recomendados pela OMSA, possibilitou detectar 6,4% (115/1805) de *pools* positivos, e após a análise individual das amostras 1,42% (129/9026) dos animais com idades de até 12 meses foram considerados positivos. A utilização dessa metodologia de análise em *pools*, descrita por Weinstock; Bhudevi e Castro (2001), Fino et al. (2012) e Weber et al. (2014), é recomendada para uso em grandes rebanhos para identificação dos animais positivos e PI, além de garantir agilidade no diagnóstico laboratorial. Silveira et al. (2017) também utilizaram essa metodologia em *pools* de amostras para reduzir os custos e não evidenciaram perda de sensibilidade à PCR na pesquisa de *Pestivirus H*.

No presente trabalho, o material genético de 1.805 amostras organizadas em *pools* de cinco amostras foi extraído em plataforma automatizada QIcube HT Qiagen, utilizando-se o Kit Cador Pathogen, aliado às estações de pipetagens de RNA (*epmotion* Ependorf®). A utilização do sistema automatizado para aplicação do material genético nas placas para RT-qPCR garante a redução de tempo de bancada, minimizando os riscos de contaminações cruzadas entre as amostras por formação de aerossóis. Ainda nesse contexto de controle de qualidade, vale ressaltar que os testes laboratoriais disponíveis e utilizados rotineiramente no

LVB/IB para o diagnóstico do BVDV seguem orientações preconizados pela OMSA, e auxiliam e orientam os médicos veterinários que assistem aos criadores de gado bovino no controle da doença. Os testes para o diagnóstico para BVD disponíveis no LVB/IB são: isolamento viral, IPX, ELISA de captura de antígenos, sorodiagnóstico por neutralização viral, RT-PCR convencional, RT-qPCR com *primers* propostos pela OMSA, o Kit comercial para RT-qPCR VetMAX (OLIVEIRA, 2013) e o RT-qPCR Virotype BVDV (Indical/Bioscience).

O sangue total dos 129 animais positivos na RT-qPCR para BVDV foram analisados por outras metodologias diagnósticas (ELISA BVDV-Ag Idexx, isolamento viral em cultivo celular seguidos de IPX, RT-PCR convencional e sequenciamento por Sanger), com finalidade de comparação entre os resultados obtidos (Apêndice 2).

A RT-qPCR para o diagnóstico do BVDV-1 e BVDV-2, com a utilização do set de *primers* e sondas, descritos por Bhudevi; Weinstock (2001), identificou 1,75% (10/571) das amostras como positivas, sendo 0,7% (4/571) BVDV-1, 0,3% (2/571) positivas para BVDV2 e 0,7% (4/571) amostras positivas para ambas as espécies de BVDV. Esses resultados justificam-se pelo fato de que no sequenciamento foi evidenciado o BVDV-3 como sendo a maioria das amostras positivas utilizando o set de *primers* da OMSA.

O kit comercial Virotype® BVDV RT-PCR (Indical Bioscience), utilizado para testar as 571 amostras de RNA viral desmembrados dos *pools* positivos ao teste de triagem com o conjunto de *primers* e sonda recomendados pela OMSA, determinaram 97 amostras positivas e 474 negativas. Esses resultados demonstraram que esse set de *primers* consegue identificar as três espécies de BVDV. Quando comparados os resultados obtidos entre o set de *primers* da OMSA e o kit comercial Virotype, o índice de concordância foi moderado ( $K = 0,500$ ) (Tabela 10). Foi observado, porém, em amostras de sangue total com o valor de Ct muito baixo, indicativo de alta carga viral, possivelmente, levou a inibição do controle endógeno.

A amostra LBV EXP 1718/18, sequenciada por Sanger e identificada como *Hepacivirus* bovino foi considerada negativa utilizando-se os oligonucleotídeos recomendados pela OMSA, Bhudevi; Weinstock (2001), Kit Virotype BVDV, ELISA BVDV-Ag, isolamento e IPX. Portanto não apresentaram reações cruzadas entre BVDV e BovHepV.

Das 129 amostras positivas identificadas no set de *primers* da OMSA, foram submetidas à análise por meio do ELISA-Ag BVDV - IDEXX®, sendo 60 amostras de sangue total positivas, com densidades óticas (D.O.) que variaram entre 0,827 a 3,858 e 69 amostras

foram negativas (Apêndice 2). Os resultados obtidos nessa segunda etapa também sugeriram a possibilidade de reações cruzadas com outros *Flaviviridae*.

Por meio das análises *in silico* das sequências dos *primers* e sonda, recomendados pela OMSA, foi possível confirmar o amplo espectro para a identificação dos *Pestivirus*, suportando a hipótese de existência de reações cruzadas com outros *Pestivirus*, pois, sessenta e nove amostras foram negativas ao teste de ELISA. Desse modo, a semelhança de resultados encontrados das análises *in silico* dos oligonucleotídeos entre a primeira fase do estudo e a segunda demonstram a necessidade de aprimoramento no desenho das sequências dos iniciadores, bem como o direcionamento dos alvos genéticos a fim de se obter um diagnóstico molecular mais específico, ou seja, sem reação cruzada. Ainda, os resultados divergentes encontrados entre a primeira fase do estudo e a segunda podem ser suportados pela menor sensibilidade analítica (ELISA) em comparação a RT-qPCR em decorrência de baixa carga viral nas amostras de campo, em níveis indetectáveis ao ELISA antígeno (OMSA, 2018).

O isolamento viral em célula MDBK seguido por IPX foi realizado partindo-se das amostras de campo de sangue total positivas ao RT-qPCR, lembrando que das 129 amostras positivas apenas 119 foram mantidas, sendo dez amostras descartadas devido à presença de hemólise e toxicidade durante o período de isolamento. A observação diária dos isolados mantidos por três passagens sucessivas, não demonstrou presença de efeito citopatogênico, reforçando a necessidade de incluir um teste complementar seja por IPX para avaliar a presença do BVDV NCP. Segundo a OMSA (2018) e ICTV (2020), durante o isolamento do BVDV em cultura de células pode ser observada a presença dos dois biótipos CP e NCP. Este último é o mais frequente nos rebanhos bovinos e é responsável por doenças entérica, respiratória, reprodutiva e fetal após infecção de uma fêmea reprodutora suscetível (PITUCO, 2016; OMSA, 2018).

Os isolados em cultivo celular apresentaram ausência de efeito citopático no tapete celular, portanto, para confirmação isolamento viral foi necessária a realização da IPX. Esta possibilitou a identificação de 15,14% (18/119) amostras positivas, pela presença do citoplasma celular marcado pela peroxidase, concordando com Ridpath; Flores (2007) que relacionaram os vírus NCP como causadores da maior parte das infecções.

O isolamento do BVDV em monocamadas de cultivo celular deve ser precedido de cuidados para que as células se apresentem livres de contaminantes, mediante o monitoramento de insumos utilizados no cultivo, sendo assim, recomenda-se utilizar produtos, dentre os quais SFB com certificação de livre para BVDV (SWACK et al., 1975;

STÅHL et al., 2007; OMSA, 2018). O primeiro relato de isolamento do *Pestivirus* H (HoBi-like) foi em amostras comerciais de SFB, vírus D32/00\_Hobi (SCHIRRMEIER et al., 2004). Monteiro et al. (2018) identificaram 39/73 amostras de lotes SFB bovino positivos para BVDV. Laassri et al. (2018) detectaram a presença do RNA de BVDV-1 em todos os 17 lotes de SFB e um lote de tripsina bovina, utilizados como insumos para produção de imunobiológicos de uso humano.

Nesse sentido, duas amostras de SFB comercial (esterilizado, inativado e livre de *Mycoplasma* e *Pestivirus*), identificadas no processo de certificação foram reprovadas por apresentarem-se positivas ao BVDV por testes moleculares e imunoenzimáticos, foram submetidas ao isolamento viral e apresentaram-se inócuas, após cinco passagens às cegas, quando em suspensão de células MDBK na concentração de  $2 \times 10^5$  células/mL, na proporção de 5%. Esse resultado concorda com os obtidos por Pecora et al. (2020), em que demonstraram que o processo de inativação por irradiação gama é eficiente, embora tivessem verificado a detecção de material genético do *Mycoplasma* sp. e *Pestivirus* bovino na PCR.

O BVDV, historicamente, foi relacionado apenas às síndromes entéricas em bovinos, problemas respiratórios e perdas reprodutivas, com a presença de abortos (Botton et al., 1998). Foram encaminhadas ao LVB/IB para diagnóstico diferencial de abortamento bovino, dois fetos com idade gestacional entre três e cinco meses, respectivamente. O BVDV-1a NCP foi isolado desses fetos (LVB/20 9931 e LVB/20 9932) em cultivo de células MDBK a partir de amostras de tecidos e líquido torácico e também foi sequenciado. Os vírus NCP são responsáveis pela maior parte das infecções causadas por BVDV (PITUCO, 2016; OMSA, 2018; ICTV, 2020), e nascimento de animais PIs nos rebanhos bovinos.

Ao comparar o grau de concordância entre resultados obtidos para as amostras de órgãos e tecidos fetais em suspensão de 20%, o teste *Kappa* indicou grau de concordância muito bom, para os resultados ELISA (BVDV Ag - IDEXX laboratories®) e o Kit comercial Virotype® BVDV RT-PCR (Indical Bioscience), com medida de concordância de 0,750 e  $p < 0,001$ .

As 24,80% (32/129), amostras que amplificaram o DNAc utilizando-se os oligonucleotídeos da região 5'UTR (WEINSTOCK; BHUDEVI; CASTRO 2001) foram sequenciadas após processo de purificação. Após análise filogenética, trinta apresentaram-se compatíveis com o *Pestivirus* H (BVDV-3) e apresentaram identidade variando de 87,63% a 100%, e uma amostra (LVB 1718/18) foi identificada como HepBovV- N com 97,58% de identidade. Os resultados encontrados neste estudo indicam que o *Pestivirus* H e o

*Hepacivirus* bovino estão presentes no Brasil, concordando com Silveira et al. (2018), que analisaram 19.293 soros para o vírus Hobi-like e identificaram 17 bovinos positivos utilizando os genes 5'UTR, N<sup>Pro</sup> e E2, por meio de análise filogenética identificando como Hobi-like vírus com identidades de 84 a 100% para o gene 5'UTR, 79 a 99% para o gene N<sup>Pro</sup> e de 89 a 98% para o E2.

No sequenciamento das amostras do projeto piloto, utilizando os *primers* da região 5'UTR, foram identificadas seis amostras positivas para HepBovV. Portanto, na tentativa de padronização do teste de RT-qPCR para HepBovV, foi utilizado o RNA das amostras em triplicatas e não foram observadas formação de curvas de amplificação para o BovHepV. Foi realizada a tentativa de isolamento em células MDBK, porém sem sucesso, corroborando com as dificuldades encontradas para isolamento viral do BovHepV relatadas por Canal et al. (2017) em diferentes tipos celulares.

No Brasil, Canal et al. (2017) relataram a presença do *Hepacivirus* bovino (BovHepV) na região Sul enquanto, pesquisavam a presença de BVDV, despertando preocupação quanto à disseminação desse agente, uma vez que pesquisas sugerem a existência de outras espécies de animais infectadas com esse gênero viral. Deng et al. (2018) analisaram bovinos clinicamente saudáveis na China, identificando 3,82% (5/131) positivos para *Hepacivirus* bovino por meio da RT-PCR, baseado na região conservada NS3 do vírus que amplifica 310pb.

