



**Universidade Federal do Pará
Universidade Federal Rural da Amazônia
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Amazônia Oriental
Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal**

Rafaela Nunes Ferreira

**Prevalência da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR) em
touro bubalinos em propriedades localizadas no Amapá e
Ilha de Marajó (PA), Brasil**

**Belém
2009**

Rafaela Nunes Ferreira

**Prevalência da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR) em
touro bubalinos em propriedades localizadas no Amapá e
Ilha de Marajó (PA), Brasil**

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal, Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural, Universidade Federal do Pará. Universidade Federal Rural da Amazônia. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Amazônia Oriental.

Área de concentração: Produção Animal.

Orientador Prof. Haroldo Francisco Lobato Ribeiro.

**Belém
2009**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) –
Biblioteca Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural / UFPA, Belém-PA**

Nunes Ferreira, Rafaela

Prevalência da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR) em touros bubalinos em propriedades localizadas no Amapá e Ilha de Marajó (PA), Brasil / Rafaela Nunes Ferreira; orientador, Haroldo Francisco Lobato Ribeiro - 2009.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Pará, Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Belém, 2009.

1. Búfalo – Doenças - Pará. 2. Búfalo – Doenças - Amapá 3. Produção animal. I. Título.

CDD – 22.ed. 636.29381

Rafaela Nunes Ferreira

**Prevalência da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR) em
touro bubalinos em propriedades localizadas no Amapá e
Ilha de Marajó (PA), Brasil**

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural. Universidade Federal do Pará. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Amazônia Oriental. Universidade Federal Rural da Amazônia.
Área de concentração: Produção Animal.

Data da aprovação. Belém - PA: _____ / _____ / _____

Banca Examinadora

Profª. Dra. Conceição de Maria Almeida Vieira
Universidade Federal Rural da Amazônia

Profª. Dra. Hilma Lúcia Tavares Dias
Universidade Federal do Pará

Prof. Dr. Washington Luiz Assunção Pereira
Universidade Federal Rural da Amazônia

Aos meus pais com
todo carinho

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Haroldo Francisco Lobato Ribeiro pela orientação competente, conhecimento transmitido, conselhos, críticas, amizade, enfim pela sua presença constante nas viagens e no dia a dia.

Aos colegas do Laboratório de Reprodução Animal da Universidade Federal Rural da Amazônia, os quais incansavelmente trabalharam para a realização das colheitas de material: Elizabeth Barbosa, Henry Aiala, Bruno Pinto, Dárcio Nunes, Kim Nunes, Fúlvio Florenzano, Anderson Farias, Thaís Marques, Onel Solano.

Aos proprietários das fazendas, por permitirem a realização dos exames em seus animais e receberem a nossa equipe em suas propriedades de forma amigável: Prof. Marcos Rocha, William Souza, Rodolfo Nunes, Paulo Costa, José Mourão, Ival Lobato.

Aos funcionários da Central de Reprodução Animal da Universidade Federal do Pará, pelos ensinamentos acerca das técnicas de reprodução.

Às Prof.^{as} Conceição e Hilma, pelos conselhos e dicas dadas acerca das técnicas, orientações que foram fundamentais para a execução do trabalho.

À Dr^a Lourdes e a estagiária Jaínara do Instituto Evandro Chagas pelo grande apoio e ensinamento acerca das técnicas laboratoriais.

Ao Dr. Munis Carneiro pela ajuda na realização de estágio no Instituto Evandro Chagas

Ao meu companheiro Loris Santos pela ajuda com os gráficos, tabelas e referências, além da paciência nas horas de dificuldade no trabalho.

À minha família pelo apoio financeiro e emocional, pela confiança depositada.