No presente estudo foram isolados o *Pestivirus* A (BVDV-1a) em dois fetos, o *Pestivirus* A (BVDV-1d) e o *Pestivirus* H (BVDV-3) a partir de amostras de sangue total.

Conforme estudo conduzido por Silveira et al. (2015), esses autores identificaram pela primeira vez no Brasil o BVDV 1e e o BVDV 2c ao sequenciarem oitenta e nove isolados de pestivírus Brasileiros provenientes de bovinos, SFB e em contaminantes de cultura celular, sendo relatados a identificação do BVDV-1, BVDV-2 e o BVDV-3 e seus subgenótipos BVDV-1a, BVDV-1b, BVDV-1d, BVDV-1e, BVDV-2b.

Os dados resultantes das análises de sequenciamento genético para o BVDV-3 indicam incidência do *Pestivirus* H nos rebanhos Brasileiros (BAUERMANN; RIDPATH, 2021 e SILVEIRA, (2015). A distribuição desse agente já foi relatada em diversas regiões do país. Esse é um patógeno importante para a agropecuária nacional, principalmente nas regiões Norte e Nordeste do Brasil. A alta incidência de BVDV-3, nos rebanhos nacionais reitera a necessidade de monitoramento e vigilância para o *Pestivirus* H no Brasil bem como a rápida

detecção dos rebanhos positivos, animais PI e adoção de medidas profiláticas para o controle da doença.

O *Pestivirus H* é distinto geneticamente e antigenicamente aos demais *Pestivirus* (A e B), e estudos filogenéticos recentes já demonstram a presença de cinco subgrupos de HoBiPevV (BAUERMANN; RIDPATH, 2021; SILVA; RUDI; FLORES, 2021; KALAIYARASU et al, 2022). Diante dessa alta capacidade de mutação, considera-se urgente a produção de novos kits para testes diagnósticos bem como a elaboração e produção de vacinas com esses vírus para auxiliar no controle da BVD.

A análise filogenética dos isolados de campo de BVDV (Figura 25) utilizando-se *primers* da região 5'UTR possibilitou observar os isolados de BVDV-1d, BVDV-2, BVDV-3 e Zika vírus com a finalidade de demonstrar a genotipagem dos vírus isolados em células MDBK. Neste trabalho, o BVDV-1d (ISO 2780/18) apresentou 98,91% de identidade com as amostras identificadas na China descritas por Cai et al. (2016). Esse mesmo vírus já foi descrito por Zucoloto et al. (2019) no Brasil, proveniente de animais de alta produção leiteira.

No Brasil, desde a década de 60, a frequência do BVD foi realizada por inquéritos soropidemiológicos, diagnóstico clínico e isolamento viral para verificar a circulação do vírus no rebanho bovino (FLORES et al.; 2005). Weber et al. (2014), na Região Sul do Brasil, realizaram a RT-PCR para BVDV e determinaram 0,36% de positividade em animais da espécie bovina. A frequência de 0,02% (186/11.010) pelo método de ELISA-Ag foi relatada por Felício et al. (2016), durante estudo retrospectivo, no período de junho/2015 a julho/2016, em amostras de 12 Estados da Federação Brasileira. Na região Nordeste do Brasil, Silveira et al., (2018) analisaram 19.293 soros para a estirpe BVDV-3 (16.621 bovinos e 2.627 pequenos ruminantes) diagnosticaram 17 (0,10%) bovinos positivos, e nenhuma amostra positiva em pequenos ruminantes, indicando que o *Pestivirus H* aparenta ser espécie específico. O uso do ELISA para a detecção de antígeno possibilita, portanto, suporte ao diagnóstico médico veterinário para controle do BVDV (OMSA, 2018). O ELISA para detecção de antígenos demonstrou-se eficiente, e possibilitou confirmar a presença do BVDV em amostras de líquido toráco-abdominal de dois fetos e em suspensão de órgãos a 20%.

A partir do isolamento viral dos fetos bovinos abortados em cultura de células MDBK, confirmado mediante IPX com a utilização do anticorpo monoclonal C16, durante três passagens cegas, foi realizada a caracterização do BVDV como agente causador de abortamentos em propriedade de criação de bovinos leiteiros, e permitiu classificar quanto ao seu biotipo NC (PITUCO, 1985). O sequenciamento pelo método de Sanger possibilitou



identificar o agente causador desses abortamentos como BVDV-1a, esses dados foram apresentados no Congresso de Virologia da Sociedade Brasileira de Virologia (FELICIO et al., 2020). Felicio et al. (2016) destacaram a necessidade de genotipagem do BVDV para nortear suas medidas profiláticas para controle e erradicação.

Os resultados negativos por falhas reprodutivas em decorrência da existência do vírus circulante em rebanhos vacinados indicam a necessidade da realização de ensaios do tipo “*vaccine matching*” por meio da neutralização viral, entre diferentes estirpes vacinais anti-BVDV e os isolamentos de BVDV nacionais, bem como a utilização de painéis de referência de soro de animais vacinados contra as vacinas disponíveis no mercado. Objetivando-se avaliar a relação antigênica existente entre a cepa vacinal e isolado de campo, bem como a avaliação de similaridade antigênica. Neste sentido será possível compreender as falhas de proteção na resposta vacinal. A verificação dos dados obtidos a partir do desafio viral frente às vacinas possibilitará responder se as vacinas disponíveis no mercado brasileiro protegem contra a BVD.

Somente com esses estudos será possível gerar o conhecimento e contribuir na definição de estratégias efetivas para o controle da BVD no Brasil, além da inclusão de recomendações para eliminação do PI e realizar o controle das vacinas contra a BVD, liberando para uso apenas as que apresentarem-se comprovadamente eficazes no contexto do Brasil.

Diante dos dados de reações cruzadas entre os membros da família *Flaviviridae*, em especial, os gêneros *Pestivirus* e *Hepacivirus*, recomenda-se o desenvolvimento de novos Kits para diagnóstico que incluam o *Pestivirus* A, B e H de isolados predominantemente brasileiros, concordando com DIAS et al. (2010) e Flores et al. (2000) por apresentarem diferenças antigênicas dos *Pestivirus* encontrados em outros países (BOTTON et al., 1998), com a finalidade de evitar falsos negativos.

Diante do exposto, considerando o número de animais do rebanho Brasileiro, e a velocidade do surgimento de novas estirpes de BVDV, reafirma-se a necessidade de elaboração de marcadores específicos, principalmente para o *Pestivirus* H para atender a alta demanda e minimizar os prejuízos à cadeia produtiva de carne e leite.

Considerando o Brasil entre os maiores produtores de carne bovina, rotineiramente é destacada a necessidade do fortalecimento do sistema laboratorial para o diagnóstico diferencial desses vírus, bem como o aprimoramento e ampliação de pesquisa, corroborando

com as medidas de defesa sanitárias específicas, para minimizar as perdas causadas por este e outros agentes.

## 7. Conclusões

Pelas análises realizadas foram evidenciadas a circulação dos *Pestivirus A*, *H* e do *Hepacivirus* bovino nos rebanhos Brasileiros a partir das amostras de sangue o e órgãos fetais de bovinos.

- Foram identificados *Pestivirus* e *Hepacivirus* em amostras de sangue bovino por meio do Sequenciamento de Sanger utilizando-se os *primers* da região 5'UTR.
- Não foi possível padronizar a RT-qPCR para a detecção do *Hepacivirus* bovino.
- Os oligonucleotídeos recomendados pela OMSA, Bhudevi; Weinstock (2001), Kit Virotype BVDV, ELISA BVDV-Ag não apresentaram reações cruzadas entre BVDV e BovHepV.
- Os kits de diagnóstico ELISA/BVDV Ag Idexx® e Kit RT-qPCR BVDV (Indical Bioscience) possibilitaram a identificação das três espécies de BVDV-1, BVDV-2 e BVDV-3, respectivamente *Pestivirus A*, B e H e sem apresentar reação cruzada com *Hepacivirus* bovino.
- O protocolo da RT-qPCR com primers recomendados pela OMSA pode ser utilizado em pool de amostras de sangue, sendo indicado na rotina diagnóstica para rebanhos na pesquisa do BVDV, pois garante agilidade no processamento das amostras e redução de custo.
- Não foram verificadas reações cruzadas entre os *Pestivirus* e *Hepacivirus*, utilizando-se os testes de RT-qPCR recomendados pela OMSA, 2018.
- Foi formado banco de vírus isolados em cultivo de células MDBK das espécies virais *Pestivirus A* (BVDV-1a e 1d) e *Pestivirus H* (BVDV-3) identificados por meio do sequenciamento do Sanger.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-KUBATI, A. A. G. et al. Recent Advances on the Bovine Viral Diarrhea Virus Molecular Pathogenesis, Immune Response, and Vaccines Development. **Frontiers in Veterinary Science**. London, v. 8, 665128, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8160231/>. Acesso em: 10 abr. 2022.
- BAECHLEIN, N. C. et al. Identification of a Novel *Hepacivirus* in Domestic Cattle from Germany. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 89, n. 14, p. 707-715, 2015. Disponível em: <https://www.identificationofanovelhepacivirusindomesticcattlefromgermanyjournalofvirology.asm.org/>. Acesso em: 08 jul. 2017.
- BAECHLEIN, N. C. et al. Further characterization of bovine *Hepacivirus*: antibody response, course of infection, and host tropism **Transboundary Emerging Diseases**, Berlin, v. 66, p. 195-206, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30126081>. Acesso em: 20 jul. 2020.
- BASSETT, J. et al. Individual-based model for the control of Bovine Viral Diarrhea spread in livestock trade networks. **J Theor Biol.**, London, v. 527, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2021.110820>. Acesso em: 18 set. 2022.
- BAUERMAN, F.V.; FLORES, E. F.; RIDPATH, J. F. Antigenic relationships between bovine viral diarrhea virus I and II virus: Possible impacts on diagnosis and control. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 24, n. 2, p. 253-261, 2012. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1040638711435144>. Acesso em: 08 jul.2017.
- BAUERMAN, F. V.; RIDPATH, J. F. Epidemiology of *Pestivirus* H in Brazil and Its Control Implications. **Frontiers in Veterinary Science**, Lausanne, v. 8, Article 693041, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/2864/>. Acesso em: 12 dez. 2021.
- BHUDEVI, B.; WEINSTOCK, D. Fluorogenic RT-PCR assay (TaqMan) for detection and classification of bovine viral diarrhea virus. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 83, n. 1, p. 1-10, 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11524161/>. Acesso em: 08 jul. 2017.
- BOTTON, S. A. et al. Caracterização Preliminar de Amostras do Vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) Isoladas No Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 18, n. 2, p. 84-92, 1998. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/pvb/a/nvpX5SsdgzZm7sDLcXGbkh/?lang=pt>. Acesso em: 08 set. 2020.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa MAPA 40/2007. REQUISITOS SANITÁRIOS PARA A IMPORTAÇÃO DE SÊMEN BOVINO E BUBALINO ORIUNDO DE PAÍSES EXTRAMERCOSUL**. Disponível em: <IN40de4desetembre2007.pdf> ([www.gov.br](http://www.gov.br)). Acesso em: 15 ago. 2022.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de verificação de desempenho de métodos para diagnóstico molecular de doenças infecciosas na rede nacional de laboratórios agropecuários / Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento**. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, MAPA/ACS, 1ª. edição, 2015. 57 p. Disponível em: [www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/laboratorios/arquivos-publicacoes-laboratorio/biomol\\_final\\_baixa.pdf](http://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/laboratorios/arquivos-publicacoes-laboratorio/biomol_final_baixa.pdf). Acesso em: 15 abr. 2019.