RESUMO

Amostras sanguíneas de 188 touros bubalinos, criados em sistema extensivo em áreas de várzea, sem controle sanitário e reprodutivo eficiente, com idade de dois a 15 anos, das raças Murrah, Mediterrâneo e seus mestiços, foram coletadas em tubos *vacutainer* esterilizados de 5 mL e avaliadas quanto a presença de anticorpos para HBV-1, através do teste de soroneutralização. Dos 188 touros examinados, somente de 51 foi possível obter amostras de sêmen, as quais foram submetidas à análise de RT-PCR. Informações acerca da idade, raça e escore de condição corporal (ECC) dos animais foram observadas. A estatística descritiva foi aplicada através da distribuição proporcional e determinação dos quadris e medianas de variáveis categóricas. O estudo foi realizado em animais de oito propriedades, localizadas nos estados do Pará e Amapá, região Norte do Brasil, encontrando-se distribuídos da seguinte forma: nos municípios de Itaubal do Piriri (N=59), Cutias do Araguari (N=33), Tartarugalzinho (N=14) e Bailique, distrito de Macapá (N=21), totalizando 127 animais no Amapá. Os 73 restantes localizavam-se no estado do Pará nos municípios de Soure (N=38) e Muaná (N=23), Ilha do Marajó. A análise estatística constou da aplicação do teste Binomial para comparar a prevalência do HBV-1 nas propriedades examinadas nos municípios, e comparar a prevalência entre as classes de raça, escore corporal e idade. Para avaliar a distribuição da titulação de anticorpos para HBV-1, entre Amapá e Marajó, foi utilizado o teste estatístico de Mann-Whitney. Todos os procedimentos foram executados pelo programa BioEstat 5, com nível de significância $\alpha=0.05$. Em todas as propriedades estudadas havia animais positivos, e 82,4% das 188 amostras foram sorologicamente positivas. Entre as raças mediterrâneo e Murrah e seus mestiços, houve diferença real de prevalência somente entre as raças Mediterrâneo e Murrah ($p=0,0004$). Houve influência do ECC na prevalência de touros sorologicamente positivos, sendo que os de ECC=3 apresentaram maior prevalência que os de ECC < 3 ($p=0.009$). A prevalência conforme a idade mostrou que existe uma diferença significativa ($p<0.0001$) entre os animais com dois anos e os touros com mais de dois anos de idade, havendo um incremento gradativo das taxas de infecção com o avançar da idade. A prevalência no estado do Amapá foi significativamente maior que no Pará. As propriedades localizadas nos municípios de Cutias do Araguari, Tartarugalzinho e Bailique (Macapá), apresentam 100% de prevalência. Foi observado que a titulação mínima ocorreu na maioria dos animais no Marajó, entretanto em somente em 4.8% do rebanho procedente do Amapá teve baixas titulações. Todas as 51 amostras de sêmen apresentaram-se negativas no teste da RT-PCR. Concluímos assim que a prevalência da IBR é altíssima em touros bubalinos criados extensivamente no estado do Amapá e Pará, Brasil.

Palavra-chave: Rinotraqueíte Infecciosa Bovina. Reprodutores. Búfalo. Amapá. Pará. Brasil.

ABSTRACT

Blood samples of 188 buffalo bulls, reared in extensive systems in pasture of lowland, without effective control and reproductive and health, with two to 15 years old, Murrah, Mediterranean breeds and crossbreeds, were collected in sterile Vacutainer tubes, 5 mL and analyzed for the presence of antibodies to HBV-1, through the test virus neutralization. Of the 188 bulls examined, only 51 were obtained from semen of samples, which were submitted to analysis RT-PCR. Information about age, race and body condition score (BCS) of the animals were observed. The descriptive statistics was applied through the proportional distribution and determination of the hips and medians for categorical variables. The study was conducted on eight properties, located in the states of Pará and Amapá, northern Brazil, were distributed as follows: 127 animals in the municipalities Itaubal of Piriri (N = 59), Agouti Araguari (N = 33), Tartarugalzinho (N = 14) and Bailique, district of Macapá (N = 21) located in the state of Amapá. The remaining 73 located in the state of Pará in the municipalities of Soure (N = 38) and Muaná (N = 23), Marajó of Island. Statistical analysis consisted of applying the Binomial test to compare the prevalence of HBV-1 in the properties examined in the cities, and compare the prevalence between the classes of race, age and body score. To assess the distribution of titers of antibodies to HBV-1, between Amapá and Marajó, we used the statistical test of Mann-Whitney. All procedures were performed by the program BioEstat 5, with significance level $\alpha = 0.05$. All studied properties had seropositive animals, and 82.4% of 188 samples were serologically positive. Between the Mediterranean and Murrah breeds and crossbreeds, there was only real difference in prevalence between the Mediterranean and Murrah breeds ($p = 0.0004$). There was influence of BCS in the serologically positive bulls prevalence. The BCS = 3 had the highest prevalence of ECC <3 ($p = 0.009$). The prevalence according to age showed a significant difference ($p < 0.0001$) between animals with two years and the bulls with more than two years of age, with a gradual increase in rates of infection with age. The prevalence in the state of Amapá was significantly higher than in Pará. The properties located in the municipalities of the Cutias do Araguari, Tartarugalzinho and Bailique (Macapá), had a 100% prevalence. It was observed that the titration was minimal in most animals in Marajó, but only 4.8% of the Amapá's herds was founded low titers. All 51 samples of semen, were negative in the RT-PCR test. We conclude that the prevalence of IBR is high in buffalo bulls bred extensively in the state of Pará and Amapá, Brazil.