CAI D. et al. Genomic characterization of three bovine viral diarrhea virus isolates from cattle. **Archives of virology**. Austria, v. 161, n. 12, p. 3589-3592, 2016 Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00705-016-3055-9>. Acesso em 18 fev. 2021.

CANAL, C. W. et al. A Novel Genetic Group of Bovine *Hepacivirus* in Archival Serum Samples from Brazilian Cattle **Hindawi BioMed Research International**, New York, v. 2017, p. 1-5. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2017/4732520/>. Acesso em: 05 abr. 2018.

CAVÈ, H. et al. La RT- PCR en diagnostic Clinique. **Annales de Biologie Clinique**, Paris, v. 61, n. 6, p. 635-644, 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14711604>. Acesso em: 18 fev. 2020.

CORTEZ, A. et al. Genetic characterization of Brazilian bovine viral diarrhea virus isolates by partial nucleotide sequencing of the 5'UTR region. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Rio de Janeiro, v. 26, n. 4, p. 211-216, 2006. Disponível em: [www.scielo.br/j/pvb/a/7CNWrDbvjPCJjwzN868NBdt/?lang=en](http://www.scielo.br/j/pvb/a/7CNWrDbvjPCJjwzN868NBdt/?lang=en). Acesso em: 10 mai. 2017.

DALEY, J. P. et al. Virus Inactivation by Gamma Irradiation of Fetal Bovine Serum. **Focus**, Rockville, v. 20, n. 3, p. 31-33, 1998. Disponível em: [https://www.researchgate.net/profile/Peter-Uetz/publication/248044830\\_The\\_Two-Hybrid\\_System/links/53eb66110cf26f1f689d6105/The-Two-Hybrid-System.pdf#page=31](https://www.researchgate.net/profile/Peter-Uetz/publication/248044830_The_Two-Hybrid_System/links/53eb66110cf26f1f689d6105/The-Two-Hybrid-System.pdf#page=31). Acesso em: 10 jan. 2020.

DAZEN, et al. Perfil da infecção pelo vírus da diarréia viral bovina (BVDV) em um rebanho bovino leiteiro de alta produção e com programa de vacinação contra o BVDV1. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Londrina, n. 33, v. 2, p. 141-147, 2013. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/pvb/a/wLQRn7tnnFZYPxg5QNrmLLz/?lang=pt> Acesso em: 15 out. 2018.

DECARO, N. et al. Atypical *Pestivirus* Respiratory Disease and Severe in Calves, Europe. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 17, n. 8, p. 1549-1552, 2011. Disponível em: [wwwnc.cdc.gov/eid/article/17/8/10-1447\\_article](http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/17/8/10-1447_article). Acesso em: 20 jan. 2018.

DECARO, N. et al. Persistent infection caused by Hobi-like *Pestivirus*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 51, n. 4, p. 1241-1243, 2016. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/JCM.03134-12>. Acesso em: 20 jun. 2020.

DECARO, N. HoBi-Like *Pestivirus* and Reproductive Disorders. **Frontiers in Veterinary Science**. London, v. 7, p.1-5, 2020. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2020.622447/full>. Acesso em: 20 mai. 2021.

DECARO, N. et al. HoBi-Like *Pestivirus* and Its Impact on Cattle Productivity. **Transboundary and Emerging Diseases**, Berlin, v. 63, n. 5, p. 469-473, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/tbed.12529>. Acesso em: 20 jun. 2020.

DENG, Y. et al. The detection and phylogenetic analysis of Bovine *Hepacivirus* in China. **Hindawi Biomed Research International**, Berlin, v. p. 1-4, 2018. Disponível em: Acesso em: 23 nov. 2020.

DEZEN, S. et al. Perfil da infecção pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV) em um rebanho bovino leiteiro de alta produção e com programa de vacinação contra o BVDV. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 2, 2013. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/pvb/a/wLQRn7tnnFZYPxg5QNrmLLz/?lang=pt>. Acesso em: 20 jan. 2019.

DIAS, F. C. et al. Ocorrência de animais persistentemente infectados pelo vírus da diarreia viral bovina nos estados de Minas Gerais e São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 30, n. 11, p. 933-939, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2010001100006>. Acesso em: 17 out. 2020.

DIAS, F. C. et al. Comparação dos testes de virusneutralização contra os genótipos 1 e 2 do vírus da diarreia viral bovina (BVDV-1 e BVDV-2) em bovinos de rebanhos naturalmente infectados. **Ciência Rural**, Santa Maria, n. 40, v. 4, p. 913-920, 2010. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cr/a/5nBYR6Z3hcb9k7WRqDcCwHM/?lang=pt>. Acesso em 10 de mai. 2020.

DUBOVI, E. J. Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhea vírus. **Biologicals**, London, v. 41, n. 1, p. 8-13, 2012. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1045105612001005?via%3Dihub>. Acesso em: 10 jun. 2017.

FELICIO, P. S. et al. ELISA antígeno para detecção do vírus da diarreia viral bovina 2015/2016. **O Biológico**, v. 78, p. 135. Apresentado na 29a. Reunião Anual do Instituto Biológico, 2016, São Paulo. Disponível em: [www.biologico.agricultura.sp.gov.br/uploads/docs/bio/v78\\_2/pg73.pdf](http://www.biologico.agricultura.sp.gov.br/uploads/docs/bio/v78_2/pg73.pdf). Acesso em: 15 mar. 2017.

FELICIO, P. S. et al. Detection of BVDV 1a in bovine aborted fetuses in a cattle farm of State of Minas Gerais, Brazil. In: Congresso Brasileiro de Virologia & Encontro de Virologia do Mercosul. Anais. Porto Alegre (RS) Online, 2020. Available in: <https://www.even3.com.br/anais/cbv/297641-DETECTION-OF-BVDV-1A-IN-BOVINE-ABORTED-FETUSES-IN-A-CATTLE-FARM-OF-STATE-OF-MINAS-GERAIS-BRAZIL>. Access in: 10/02/2021.

FINO, T. C. M. et al. Diarreia bovina a vírus (BVD) – uma breve revisão. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Brasília, v. 34, n. 2, p. 131-140, 2012. Disponível em: [View of Bovine Viral Diarrhea \(BVD\) - A breaf Review \(rbmv.org\)](#). Acesso em: 07 fev. 2018.

FOUNTAIN, J. et al. One size does not fit all: Exploring the economic and non-economic outcomes of on-farm biosecurity for bovine viral diarrhoea virus in Australian beef production. **Preventive Veterinary Medicine**. Amsterdam, v. 208, online 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/journal/preventive-veterinary-medicine>. Acesso em: 18 set. 2022.

FLORES, E. F. et al. A infecção pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV) no Brasil: histórico, situação atual e perspectivas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 3, p. 125-134, 2005. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/pvb/a/kT8zTchq94SZtSLsM55fJhd/?lang=pt>. Acesso em 05 ago. 2017.

FLORES, E. F. et al. A genetic profile of bovine *Pestiviruses* circulating in Brazil (1998–2018). **Animal Health Research Reviews**, Wallingford, v. 19, n. 2, p. 134–141, 2019. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/journals/animal-health-research-reviews/article/abs/genetic-profile-of-bovine-Pestiviruses-circulating-in-brazil-19982018/C01AD732999915A1DAE054A97A68A0F2>. Acesso em: 20 out. 2020.

FRITZEN, J. T. T. et al. Bovine viral diarrhoea virus subgenotype 1a in a mummified fetus from a Brazilian dairy cattle herd. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation** Columbia, v. 33, n. 5, p. 966-968. Disponível em: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8366241/pdf/10.1177\\_10406387211022012.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8366241/pdf/10.1177_10406387211022012.pdf). Acesso em: 03 mai. 2022.

GIAMMARIOLI, M. et al. Increased genetic diversity of BVDV-1: recent findings and implications thereof. **Virus Genes**, Boston, v. 50, n. 1 p. 147-151, 2015. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11262-014-1132-2>. Acesso em: 20 set. 2020.

HAWKES, P. W. Fetal bovine serum: geographic origin and regulatory relevance of viral contamination. **Bioresources and Bioprocessing**, Payson, v. 2, n. 34, p. 1-5, 2015. Disponível em: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1186/s40643-015-0063-7.pdf>. Acesso em: 10 out. 2020.

HIROSE, S. et al. Transmission Dynamics of Bovine Viral Diarrhoea Virus in Hokkaido, Japan by Phylogenetic and Epidemiological Network Approaches. **Pathogens**, Switzerland, v. 10, n. 8, p. 1-13, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pathogens10080922>. Acesso em: 19 set. 2022.

HOFFMANN, B. et al. A universal heterologous internal control system for duplex real-time RT-PCR assays used in a detection system for *Pestivirus*. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 136, p. 200–209, 2006. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/journal/journal-of-virological-methods>. Acesso em: 27 out. 2016.

HOUE, H. Epidemiology of bovine viral diarrhea virus. **Veterinary Clinics of North America**, Philadelphia, v. 11, n. 3, p. 521-547, 1995. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0749072015304655?via%3Dihub>. Acesso em: 10 mai. 2019.

ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses – Virology Division IUMS Genus: *Hepacivirus - Flaviviridae* - Positive-sense RNA Viruses – ICTV. Disponível em: <http://www.ictvonline.org>. Acesso em: 20 jan. 2020.

ICTV. International committee on Taxonomy of Viruses – Virology Division IUMS Genus: *Pestivirus - Flaviviridae* - Positive-sense RNA Viruses – ICTV. Disponível em: <http://www.ictvonline.org>. Acesso em: 20 jan. 2020.

KALAIYARASU S. et al. Molecular characterization of recent Hobi-like *Pestivirus* isolates from cattle showing mucosal disease-like signs in India reveals emergence of a novel genetic lineage. **Transbound and Emerging Diseases**. Berlin, v. 69, p. 308–326, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/tbed.13981>. Acesso em 10 mai. 2022.

KIM, H-S. et al. First identification and phylogenetic analysis of equine *Hepacivirus* in Korea. **Infection, Genetic and Evolution**, Amsterdam, v. 49, p. 268-272, 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S156713481730031X>. Acesso em: 10 jan. 2019.

KHODAKARAM-TAFTI, A.; FARJANIKISH, G. H. Persistent bovine viral diarrhea virus (BVDV) infection in cattle herds. **Iran Journal Veterinary Research**, Summer, n. 18, v. 3, p. 154-163, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5674437>. Acesso em: 20 mai. 2021.

KLIMOWICZ-BODYS, M. D. et al. Lack of Fetal Protection against Bovine Viral Diarrhea Virus in a Vaccinated Heifer. **Viruses** 2022, 14, 311. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/v14020311>. Acesso em: 25 ago. 2022.

KUMAR, S. et al. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 35 p. 1547-1549, 2018. Disponível em: <https://www.academic.oup.com/mbe/article/35/6/1547/4990887>. Acesso em: 16 out. 2020.

LAASSRI, M. et al. Detection of bovine viral diarrhea virus nucleic acid, but not infectious virus, in bovine serum used for human vaccine manufacture. **Biologicals**, London, v. 55, p. 63-70, 2018. Disponível em: [www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S104510561830191X?via%3Dihub](http://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S104510561830191X?via%3Dihub). Acesso em: 10 jun. 2020.

LAPERCHE, S. et al. Comparison of Hepatitis C Virus NS5b and 5'-Noncoding Gene Sequencing Methods in a Multicenter Study. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 43, n. 2, p. 733-739, 2005. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/JCM.43.2.733-739.2005>. Acesso em: 20 out. 2020.



LU, G.; GONG, P. A structural view of the RNA-dependent RNA polymerases from the *Flavivirus* genus. **Virus Research**, Amsterdam, v. 234, n. 15, p. 34-43, 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168170216307183?via%3Dihub>. Acesso em: 10 ago. 2019.

LU, G. et al. Novel bovine *Hepacivirus* in dairy cattle, China. **Emerging Microbes & Infections**, Philadelphia, v. 7, n. 54, p. 1-3, 2018. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1038/s41426-018-0055-8>. Acesso em: 03 mar. 2022.

MARQUES, A. L. A. et al. Detecção do vírus 'HoBi'-like (BVDV-3) em bovino no semiárido do Estado da Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 36, n. 11, p. 1081-1086, 2016. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/pvb/a/syrNqKs3fr6WPqP8PfFHMxT/?lang=pt>. Acesso em: 20 mar 2022.

MAYA, L. et al. An extensive field study reveals the circulation of new genetic variants of subtype 1a of bovine viral diarrhea virus in Uruguay. **Archives of Virology**, Wien, v. 165, n. 1, p. 145-156, 2020. Disponível em: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s00705-019-04446-z.pdf>. Acesso em: 03 fev. 2021.

MAYA, L. et al. Molecular diversity of bovine viral diarrhea virus in Uruguay. **Archives of Virology**, Wien, v. 161, n. 3, p. 529-535, 2016. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00705-015-2688-4>. Acesso em: 10 mar. 2017.

MIKLOS, D. A.; FREYER, G. A.; CROTTY, D. A. Métodos modernos de análise de genomas completos In: A ciência do DNA. 2.ed. Porto Alegre: Editora Artimed, 2005. p. 195-199.

MILLER, R. H.; PURCELL R. H. Hepatitis C virus shares amino acid sequence similarity with *Pestiviruses* and flaviviruses as well as members of plant virus super groups. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 87, n. 6, p. 2057-61, 1990. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC53625/pdf/pnas01031-0019.pdf>. Acesso em: 07 out. 2019.

MONTEIRO, F. L. et al. Detection and genetic identification of *Pestiviruses* in Brazilian lots of fetal bovine serum collected from 2006 to 2014. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. Rio de Janeiro. v. 38, n. 3, p. 387-392, mar. 2018. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/pvb/a/R9BqkP7nBJySWRFzdWTKGHg/?format=pdf&lang=en>. Acesso em: 17 out. 2021.

MOSENA, A. C. S. **Caracterização genômica de BVDV-1 subtipo i e vírus 'Hobi'-Like detectados no Brasil**. 2017. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 2017. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/158119/01020333.pdf> (ufrgs.br). Acesso em: 10 ago. 2017.

MOSENA, A. C. S. et al. Temporal analysis of bovine *Pestivirus* diversity in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, p. 1-8. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s42770-022-00735-z>. Acesso em: 06 abr. 2022.

NCBI. National Center for Biotechnology Information. GenBank. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Acesso em: 14 abr. 2017.

NEILL, J. D. Molecular biology of bovine viral diarrhoea virus. *Biologicals*, London, v. 41 p. 2-7, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2012.07.002>. Acesso em: 10 jan. 2020.

OMSA - Organización Mundial de Sanidad Animal (woah.org) fundado como OIE. Bovine Viral Diarrhoea, Terrestrial Manual. ed 8. cap. 3.4.7. p 1075-1096. 2018. Disponível em: [https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Health\\_standards/tahm/3.04.07\\_BVD.pdf](https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.04.07_BVD.pdf). Acesso em: 22 fev. 2022.

OMSA - Organización Mundial de Sanidad Animal OIE. Fundado como World Organisation for animal health. OIE-Listed diseases, infections and infestations in force in 2021. Disponível em: [OIE-Listed diseases 2021: OIE - World Organisation for Animal Health](https://www.oie.int/eng/normes/mesures/mesures_1773.asp). Acesso em; 06 abr. 2021.

OLIVEIRA, A. L. R. Análise da eficiência e do custo-benefício da RT-PCR em tempo real no diagnóstico da diarréia viral bovina. 2013, Dissertação (Mestrado). São Paulo, 2013. 115 p. Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação. 2013. Disponível em: [www.biológico.sp.gov.br/pos/uploads/files/pdf/2013/ana\\_Luiza.pdf](http://www.biológico.sp.gov.br/pos/uploads/files/pdf/2013/ana_Luiza.pdf). Acesso em: 20 out. 2020.

PECORA, A. et al. Analysis of irradiated Argentinean fetal bovine serum for adventitious agents. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 32, n. 6 p. 892-897, 2020. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1040638720951556>. Acesso em: 05 mai. 2021.

PETERHANS, E. et al. Cytopathic bovine viral diarrhoea viruses (BVDV): emerging *Pestiviruses* doomed to extinction. **Veterinary Research**, Paris, v. 41, n. 6, p. 44, 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/892/> Acesso em: 15 set. 2021.

PETERHANS, E.; SCHWEIZER, M. *Pestiviruses*: How to outmaneuver your hosts. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 142, n. 1-2, p. 18-25, 2010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113509004556?via%3Dihub>. Acesso em: 20 out. 2017.

PICONE, M. E.; FLORES, E. F. Replicação dos vírus de RNA. In: FLORES, E.1.ed **Virologia Veterinária**. Santa Maria: editora da UFSM, 2007. p. 167-185.

PITUCO, E. M. **Análise da diversidade antigênica do vírus da diarreia bovina (BVDV) em isolados obtidos no período de 1959 a 1994 na Alemanha com o uso de anticorpos monoclonais.** 1995. Tese (Doutorado). Escola Superior de Medicina Veterinária de Hannover, 1995.

PITUCO, E. M. Diarreia viral bovina e enfermidade das mucosas. In: MEGID J.; RIBEIRO, M. G.; PAES, A. C. 1. ed. **Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia.** Rio de Janeiro: Editora Roca, 2016. p. 587-597.

PITUCO, E. M. et al. Ruminantes, Equídeos e Suídeos. In: MARQUES, G.H.F.; POMPEI, J.C.A.; MARTINI, M. **Manual veterinário de colheita e envio de amostras: manual técnico.** Cooperação Técnica MAPA/OPAS/PANAFTOSA para o Fortalecimento dos Programas de Saúde Animal do Brasil. Rio de Janeiro: PANAFTOSA - OPAS/OMS, 2010. p. 35-47.

POSTEL, A.; SMITH, D.B.; BECHER, P. Proposed Update to the Taxonomy of *Pestiviruses*: Eight Additional Species within the Genus *Pestivirus*, Family Flaviviridae. **Viruses** 2021, 13, 1542. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/v13081542>. Acesso em: 18 dez. 2021.

PYBUS, T.; THÉZÉ, J. *Hepacivirus* cross-species transmission and the origins of hepatitis C virus. **Science Direct Current Opinion in Virology**, Amsterdam, v. 16, p. 1-7, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1879625715001443?via%3Dihub>. Acesso em: 25 set. 2018.

QUADROS, L. M. et al. Aspectos clínicos e virológicos da infecção experimental de bezerros com uma amostra brasileira do vírus da diarreia viral bovina 1a. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 46, n. 11, p. 1986-1991, 2016. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cr/a/cbGY4zTmxpN5dxDcRrDpbnQ/?lang=en>. Acesso em: 19 out. 2019.

REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. **The American Journal of Hygiene**, v. 27, p. 493-497, 1938.

RICHTER, V. et al. Mapping the global prevalence of diarrhea virus infection and its associated mitigation programs. **The Veterinary Record**, London, v. 184 n. 23, p. 711, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6582812/>. Acesso em: 20 ago. 2020.

RIDPATH, J. F.; FLORES, E. F. *Flaviridae*. In: FLORES, E. 1. ed. **Virologia Veterinária.** Santa Maria: Editora da Universidade Federal de Santa Maria, 2007. p. 563-591.

SANTOS, A. S. et al. Aspectos clínicos, patológicos, imuno-histoquímicos e virológicos em cinco bezerros persistentemente infectados com o vírus da diarreia viral bovina em uma propriedade do Rio Grande Do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 31, n. 10, p. 885-892, 2011. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/pvb/a/zLMSW9HS9bQ4N4fKbJ3NJyc/?lang=pt&format=pdf>. Acesso em: 20 nov. 2019.

SCHEEL, K. H.; SIMMONDS, P.; KAPPOOR, A. Surveying the global virome: Identification and characterization of HCV-related animal *Hepaciviruses*. **Antiviral Research**, Amsterdam, v. 115, p. 83-93, 2014. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0166354214003659?via%3Dihub>.

Acesso em: 20 nov. 2020.

SCHIRRMEIER, H. et al. Genetic and antigenic characterization of an atypical *Pestivirus* isolate, a putative member of a novel *Pestivirus* species. **The Journal of General Virology**, London, v. 85, n. 12, p. 3647-3652, 2004. Disponível em:

<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/vir.0.80238-0>. Acesso em: 20 out. 2019.

SCHWEIZER, M.; PETERHANS, E. *Pestiviruses*. **Annual Review of Animal Biosciences**, Palo Alto, v. 2, p. 141-63, 2014. Disponível em:

<https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-animal-022513-114209>. Acesso em: 05 nov. 2017.

SILVA, P. H. H.; WEIBLEN, R.; FLORES, E. F. About the necessity of including HoBi-like *Pestiviruses* in bovine respiratory and reproductive viral vaccines, **Pesq. Vet. Bras.** Rio de Janeiro, v. 41, 2021. Disponível em:

[www.scielo.br/j/pvb/a/HbdkPpbh3cHxWrK76phcwrL/?lang=en](http://www.scielo.br/j/pvb/a/HbdkPpbh3cHxWrK76phcwrL/?lang=en). Acesso em: 05 fev. 2021.

SILVEIRA, S. HoBi-like is the most prevalent ruminant *Pestivirus* in Northeastern Brazil. **Transbound Emerging Disease**, Berlin, v. 65, n. 1, p. 113-120, 2018. Disponível em:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/tbed.12689>. Acesso em: 10 nov. 2019.

SILVEIRA, S. et al. In vitro method to evaluate virus competition between BVDV-1 and BVDV-2 strains using the PrimeFlow RNA assay. **Virology**, New York, v. 536, p. 101-109, 2019. Disponível em:

<https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0042682219302053?token=64115ABBB6AD0C1C164657C53FAE31CBBF75482B258A7ACBA5815A400F93C5BF60BB0213152CB4BF8F77A58743D19492&originRegion=us-east-1&originCreation=20210604164918>. Acesso em: 04 mar. 2020.