Keyword: Infectious Bovine Rhinotracheitis. Breeding. Buffalo. Amapá. Pará. Brazil.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	9
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1 HISTÓRICO	11
2.2 ETIOLOGIA	12
2.2.1 Classificação	12
2.2.2 Estrutura viral	12
2.2.3 Genoma.....	13
2.2.4 Glicoproteínas de envelope viral	13
2.2.5 Latência	13
2.3 PREVALÊNCIA	14
2.4 EPIDEMIOLOGIA	17
2.5 PATOGENIA.....	18
2.6 RESPOSTA IMUNOLÓGICA	20
2.7 EFEITOS NA EFICIÊNCIA REPRODUTIVA	20
2.8 SINTOMATOLOGIA CLÍNICA.....	23
2.9 DIAGNÓSTICO	23
2.9.1 Provas sorológicas.....	24
2.9.2 Identificação do agente viral no sêmen	27
3 MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1 LOCAL DO EXPERIMENTO	31
3.1.1 Amapá	31
3.1.2 Pará.....	32
3.2 ANIMAIS	33
3.3 EXAME CLÍNICO DOS TOUROS	33
3.4 AMOSTRAS DO SORO	34
3.5 AMOSTRAS DE SEMEN	34
3.6 TESTES DIAGNÓSTICOS.....	36
3.6.1 Soroneutralização.....	36
3.6.2 Identificação viral através da reação em cadeia de polimerase (PCR)	37
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	39
4 RESULTADOS	40
4.1 RESULTADOS DA SOROLOGIA	40
4.2 RESULTADOS DA PCR	48
5. DISCUSSÃO	50
6 CONCLUSÃO.....	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

1 INTRODUÇÃO

A população mundial de búfalos é constituída de aproximadamente 173 milhões (FAO, 2005) de animais, e o rebanho brasileiro representa apenas pequena parcela desse total, com cerca de um milhão e duzentas mil cabeças de búfalos segundo dados do IBGE (2009).

O estado do Pará abriga 50% do rebanho bubalino nacional, motivo pelo qual uma parcela significativa da economia é movimentada em função da cadeia de produção de búfalos no estado (BARBOSA, 2005). O rebanho bubalino estadual aproxima-se das 500 mil cabeças, com crescimento de 1,5% registrado entre 2006 e 2007, sendo os municípios da Ilha de Marajó a área de maior concentração destes animais. O Amapá é o segundo maior estado criador de bubalinos, albergando um efetivo de aproximadamente 200 mil cabeças, havendo um crescimento anual em torno dos 0,9%. Neste estado a maior parte da carne consumida advém do abate de bubalinos (IBGE, 2009).

A bubalinocultura é uma atividade de importância no Brasil a qual atrai adeptos, devido ao excepcional desempenho zootécnico destes animais. O búfalo tem como característica a rusticidade e maior resistência às enfermidades e parasitoses (NASCIMENTO; CARVALHO, 1993), é extremamente versátil, produz carne, leite e trabalho, em todas as latitudes e longitudes, nas mais variáveis condições climáticas (SILVA et al., 2003).

Embora a produção de búfalos seja uma alternativa promissora no mercado atual, as pesquisas acerca desta espécie ainda são incipientes, havendo uma grande carência de informações básicas necessárias para a aplicação de sistemas produtivos eficazes.

Neste contexto, a saúde reprodutiva dos machos e fêmeas constitui um fator decisivo para o sucesso do desempenho produtivo desta espécie.

Os problemas sanitários de ordem infecciosa que determinam falhas na reprodução são multietiológicos e podem comprometer simultaneamente muitos animais de diferentes categorias, acarretando em sinais clínicos variados como repetição de cio, abortamento, natimortalidade, nascimento de animais fracos e infertilidade, o que resulta em grandes prejuízos econômicos. Desta forma, a busca do diagnóstico de

patologias deve ser realizada, a fim de se determinar medidas estratégicas de controle (JUNQUEIRA; ALFIERE, 2006).

O herpesvírus bovino do tipo 1 (HBV-1) é um importantes patógeno na bubalinocultura, causador de significantes perdas na indústria pecuária, através da falha na reprodução e do aumento da mortalidade no gado (CORTEZ et al., 2001). Essa patologia tem distribuição mundial e tende a ser endêmica na maioria das populações (KAMPA et al., 2004).

A infecção pelo HBV-1 é responsável pela manifestação de um complexo de doenças, dentre estas a rinotraqueíte infecciosa bovina (*infectious bovine rhinotracheitis* – IBR, denominação hoje utilizada não só para a manifestação respiratória da doença, como também para todo complexo de características clínicas causadas pelo agente viral), a vulvaginite pustular infecciosa (conhecida pela sigla VPI, manifestação venérea da doença) e a balanopostite pustular infecciosa (BPI, manifestação venérea da IBR no macho), são as de maior importância. Outras conseqüências ocasionadas por este patógeno são: reabsorção embrionária, aborto, infertilidade temporária, nascimento de animais fracos e mortalidade de neonatos (VIEIRA et al., 2003). Outros tipos de HBV, como o 4 e 5 são encontrados em animais apresentando endometrites (FRAZIER et al., 2001) ou meningoencefalite (RIET-CORREA et al., 1996).

A ocorrência deste agente foi relatada em búfalos, os quais são, assim como os bovinos, suscetíveis a esta doença (PITUCO et al., 1997; DE CARLOS et al., 2004). Todavia a prevalência, assim como o comportamento epidemiológico da IBR nos bubalinos criados na Amazônia são pouco conhecidos.

Apesar da possível participação destas doenças nos prejuízos da cadeia produtiva bubalina, estudos acerca da prevalência da IBR na região Norte do Brasil são raros, principalmente no rebanho bubalino. A presente dissertação teve como objetivo estimar a prevalência da IBR em reprodutores bubalinos criados no sistema de produção extensiva em oito propriedades localizadas no estado do Amapá e Pará, e relacionar a prevalência e titulação sorológica com a eliminação do vírus no sêmen.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 HISTÓRICO

Em 1954, os pesquisadores Schroeder e Moys registraram o primeiro caso de IBR, na Califórnia, Estados Unidos, em 1953, e descrevendo-a como uma nova doença do aparelho respiratório superior, incidente em gado leiteiro, a qual aparece repentinamente, causando febre alta, agalactia e sinais respiratórios. Naquele momento a causa era desconhecida, porém, era possível determinar que sua transmissão ocorre através de tecidos e exsudados advindos de animais contaminados (SCHROEDER; MOYS, 1954).

A partir da primeira notificação, esta doença foi descrita em bovinos leiteiros e de corte, de todas as idades, principalmente nos animais criados em sistema intensivo, e ocasionalmente nos submetidos ao sistema extensivo. A Rinotraqueíte Infecciosa Bovina começou a ser denominada como a “*Red nose*”, “*dust pneumonia*” e, em 1955, foi chamada de *Infectious Bovine Rhinotracheitis*, sendo hoje muito conhecida pela sigla IBR (MCKERCHER et al., 1955).