SILVEIRA, S. et al. Genetic diversity of Brazilian Bovine *Pestiviruses* Detected between 1995 and 2014. **Transboundary and Emerging Diseases**, Berlin, v. 64, n. 2, p. 1-11, 2015. Disponível em:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/tbed.12427>. Acesso em: 20 abr. 2019.

SMITH, D. B. et al. Proposed revision to the taxonomy of the genus *Pestivirus*, family *Flaviviridae*. **The Journal of General Virology**, London, v. 98, n. 8, p. 2106-2112, 2017.

Disponível em:

[www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/jgv/98/8/2106\\_vir000873.pdf?expires=1622827032&id=id&acname=guest&checksum=ff625c2362daaa48f139c363413e5d9e](http://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/jgv/98/8/2106_vir000873.pdf?expires=1622827032&id=id&acname=guest&checksum=ff625c2362daaa48f139c363413e5d9e). Acesso em: 10 out. 2020.

SIMMONDS, P. et al. ICTV Virus Taxonomy Profiles: *Flaviviridae*. **The Journal of General Virology**, London, v. 98, n. 1, p. 2-3, 2017. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc5370391>. Acesso em: 15 set. 2020.

STÅHL, K. et al. Natural infection of cattle with an atypical 'HoBi'-like *Pestivirus*-implications for BVD control and for the safety of biological products. **Veterinary Research**, Paris, v. 38, n. 3 p. 517-23, 2007. Disponível em:

<https://www.vetres.org/articles/vetres/pdf/2007/03/v07072.pdf>. Acesso em: 20 ago. 2017.

STURZA, D. A. F. et al. Testes de ELISA e vírus-neutralização na detecção de anticorpos contra o vírus da diarreia viral bovina no leite. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 31, n. 11, p. 985-990, 2011. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/pvb/a/zK4m98rxmYkcmvTvnd6jWMM/?format=html>. Acesso em: 10 abr. 2018.

SWACK, N. S et al. Methods for the Detection of Viruses in Bovine Serum. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 1, n. 2, p. 212-218, 1975. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC275023>. Acesso em: 20 jun. 2018.

SZILLAT, K. P. et al. A CRISPR/CAS9 Generated Bovine CD46-Knockout cell line – a tool elucidate the adaptability of Bovine viral diarrhea viruses (BVDV). **Viruses**, Basel, v. 12, n. 8, p. 859, 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1999-4915/12/8/859>. Acesso em: 07 abr. 2021.

TANG, W. et al. Kappa coefficient: a popular measure of rater agreement. **Shanghai Arch Psychiatry**, v. 27, n. 1, p. 62-67, 2015. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/2464/>. Acesso em: 20 ago. 2021.

TAMURA K.; NEI, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 10, p. 512-526, 1993. Disponível em:

<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023>. Acesso em: 20 out. 2020.

Ün, H. et al. BVDV monitoring by pooling and real time RT-PCR as economical monitoring technique with low BVDV prevalence. **Journal of Advances in VetBio Science and Techniques**, Turkey, v. 7, n. 1, p. 72-79, 2022. Disponível em:

<https://doi.org/10.31797/vetbio.1072218>. Acesso em: 20 mai. 2022.

WALZ, P. H. et al. Bovine viral diarrhea virus: An updated American College of Veterinary Internal Medicine consensus statement with focus on virus biology, hosts, immunosuppression, and vaccination. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Philadelphia, v. 34, n. 5, p. 1690-1706, 2020. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jvim.15816>. Acesso em: 10 jan. 2021.

WALZ, P. H. et al. Control of Bovine Viral Diarrhea Virus in Ruminants. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Philadelphia, v. 24, n. 3, p. 476-486, 2010. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1939-1676.2010.0502.x>. Acesso em: 04 out. 2019.

WEBER, M. N. et al. High frequency of bovine viral diarrhea virus type 2 in Southern Brazil. **Virus Research**, Amsterdam, v. 13, n.1 91, p. 117-124, 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016817021400313X?via%3Dihub>. Acesso em: 15 out. 2017.

WEINSTOCK, D.; BHUDEVI, B.; CASTRO, A. E. Single-Tube Single Reverse Transcriptase PCR Assay for Detection of Bovine Viral Diarrhea Virus in Pooled Bovine Serum. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, n. 1, p. 343-346, 2001. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/JCM.39.1.343-346.2001>. Acesso em: 20 abr. 2017.

YEŞILBAĞ. K.; ALPAY, G.; BECHER, P. Variability and Global Distribution of Subgenotypes of Bovine Viral Diarrhea Virus. **Viruses**, Basel, v. 9, n. 6, p. 128, 2017. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1999-4915/9/6/128>. Acesso em: 15 abr. 2019

ZUCOLOTO, N. Z. et al. A. Persistent bovine viral subgenotype 1d infection in dairy heifer calves born within 38 days interval. **Research Square**, 2021. Preprint. Disponível em: <https://assets.researchsquare.com/files/rs-448091/v1/2eb8f493-4ba0-40ec-b657-b59819d8644b.pdf>. Acesso em: 03 jun. 2021.

## ANEXO I - Certificado de aprovação - CETEA



SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO  
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS  
INSTITUTO BIOLÓGICO

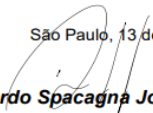
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA-IB

### CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 170/20** sobre o Projeto: “**Estudo de relações genéticas entre membros da Família Flaviviridae: Gêneros Pestivirus e Hepacivirus com a finalidade de identificação e desenvolvimento de kits diagnósticos específicos.**”, sob a responsabilidade de **Liria Hiromi Okuda**, está de acordo com os princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA), pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos (DBCA).

Protocolo aprovado pela *CEUA-IB* em 13 de outubro de 2020.

São Paulo, 13 de outubro de 2020

  
**Ricardo Spacagna Jordão**

Coordenador da *CEUA-IB*

**CEUA - IB**

Registro

Número : 170/20

Livro : 02

Folha : 70

Data: 13/10/20

**Apêndice A - Resultado da RT-qPCR, valores de Cp no pool de 5 amostras e amostra individualizada, utilizando-se o conjunto de primers recomendados pela OMSA, resultados de ELISA direto de competição e valor de densidade optica das amostras de sangue total bovino, imunoperoxidase após 3ª. passagem em células MDBK e sequenciamento de Sanger das amostras de sangue para RT-PCR com os primers 5UTR e seus respectivos isolados em células MDBK.**

Id. Amostra	Primer OMSA			ELISA		IPX	Seq. Sanger	
	Res.	Cp Pool	Cp Individual	Res.	D.O	Res.	ST	ISO
461	POS	34,9	36,36	NEG	0,071	NEG		
554	POS	36,56	35,4	NEG	0,049	NEG		
620	POS	22,46	21,55	POS	2,086	POS		
844	POS	35,96	34,6	NEG	0,044	NEG		
859	POS	22,91	21,51	POS	2,952	POS		
1079	POS	34,81	35,44	NEG	0,072	NEG		
1103	POS	24,7	23,7	POS	2,61	POS		
1118	POS	24,6	23,7	POS	3,285	NEG		
1182	POS	36,58	34,37	NEG	0,048	NEG		
1189	POS	21,9	22,67	POS	2,722	NEG		
1212	POS	23,72	21,74	POS	2,249	NEG		
1214	POS	23,72	34,62	NEG	0,064	NEG		
1215	POS	23,72	34,09	NEG	0,056	NEG		
1272	POS	23,73	21,58	POS	1,75	POS		
1375	POS	27,48	26,37	POS	0,828	NEG		
1445	POS	24,88	27,03	POS	2,562	POS	BVDV 3	
1506	POS	35,88	37,54	NEG	0,06	NEG		
1522	POS	24,83	26,65	POS	2,798	POS		
1612	POS	27,89	27,04	POS	3,156	POS	BVDV 3	
1637	POS	37,3	36,66	NEG	0,049	NEG		
1716	POS	25,9	28,28	POS	4,559	POS		
1718	POS	25,9	NEG 40,28	NEG	0,047	NEG	BovHepV	
1737	POS	27,27	25,89	POS	3,853	NEG	BVDV 3	



1836	POS	37,35	35,97	NEG	0,042	NEG	
1840	POS	25,43	24,93	POS	2,418	NEG	BVDV 3
1847	POS	25,3	24,78	POS	2,191	NEG	
1854	POS	37,31	35,98	NEG	0,069	NEG	BVDV 3
1876	POS	22,4	23,46	POS	2,759	POS	BVDV 3
1879	POS	22,4	24,28	POS	3,227	NEG	BVDV 3
2148	POS	21,5	23,31	POS	3,886	POS	BVDV 3
2519	POS	34,75	34,75	NEG	0,038	NEG	
2520	POS	34,75	33,46	NEG	0,047	NEG	
2652	POS	32,88	31,41	NEG	0,07	NEG	BVDV 3
2780	POS	22,49	22,49	POS	0,827	POS	BVDV- 1d
2810	POS	22,7	20,56	POS	2,686	NEG	BVDV 3
2856	POS	36,56	36,56	NEG	0,06	NEG	
2901	POS	34,94	32,98	NEG	0,048	NEG	
2903	POS	34,94	31,98	NEG	0,058	NEG	
2959	POS	22,98	20,95	POS	1,712	NEG	BVDV 3
3211	POS	26,44	22,69	POS	2,933	NEG	
3714	POS	23,67	36,47	NEG	0,048	NEG	
3717	POS	23,67	34,2	NEG	0,065	NEG	
3719	POS	36,67	35,9	NEG	0,062	NEG	
3884	POS	35,59	33,76	NEG	0,083	NEG	
3923	POS	34,42	33,4	NEG	0,079	NEG	
3952	POS	35,89	35,5	NEG	0,051	NEG	
3953	POS	35,89	33,37	NEG	0,112	NEG	
3954	POS	34,62	31,87	NEG	0,052	NEG	
4296	POS	32,94	32,41	NEG	0,059	NEG	
4297	POS	32,94	36,69	NEG	0,078	NEG	
4343	POS	34,56	36,77	NEG	0,057	NEG	
4344	POS	34,56	34,76	NEG	0,071	NEG	