Anos mais tarde, após a descoberta do vírus, Saxegaard (1970) verificou que o mesmo agente causador da IBR, também é responsável pela manifestação de doenças venéreas, como a vulvovaginite pustular (VPI) em vacas. Outros estudos determinaram ainda que o vírus possa ter chegado à América do Norte através de animais com infecção sub-clínica vindos da Alemanha, por volta de 1930. O HBV-1 provavelmente só havia se manifestado como uma doença venérea até ocorrer a intensificação das criações, nas quais os animais começaram a ser mantidos aglomerados, favorecendo a modificação da virulência do agente, que neste momento, começou a se manifestar na sua forma respirtória (YATES, 1982).

Posteriormente, a IBR foi largamente notificada em várias partes do mundo, ocorrendo em várias espécies de bovídeos, prevalecendo principalmente nos bovinos e bubalinos (MWEENE et al., 2003; PHARANDE; DESHMUKH; GUJAR, 2004; PACELLI et al., 2005; GUARINO et al., 2008).

2.2 ETIOLOGIA

2.2.1 Classificação

O HBV-1, pertencente à família *Herpeviridae*, subfamília *Alfaherpesvirinae*, é responsável por desenvolver distúrbios respiratórios e reprodutivos, como a VPI e a BPI, abortos, reabsorção embrionária e infertilidade temporária (CERQUEIRA et al., 2000).

Segundo Rocha, Gouveia e Leite (1999), subtipos do HBV-1 foram determinados baseados na análise das diferenças no DNA viral detectados por restrição enzimática ou reação em cadeia de polimerase (PCR), encontrando-se os subtipos 1.1, 1.2a e 1.2b. A importância biológica desta classificação não está bem definida, porém uma menor virulência tem sido indicada para o subtipo 2b, o qual não parece causar aborto, enquanto os subtipos HBV-1.1 e HBV-1.2a têm sido isolados em fetos bovinos abortados. No entanto, Lata Jain, (2006) reportou que a subtipagem não mostra uma correlação rigorosa entre a clínica e o subtipo molecular isolado.

2.2.2 Estrutura viral

O HBV-1 mede entre 70 a 110 μm (TAKIUCHI; ALFIERI; ALFIERE, 2001) e possuem um nucleocapsídeo icosaédrico, constituído de 162 capsômeros, rodeado por um tegumento e pelo envelope viral, composto de glicoproteínas na sua superfície (LATA JAIN, 2006).

2.2.3 Genoma

Seu genoma consiste de uma fita dupla de DNA de aproximadamente 137-139 kpb. Algumas glicoproteínas também têm propriedades imunogênicas, as quais são usadas como agentes de vacinas ou de testes diagnósticos (LATA JAIN, 2006).

2.2.4 Glicoproteínas de envelope viral

O genoma do BHV-1 contém pelo menos 10 genes com potencial para codificar as glicoproteínas gB, gC, gD, gE, gI, GH, gL, gG, GK e GM (SCHWYZER; ACKERMANN, 1996). Devido à sua localização no envelope viral e na superfície de células infectadas, estas glicoproteínas são importantes sinais para a resposta imune do hospedeiro. Além disso, para Lata Jain (2006), elas desempenham um papel importante na patogenicidade mediada pela entrada do vírus na célula hospedeira, na fusão celular e na propagação viral célula a célula.

2.2.5 Latência

A ocorrência da latência existente nas infecções por BHV-1 tem papel importante na patogenia e nas medidas de controle deste vírus, pois uma vez infectado, o animal torna-se portador para o resto da vida (PASTORET; THIRY, 1985; VAN OIRSCHOT et al., 1993). De acordo com Pidone, Galosi e Etcheverrigaray (1999), após o vírus penetrar no hospedeiro, e se ligar às células epiteliais do sítio de inoculação e se replicar, o BHV-1 se dissemina através de feixes nervosos, alcançando principalmente

os gânglios trigeminais e sacral, onde permanece em estado latente, podendo ser reativado em condições de estresse, ou baixa da imunidade. Aoki (2006) descreve que durante a reativação viral, o HBV-1 torna-se passível de ser excretado novamente, podendo contaminar outros animais susceptíveis, e ressalta ainda que nos animais latentes, os sinais clínicos geralmente não estão presentes durante a reativação viral.