4362	POS	32,74	31,62	NEG	0,08	NEG	BVDV 3
4414	POS	33,86	34,95	NEG	0,075	NEG	
4416	POS	35,41	34,78	NEG	0,059	NEG	
4436	POS	34,95	34	NEG	0,077	NEG	
4629	POS	23,66	24,36	POS	3,273	POS	BVDV 3
4655	POS	33,74	33,77	NEG	0,09	NEG	
4863	POS	25,22	22,99	POS	2,692	POS	BVDV 3
4881	POS	35,54	35,61	NEG	0,066	NEG	
5023	POS	25,39	23,54	NEG	0,208	NEG	BVDV 3
5024	POS	25,39	36,54	NEG	0,073	NEG	
5089	POS	32,45	33,85	NEG	0,078	NEG	
6793	POS	36,95	36,19	NEG	0,063	NEG	
6836	POS	36,28	35,74	NEG	0,061	NEG	
6844	POS	23,12	22,98	POS	3,569	POS	BVDV 3
6846	POS	35,92	35,97	NEG	0,058	NEG	
7406	POS	30,2	29,88	NEG	0,077	NEG	
7457	POS	22,56	21,39	POS	1,592	NEG	BVDV 3
7927	POS	23,9	24,6	POS	2,275	NEG	BVDV 3
7981	POS	35	33,98	NEG	0,081	NEG	
7983	POS	35	34,66	NEG	0,06	NEG	
8096	POS	24,47	21,87	POS	2,173	NEG	
8162	POS	23,67	35,75	NEG	0,079	NEG	
8163	POS	23,67	34,89	NEG	0,083	NEG	
8165	POS	23,67	35,97	POS	1,547	NEG	
8173	POS	36,99	36,44	NEG	0,075	NEG	
8190	POS	36,64	35,36	NEG	0,058	NEG	
8191	POS	22,29	22,73	POS	2,224	NEG	
8192	POS	22,29	21,87	POS	3,036	POS	BVDV3
8195	POS	22,29	34,95	NEG	0,053	NEG	
8206	POS	26,35	27,55	POS	0,65	NEG	

8211	POS	25,99	24,46	POS	2,443	NEG	
8225	POS	36,96	35,95	NEG	0,101	NEG	
8226	POS	22,47	20,39	POS	1,687	NEG	
8243	POS	36,68	35,82	NEG	0,05	NEG	
8270	POS	26,59	36,76	NEG	0,049	NEG	
8273	POS	35,62	36,8	NEG	0,165	NEG	
8278	POS	23,51	24,58	POS	1,794	NEG	
8279	POS	23,51	26,23	POS	1,721	NEG	BVDV3
8291	POS	24,58	36,98	NEG	0,051	NEG	
8293	POS	24,58	26,2	POS	3,085	NEG	
8333	POS	33,8	33,86	NEG	0,076	NEG	
8526	POS	25,52	25,52	POS	1,776	NEG	
8555	POS	23,64	22,89	POS	1,786	POS	
8609	POS	33,5	32,76	NEG	0,067	IMP	
8635	POS	22,23	21,46	POS	0,427	NEG	
8639	POS	23,27	21,7	POS	2,893	NEG	
8646	POS	24,51	23,45	POS	2,008	NEG	
8658	POS	33,71	32,68	NEG	0,08	NEG	
8663	POS	22,84	19,64	POS	1,549	NEG	
8706	POS	25,99	35,42	NEG	0,072	NEG	
8710	POS	25,99	21,95	POS	2,898	NEG	
8729	POS	31,55	30,95	NEG	0,062	NEG	
8738	POS	33,85	32,65	NEG	0,061	NEG	
8760	POS	23,99	20,96	POS	2,996	IMP	
8770	POS	24,64	22,71	POS	1,78	IMP	
8799	POS	24,23	21,94	POS	1,158	IMP	
8807	POS	22,97	23,68	POS	1,856	IMP	BVDV 3
8809	POS	22,97	24,49	POS	2,094	NEG	BVDV 3
8829	POS	23,5	36,42	NEG	0,072	NEG	
8830	POS	23,5	22,38	POS	3,078	NEG	BVDV 3

8834	POS	22,75	21,56	POS	1,073	NEG	BVDV 3
8869	POS	23,34	21,53	POS	2,597	NEG	BVDV 3
8871	POS	21,52	35,66	NEG	0,06	NEG	
8873	POS	21,52	20,49	POS	0,992	POS	BVDV 3
8876	POS	23,46	21,4	POS	0,905	IMP	
8881	POS	3,61	21,69	POS	0,916	IMP	
8884	POS	23,61	34,79	NEG	0,074	NEG	
8899	POS	23,57	35,82	NEG	0,102	NEG	
8900	POS	23,57	21,7	NEG	0,861	NEG	
8901	POS	22,47	22,41	POS	3,134	POS	BVDV 3
8902	POS	22,47	21,52	POS	3,146	NEG	BVDV 3
8927	POS	23,69	34,74	NEG	0,088	NEG	
8930	POS	23,69	21,73	POS	1,709	NEG	BVDV 3
8970	POS	25,2	23,74	POS	1,663	NEG	BVDV 3
8974	POS	23,17	21,3	POS	2,298	NEG	
8988	POS	24,38	27,48	NEG	0,016	NEG	
24570/19	POS	*	28,73	POS	2,657	POS	BVDV 3 BVDV3

**Apêndice B** - Resultado da RT-qPCR, valores de Cp no pool desmembrados utilizando-se o conjunto de primers recomendados pela OMSA, Oligonucleotídeos descritos por BHUDEVI; WEINSTOCK (2001) e o kit comercial Virotype.

Número da amostra	OMSA	BVD1	BVD2	VIROTYPE			Seq. Sanger
				RES Ct (FAM)	Ct (HEX)	RE	
186	NEG	NEG	NEG	POS (35,24)	19,07	POS	
187	NEG	NEG	NEG	NEG (36,99)	23,49	NEG	
188	NEG	NEG	NEG	NEG (37,31)	24,46	NEG	
189	NEG	NEG	NEG	NEG (37,82)	24,69	NEG	
190	NEG	NEG	NEG	NEG (36,70)	24,15	NEG	
431	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,71	NEG	
432	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,48	NEG	
433	NEG	NEG	NEG	NEG (37,89)	24,87	NEG	
434	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	23,11	NEG	
435	NEG	NEG	NEG	NEG (39,95)	24,87	NEG	
461	POS (36,36)	NEG	NEG	POS (35,24)	25,32	POS	
462	NEG	NEG	NEG	POS (35,95)	24,93	POS	
463	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	25,42	NEG	
464	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	25,93	NEG	
465	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,99	NEG	
551	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	25,34	NEG	
552	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	23,70	NEG	
553	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,57	NEG	
554	POS (35,4)	NEG	NEG	NEG (0)	21,74	NEG	
555	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	25,,89	NEG	
616	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	36,59	NEG	
617	NEG	NEG	NEG	NEG (37,12)	25,68	NEG	
618	NEG	NEG	NEG	NEG	25,37	NEG	
619	NEG	NEG	NEG	POS (34,85)	22,34	POS	
620	POS (21,55)	POS 35,84	NEG	POS (23,49)	22,26	POS	
841	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,79	NEG	
842	NEG	POS 35,7	NEG	NEG (0)	24,98	NEG	
843	NEG	NEG	NEG	NEG (37,43)	24,36	NEG	
844	POS (34,6)	NEG	NEG	NEG (0)	24,34	NEG	
845	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,96	NEG	
856	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,9	NEG	
857	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	22,86	NEG	
858	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	23,59	NEG	
859	POS (21,51)	NEG	NEG	POS (21,79)	26,52	POS	
860	NEG	NEG	NEG	NEG (37,54)	25,44	NEG	

921	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,52	NEG	
922	NEG	NEG	NEG	NEG (36,85)	25,9	NEG	
923	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	26,64	NEG	
924	NEG	NEG	NEG	NEG (37,4)	25,71	NEG	
925	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	23,89	NEG	
1076	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	22,85	NEG	
1077	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	25,04	NEG	
1078	NEG	NEG	NEG	POS (35,84)	25,8	POS	
1079	POS (35,44)	NEG	NEG	NEG (36,68)	25,36	NEG	
1080	NEG	NEG	NEG	POS (33,65)	15,32	POS	
1101	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	(0)	NEG	
1102	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	21,82	NEG	
1103	POS (23,7)	NEG	NEG	POS (24,75)	24,21	POS	
1104	NEG	NEG	NEG	NEG (37,45)	24,55	NEG	
1105	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,5	NEG	
1116	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	25,71	NEG	
1117	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,74	NEG	
1118	POS (23,7)	NEG	NEG	POS (22,73)	24,1	POS	
1119	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,39	NEG	
1120	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	25,48	NEG	
1161	NEG	NEG	NEG	POS (35,19)	0	INC	
1162	NEG	NEG	NEG	NEG (37,82)	23,56	NEG	
1163	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,31	NEG	
1164	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,97	NEG	
1165	NEG	NEG	NEG	NEG (36,81)	25,67	NEG	
1181	NEG	POS(34,94)	POS (38,63)	NEG (0)	25,92	NEG	
1182	POS (34,37)	NEG	NEG	NEG (37,8)	24,81	NEG	
1183	NEG	NEG	NEG	NEG (36,91)	25	NEG	
1184	NEG	NEG	NEG	NEG (37,77)	23,83	NEG	
1185	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	23,35	NEG	
1186	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	25,81	NEG	
1187	NEG	NEG	NEG	NEG (36,83)	24,45	NEG	
1188	NEG	NEG	NEG	NEG (37,42)	24,94	NEG	
1189	POS (22,67)	NEG	NEG	POS (22,49)	25,51	POS	
1190	NEG	NEG	NEG	NEG (37,64)	25,43	NEG	
1211	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,92	NEG	
1212	POS (21,74)	NEG	NEG	POS (21,74)	22,98	POS	
1213	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	23,98	NEG	
1214	POS (34,62)	NEG	NEG	POS (34,62)	24,14	POS	
1215	POS (34,09)	NEG	NEG	NEG (0)	23,99	NEG	
1231	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	25,56	NEG	
1232	NEG	NEG	NEG	NEG (37,45)	23,38	NEG	
1233	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	25,18	NEG	
1234	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	25,99	NEG	
1235	NEG	POS(35,40)	NEG	NEG (0)	24,68	NEG	

1271	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	23,18	NEG	
1272	POS (21,58)	NEG	NEG	POS (21,90)	24,15	POS	
1273	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	3596	NEG	
1274	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,92	NEG	
1275	NEG	NEG	NEG	NEG (36,51)	24,01	NEG	
1331	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	23,87	NEG	
1332	NEG	NEG	NEG	NEG (37,49)	24,8	NEG	
1333	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,61	NEG	
1334	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	23,55	NEG	
1335	NEG	NEG	NEG	POS (35,41)	24,3	POS	
1371	NEG	NEG	NEG	NEG (36,23)	21,01	NEG	
1372	NEG	NEG	NEG	NEG (36,3)	20,62	NEG	
1373	NEG	NEG	NEG	NEG (37,4)	24,58	NEG	
1374	NEG	NEG	NEG	NEG (36,38)	23,89	NEG	
1375	POS (26,37)	NEG	NEG	NEG (0)	23,55	NEG	
1441	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	23,42	NEG	
1442	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,5	NEG	
1143	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	23,65	NEG	
1444	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	23,85	NEG	
1445	POS (27,03)	NEG	NEG	POS (25,16)	23,77	POS	BVDV3
1506	POS (37,54)	NEG	NEG	POS (35,76)	24,27	POS	
1507	NEG	POS(38,27)	POS (37,84)	NEG (0)	24,5	NEG	
1508	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,83	NEG	
1509	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,7	NEG	
1510	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	23,66	NEG	
1511	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	25,4	NEG	
1512	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,33	NEG	
1513	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,93	NEG	
1514	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,82	NEG	
1515	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,89	NEG	
1521	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	23,79	NEG	
1522	POS (26,65)	NEG	NEG	POS (22,71)	21,9	POS	
1523	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,48	NEG	
1524	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,89	NEG	
1525	NEG	POS (38,7)	NEG(37,90)	NEG (0)	24,55	NEG	
1611	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,77	NEG	
1612	POS (27,04)	NEG	NEG	POS (25,1)	24,88	POS	BVDV3
1613	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,53	NEG	
1614	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	23,73	NEG	
1615	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	27,9	NEG	
1636	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	23,74	NEG	
1637	POS (36,66)	NEG	NEG	NEG (0)	23,91	NEG	
1638	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,84	NEG	
1639	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	25,09	NEG	
1640	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,48	NEG	
1661	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,85	NEG	
1662	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	23,92	NEG	

1663	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	23,73	NEG	
1664	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	23,38	NEG	
1665	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	23,72	NEG	
1716	POS (28,28)	NEG	NEG	POS (25,51)	24,27	POS	
1718	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,34	NEG	BovHepV
1719	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,73	NEG	
1720	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,57	NEG	
1731	NEG	NEG	NEG	NEG (36,94)	23,52	NEG	
1732	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,44	NEG	
1733	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,2	NEG	
1734	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	23,63	NEG	
1735	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,63	NEG	
1736	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,52	NEG	
1737	POS (25,89)	NEG	NEG	POS (23,96)	24,56	POS	BVDV3
1738	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	23,82	NEG	
1739	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	22,61	NEG	
1740	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,47	NEG	BVDV3
1781	NEG	NEG	NEG	NEG (36,82)	25,21	NEG	
1782	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,79	NEG	
1783	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,28	NEG	
1784	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,76	NEG	
1785	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	25,34	NEG	
1836	POS (35,97)	NEG	NEG	NEG (36,62)	25,26	NEG	
1837	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,08	NEG	
1838	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	23,89	NEG	
1839	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,77	NEG	
1840	POS (24,93)	NEG	NEG	POS (23,71)	24,47	POS	BVDV3
1846	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,91	NEG	
1847	POS (24,78)	NEG	NEG	POS (23,6)	26,72	POS	
1848	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	26,17	NEG	
1849	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	25,50	NEG	
1850	NEG	POS(36,42)	POS (38,98)	NEG (0)	23,49	NEG	
1851	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,64	NEG	
1852	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,13	NEG	
1853	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,04	NEG	
1854	POS (35,98)	NEG	NEG	POS (34,59)	24,35	POS	BVDV3
1855	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	25,9	NEG	
1876	POS (23,46)	NEG	NEG	POS (22,69)	24,15	POS	
1877	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,49	NEG	
1878	NEG	NEG	NEG	POS (35,44)	24,78	POS	
1879	POS (24,28)	NEG	NEG	POS (23,40)	24,16	POS	BVDV3
1880	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	23,57	NEG	
2006	NEG	NEG	NEG	NEG (36,58)	24,72	NEG	
2007	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	8,09	NEG	
2008	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	11,69	NEG	



2009	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	0	INC	
2010	NEG	NEG	POS 26,08	NEG (0)	0	INC	
2146	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	8,62	NEG	
2147	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	9,27	NEG	
2148	POS (23,31)	NEG	NEG	POS (22,53)	0	POS	BVDV3
2149	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	8,55	8,55	
2150	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	7,89	NEG	
2516	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	9,95	NEG	
2517	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	16,74	NEG	
2518	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	6,67	NEG	
2519	POS (34,75)	NEG	NEG	NEG (0)	0	INC	
2520	POS (33,46)	NEG	NEG	POS (33,81)	18,67	POS	
2541	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	11,74	NEG	
2542	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	0	INC	
2543	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	0	INC	
2544	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	0	INC	
2545	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	12,06	NEG	
2641	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	9,8	NEG	
2642	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	9,89	NEG	
2643	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	0	INC	
2644	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	0	INC	
2645	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	0	INC	
2651	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	0	INC	
2652	POS (31,41)	POS 35,93	NEG	POS (31,77)	11,34	POS	BVDV3
2653	NEG	NEG	NEG	NEG	6,03	NEG	
2654	NEG	NEG	NEG	NEG	9,17	NEG	
2655	NEG	NEG	NEG	NEG	0	INC	
2780	POS (22,49)	NEG	NEG	NEG (0)	0	INC	BVDV1d
2806	NEG	NEG	NEG	NEG	0	INC	
2807	NEG	NEG	NEG	NEG (37,81)	12,18	NEG	
2808	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	0	INC	
2809	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	9	NEG	
2810	POS (20,56)	NEG	NEG	POS (21,84)	8,21	POS	BVDV3
2856	POS (36,56)	NEG	NEG	NEG	0	NEG	
2901	POS (32,98)	NEG	NEG	POS (35,25)	11,29	POS	
2902	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	0	INC	
2903	POS (31,98)	NEG	NEG	NEG (0)	11,69	NEG	
2904	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	0	INC	
2905	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	2,67	NEG	
2956	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	9,32	NEG	
2957	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	12	NEG	
2958	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	0	INC	
2959	POS (20,95)	NEG	NEG	POS (23,36)	0	POS	BVDV3
2960	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	0	INC	
3031	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	0	INC	

3032	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	0	INC	
3033	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	0	INC	
3034	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	12,8	NEG	
3035	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	20,58	NEG	
3196	NEG	NEG	NEG	NEG (36,9)	4,88	NEG	
3197	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	0	INC	
3198	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	0	INC	
3199	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	22,85	NEG	
3200	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	12,04	NEG	
3211	POS (22,69)	NEG	NEG	POS (24,27)	0	POS	
3212	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	0	INC	
3213	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	0	INC	
3214	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	9,89	NEG	
3215	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	0	INC	
3246	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	0	INC	
3247	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	10,13	NEG	
3248	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	12,65	NEG	
3249	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	18,26	NEG	
3250	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	7,54	NEG	
3351	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	0	INC	
3352	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	0	INC	
3353	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	0	INC	
3354	NEG	NEG	NEG	POS (33,62)	7,06	POS	
3355	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	0	INC	
3711	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	9,71	NEG	
3712	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	0	INC	
3713	NEG	NEG	NEG	POS (22,12)	6,83	POS	
3714	POS (36,47)	NEG	NEG	NEG (0)	6,69	NEG	
3715	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	0	INC	
3716	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	0	INC	
3717	POS (34,2)	NEG	NEG	POS (35,39)	0	INC	
3718	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	0	INC	
3719	POS (35,9)	NEG	NEG	NEG (0)	8,73	NEG	
3720	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	9,87	NEG	
3881	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	0	INC	
3882	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	10,84	NEG	
3883	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	0	INC	
3884	POS (33,76)	NEG	NEG	POS (34,86)	11,89	POS	
3885	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	7,63	NEG	
3921	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	8,77	NEG	
3922	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	0	INC	
3923	POS (33,4)	NEG	NEG	POS (33,36)	0	INC	
3924	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	11,47	NEG	
3925	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	14,97	NEG	
3951	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	0	INC	

3952	POS (35,5)	NEG	NEG	NEG (0)	0	INC	
3953	POS (33,37)	NEG	NEG	POS (34,53)	0	INC	
3954	POS (31,87)	NEG	NEG	NEG (0)	0	INC	
3955	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	8,57	NEG	
3986	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	22,82	NEG	
3987	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	23,57	NEG	
3988	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	23,92	NEG	
3989	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,64	NEG	
3990	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,26	NEG	
4176	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,4	NEG	
4177	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	23,93	NEG	
4178	NEG	NEG	NEG	NEG (37,65)	24,46	NEG	
4179	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	21,89	NEG	
4180	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	23,95	NEG	
4296	POS (32,41)	NEG	NEG	POS (31,64)	24,08	POS	
4297	POS (36,69)	NEG	NEG	NEG (0)	24,69	NEG	
4298	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,71	NEG	
4299	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,89	NEG	
4300	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,87	NEG	
4341	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	23,85	NEG	
4342	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	25,57	NEG	
4343	POS (36,77)	NEG	NEG	POS (35,71)	25,69	POS	
4344	POS (34,76)	NEG	NEG	POS (34,47)	24,87	POS	
4345	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,81	NEG	
4361	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	25,38	NEG	
4362	POS (31,62)	NEG	NEG	POS (31,31)	25,09	POS	BVDV3
4363	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,87	NEG	
4364	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	0	INC	
4365	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	23,25	NEG	
4411	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,42	NEG	
4412	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,75	NEG	
4413	NEG	NEG	NEG	NEG (37,29)	24,64	NEG	
4414	POS (34,95)	NEG	NEG	POS (33,97)	24,84	POS	
4416	POS (34,78)	NEG	NEG	POS (35,41)	24,43	POS	
4417	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	22,85	NEG	
4418	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	22,98	NEG	
4419	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	23,81	NEG	
4420	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,59	NEG	
4436	POS (34)	NEG	NEG	POS (32,98)	24,89	POS	
4437	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,75	NEG	
4438	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	26,12	NEG	
4439	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	0	INC	
4440	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	23,37	NEG	
4521	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	0	INC	
4522	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,36	NEG	

4523	NEG	NEG	NEG	NEG (37,86)	24,91	NEG	
4524	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	23,70	NEG	
4525	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,21	NEG	
4531	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,91	NEG	
4532	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,64	NEG	
4533	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	23,61	NEG	
4534	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	25,29	NEG	
4535	NEG	NEG	NEG	POS (33,98)	24,29	POS	
4551	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	23,89	NEG	
4552	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,97	NEG	
4553	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,59	NEG	
4554	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,78	NEG	
4555	NEG	NEG	NEG	NEG (37,67)	23,75	NEG	
4626	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	20,48	NEG	
4627	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	23,73	NEG	
4628	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,70	NEG	
4629	POS (24,36)	NEG	NEG	POS (22,91)	23,90	POS	BVDV3
4630	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	25,20	NEG	
4651	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	25,23	NEG	
4652	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,91	NEG	
4653	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,45	NEG	
4654	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	21,71	NEG	
4655	POS (33,77)	NEG	NEG	POS (33,36)	22,64	POS	
4861	NEG	NEG	NEG	NEG	24,39	NEG	
4862	NEG	NEG	NEG	NEG	23,9	NEG	
4863	POS (22,99)	NEG	NEG	POS (22,34)	24,51	POS	BVDV3
4864	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,99	NEG	
4865	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	25,32	NEG	
4881	POS (35,61)	NEG	NEG	POS (35,56)	24,46	POS	
4882	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	17,84	NEG	
4883	NEG	NEG	NEG	NEG (37,94)	24,46	NEG	
4884	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	21,55	NEG	
4885	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	23,92	NEG	
4936	NEG	NEG	NEG	NEG (37,76)	25,50	NEG	
4937	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	0	INC	
4938	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,72	NEG	
4939	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,2	NEG	
4940	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	28,60	NEG	
5021	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	23,14	NEG	
5022	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,77	NEG	
5023	POS (23,54)	NEG	NEG	POS (23)	23,95	POS	BVDV3
5024	POS (36,54)	NEG	NEG	NEG (36,52)	25,93	NEG	
5025	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	23,46	NEG	
5086	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	23,92	NEG	
5087	NEG	NEG	NEG	NEG (37,37)	23,81	NEG	

5088	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	22,56	NEG	
5089	POS (33,85)	NEG	NEG	POS (32,21)	24,79	POS	
5090	NEG	NEG	NEG	NEG (37,58)	24,47	NEG	
5111	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,2	NEG	
5112	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	23,36	NEG	
5113	NEG	NEG	NEG	NEG (37,39)	24,86	NEG	
5114	NEG	NEG	NEG	NEG (36,86)	23,66	NEG	
6346	NEG	NEG	NEG	POS (34,84)	18,29	POS	
6347	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	23,69	NEG	
6348	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	23,69	NEG	
6349	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,72	NEG	
6350	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,52	NEG	
6781	NEG	NEG	NEG	NEG (36,43)	24,29	NEG	
6782	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,08	NEG	
6783	NEG	NEG	NEG	POS (35,9)	24,11	POS	
6784	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	22,68	NEG	
6785	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,63	NEG	
6786	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,34	NEG	
6787	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	0	INC	
6788	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	23,41	NEG	
6789	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,72	NEG	
6790	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,25	NEG	
6791	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	23,63	NEG	
6792	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,08	NEG	
6793	POS (36,19)	NEG	NEG	POS (34,87)	24,09	POS	
6794	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,68	NEG	
6795	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,74	NEG	
6836	POS (35,74)	NEG	NEG	NEG (0)	21,29	NEG	
6837	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,17	NEG	
6838	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,73	NEG	
6839	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	23,61	NEG	
6840	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,59	NEG	
6841	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,82	NEG	
6842	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	25,18	NEG	
6843	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,44	NEG	
6844	POS (22,98)	NEG	NEG	POS (23,83)	23,91	POS	BVDV3
6845	NEG	NEG	NEG	NEG (36,86)	24,63	NEG	
6846	POS (35,97)	NEG	NEG	NEG (36,49)	24,79	NEG	
6847	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	22,7	NEG	
6848	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	2373	NEG	
6849	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	23,86	NEG	
6850	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,47	NEG	
6881	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	23,93	NEG	
6882	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,86	NEG	
6883	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,88	NEG	

6884	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	25,39	NEG	
6885	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	0	NEG	
7406	POS (29,88)	NEG	NEG	POS (34,31)	23,58	POS	
7407	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	0	INC	
7408	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	25,5	NEG	
7409	NEG	NEG	NEG	POS (35,55)	23,59	NEG	
7410	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	23,93	NEG	
7426	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	26,65	NEG	
7427	NEG	NEG	NEG	NEG (36,84)	24,15	NEG	
7428	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	23,37	NEG	
7429	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	22,86	NEG	
7430	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,43	NEG	
7456	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	20,79	NEG	
7457	POS (21,39)	NEG	NEG	POS (22,47)	23,77	POS	BVDV3
7458	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	25,49	NEG	
7459	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	25,43	NEG	
7460	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	25,31	NEG	
7926	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	22,83	NEG	
7927	POS (24,6)	NEG	NEG	POS (25,45)	21,83	POS	BVDV3
7928	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	23,98	NEG	
7929	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,16	NEG	
7930	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	25,33	NEG	
7941	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,48	NEG	
7942	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	25,32	NEG	
7943	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	0	INC	
7944	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	21,00	NEG	
7945	NEG	NEG	NEG	NEGI (0)	22,71	NEG	
7981	POS (33,98)	NEG	NEG	NEG (37,2)	25,21	NEG	
7982	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	23,85	NEG	
7983	POS (34,66)	NEG	NEG	NEG (36,94)	24,15	NEG	
7984	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,84	NEG	
7985	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,99	NEG	
7991	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,84	NEG	
7992	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	22,32	NEG	
7993	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	23,70	NEG	
7994	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	23,99	NEG	
7995	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	23,97	NEG	
8031	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	25,09	NEG	
8032	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	23,77	NEG	
8033	NEG	NEG	NEG	NEG (36,46)	24,44	NEG	
8034	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,56	NEG	
8035	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	21,31	NEG	
8096	POS (21,87)	NEG	NEG	POS (23,88)	23,65	POS	
8097	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,37	NEG	
8098	NEG	NEG	POS (33,41)	NEG (0)	23,09	NEG	

8099	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	23,91	NEG	
8100	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	23,53	NEG	
8161	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	23,80	NEG	
8162	POS (34,89)	NEG	NEG	NEG (0)	24,18	NEG	
8163	POS (34,89)	NEG	NEG	NEG (37,46)	22,44	NEG	
8164	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	8,79	NEG	
8165	POS (35,97)	NEG	NEG	POS (23,58)	25,96	POS	
8166	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	22,71	NEG	
8167	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	0	NEG	
8168	NEG	NEG	NEG	NEG	24,01	NEG	
8169	NEG	NEG	NEG	NEG	23,50	NEG	
8173	POS (36,44)	NEG	NEG	NEG	0	NEG	
8190	POS (35,36)	NEG	NEG	NEG	0	NEG	
8191	POS (22,73)	NEG	NEG	POS (25,05)	0	POS	
8192	POS (21,87)	NEG	NEG	POS (22,01)	0	POS	
8195	POS (34,95)	NEG	NEG	NEG (0)	0	INC	
8206	POS (27,55)	NEG	NEG	POS (26,78)	27,91	POS	
8211	POS (24,46)	NEG	NEG	POS (22,79)	26,37	POS	
8225	POS (35,95)	NEG	NEG	POS (34,95)	27,72	POS	
8226	POS (20,39)	NEG	NEG	POS (23,28)	33,97	POS	
8243	POS (35,82)	NEG	NEG	NEG (0)	36,69	NEG	
8270	POS (36,76)	NEG	NEG	NEG (0)	26,62	NEG	
8273	POS (36,80)	NEG	NEG	NEG (0)	30,79	NEG	
8278	POS (24,58)	NEG	NEG	POS (28,46)	31,81	POS	
8279	POS (26,23)	NEG	NEG	POS (28,46)	25,93	POS	BVDV3
8291	POS (36,98)	NEG	NEG	POS (26,94)	17,51	POS	
8293	POS (26,2)	NEG	NEG	POS (25,58)	27,94	POS	
8333	POS (33,86)	NEG	NEG	POS (35,70)	29,90	POS	
8526	POS (25,52)	NEG	NEG	POS (27,06)	28,52	POS	
8555	POS (22,89)	NEG	NEG	POS (26,48)	27,31	POS	
8609	POS (32,76)	NEG	NEG	NEG (0)	28,58	NEG	
8635	POS (21,46)	NEG	NEG	POS (29,81)	32,76	NEG	
8639	POS (21,70)	NEG	NEG	NEG (0)	27,30	NEG	
8646	POS (23,45)	NEG	NEG	POS (29,81)	25,65	POS	
8658	POS (32,68)	NEG	NEG	NEG (0)	24,32	NEG	
8663	POS (32,68)	NEG	NEG	NEG (0)	28,10	NEG	
8706	POS (35,42)	NEG	NEG	NEG (0)	26,97	NEG	
8710	POS (21,95)	NEG	NEG	POS (30,62)	32,74	NEG	
8729	POS (30,95)	NEG	NEG	NEG (0)	29,31	NEG	
8738	POS (32,65)	NEG	NEG	NEG (0)	28,64	NEG	
8760	POS (20,96)	NEG	NEG	POS (30,46)	29,98	POS	
8770	POS (22,71)	NEG	NEG	POS (29,91)	34,38	POS	
8799	POS (21,94)	NEG	NEG	NEG (0)	22,86	NEG	
8806	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	22,94	NEG	
8807	POS (23,68)	NEG	NEG	POS (24,92)	22,10	POS	BVDV3
8808	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	23,15	NEG	

8809	POS (24,49)	NEG	NEG	POS (25,72)	22,51	POS	BVDV3
8810	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	22,78	NEG	
8811	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	23,09	NEG	
8812	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	23,65	NEG	
8813	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	23,57	NEG	
8814	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	22,99	NEG	
8815	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	22,57	NEG	
8826	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	23,24	NEG	
8827	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	23,08	NEG	
8828	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	23,68	NEG	
8829	POS (36,42)	NEG	NEG	NEG (0)	23,11	NEG	
8830	POS (22,38)	NEG	NEG	POS (23,83)	23,6	POS	BVDV3
8831	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	23,17	NEG	
8832	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	20,13	NEG	
8833	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,09	NEG	
8834	POS (21,56)	NEG	NEG	POS (22,07)	24,56	POS	BVDV3
8835	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	22,83	NEG	
8866	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	23,69	NEG	
8867	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	23,09	NEG	
8868	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	23,41	NEG	
8869	POS (21,53)	NEG	NEG	POS (23,47)	21,94	NEG	BVDV3
8870	NEG	NEG	NEG	NEG	0	INC	
8871	POS (35,66)	NEG	NEG	NEG (0)	23,49	NEG	
8872	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	23,99	NEG	
8873	POS (20,49)	NEG	NEG	POS (20,49)	23,41	POS	BVDV3
8874	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	23,26	NEG	
8875	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,54	NEG	
8876	POS (21,4)	NEG	NEG	POS (23,37)	22,60	POS	
8877	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	21,57	NEG	
8878	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	22,77	NEG	
8879	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	22,54	NEG	
8880	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	22,93	NEG	
8881	POS (21,69)	NEG	NEG	POS (22,84)	23,96	POS	
8882	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	23,56	NEG	
8883	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,66	NEG	
8884	POS (34,79)	NEG	NEG	NEG (0)	23,69	NEG	
8885	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	22,01	NEG	
8896	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	23,29	NEG	
8897	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	23,62	NEG	
8898	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	22,94	NEG	
8899	POS (35,82)	NEG	NEG	NEG (0)	22,51	NEG	
8900	POS (21,70)	NEG	NEG	POS (21,60)	22,63	POS	
8901	POS (22,41)	NEG	NEG	POS (23,45)	22,62	POS	BVDV3
8902	POS (21,52)	NEG	NEG	POS (22,61)	24,52	POS	BVDV3
8903	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	22,53	NEG	
8904	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	21,85	NEG	



8905	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,25	NEG	
8925	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	25,28	NEG	
8927	POS (34,74)	NEG	NEG	NEG (36,56)	23,95	NEG	
8928	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,57	NEG	
8929	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	23,38	NEG	
8930	POS (21,73)	NEG	NEG	POS (23,68)	23,60	POS	BVDV3
8951	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	22,44	NEG	
8952	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	22,75	NEG	
8953	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	23,33	NEG	
8954	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	23,77	NEG	
8955	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,36	NEG	
8961	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	22,64	NEG	
8962	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,78	NEG	
8963	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	23,3	NEG	
8964	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	21,45	NEG	
8965	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	21,45	NEG	
9866	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	21,51	NEG	
8967	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	22,84	NEG	
8968	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	23,78	NEG	
8969	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	23,38	NEG	
8970	POS (23,74)	NEG	NEG	POS (23,54)	22,61	POS	BVDV3
8971	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	23,62	NEG	
8972	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	23,48	NEG	
8973	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,52	NEG	
8974	POS (21,3)	NEG	NEG	POS (20,65)	22,94	POS	
8975	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	22,62	NEG	
8986	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	22,70	NEG	
8987	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	22,63	NEG	
8988	POS (27,48)	NEG	NEG	POS (26,85)	22,82	POS	
8989	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	22,88	NEG	
8990	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	24,42	NEG	
9006	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	23,76	NEG	
9008	NEG	NEG	NEG	NEG (0)	23,85	NEG	
24570	POS (28,73)	NEG	NEG	POS (27,8)	24,36	POS	BVDV3