2.3 PREVALÊNCIA

A presença do HBV-1 já foi relatada em várias partes do mundo, prevalecendo principalmente em bovinos (SHOPER JUNIOR, 1970) e bubalinos (DE CARLOS et al., 2004). Sua ocorrência foi notificada ainda em suínos, elefantes asiáticos, antílopes, javalis e furões (SETIÉN, 1987), ovinos e caprinos (BANKS, 1999).

A prevalência do HBV-1 em países da Europa, Ásia, Oceania, América do Norte e Sul, é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1. Prevalência da IBR em países da Europa, Ásia, Oceania, América do Norte e Sul, considerando-se a procedência, técnica de diagnóstico e a referência.

	Procedência	(%)	Técnica	Referência
AFRICA				
Zâmbia	SS ² de rebanhos bovinos	48,28	ELISA ⁵ IF ¹	Mweene et al. (2003)
ÁSIA				
Índia	SS ² de rebanho bubalino	6,45	ELISA ⁵	Pharande, Deshmukh e Gujar (2004)
Índia	SS ² de rebanho bubalino e Bovino	52,5 50,9	ELISA ⁵	Renukaradhya, Rajasekhar e Raghavan (1996)
Tailândia	SS ² de rebanhos bovinos leiteiros	18	ELISA ⁵	Kampa et al. (2004)
EUROPA				
Itália	SS ² de rebanho bovino leiteiro	26,3	ELISA ⁵	Cuteri et al. (2006)
Itália	Fetos abortados de búfalos	37,2	IF ¹ /PCR ⁶	Pacelli et al. (2005)
Finlândia	SS ² de touros em Central	40	SN ⁴ /IV ³	Janzen, Smart e Nicholson (1980)
OCEANIA				
Nova Zelândia	SS ² de rebanhos bovinos leite/corte	57	ELISA ⁵ SN ⁴	Durham e Sillars (1986)
AMÉRICA DO NORTE				
México	SS ² em rebanhos leiteiros	22	-	Urbina, Riveira e Correa (2005)
USA	SS ² de rebanhos bovinos	20,4	-	Waldner (2005)
AMÉRICA DO SUL				
Uruguai	SS ² de rebanho bovino	37%	ELISA ⁵	Guarino et al. (2008)
Venezuela	SS ² de rebanho de corte	51	ELISA ⁵	Obando et al. (2004)

¹ – Imunofluorescência² – Soro Sangüíneo³ – Isolamento Viral⁴ – Soronetralização⁵ – *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*⁶ – Reação em Cadeia de Polimerase

No Brasil, como citado por Okuda et al. (2006 apud GALVÃO, DOLIA e ALICE, 1963) a IBR foi registrada pela primeira vez em 1962 na Bahia, em

levantamento sorológico da doença através de anticorpos neutralizantes. A prevalência do HBV-1 em vários estados brasileiros está descrita na Tabela 2.

Tabela 2. Prevalência da IBR nos estados brasileiros, considerando-se a procedência, técnica de diagnóstico e a referência.

BRASIL				
Estado	Procedência	(%)	Técnica	Referência
MG	SS ¹ de bovinos	51	-	Castro et al. (1992)
SP	Sêmen de touros em central de IA	56	SN ³ e IV ²	Passos et al. (1992)
MG	SS ¹ de touros em Central	62,5	SN ³	Rocha, Gouveia e Leite, (1995)
MS	SS ¹ de rebanhos bovinos	17	-	Pellegrin et al. (1997)
SP	SS ¹ de bezerros bovinos	86,8	SN ³	Moreira et al, (2001)
MG	SS ¹ de rebanhos bovinos	58,2	ELISA ⁴	Rocha et al. (2001)
PA	SS ¹ de rebanho bubalino	62,9	-	Molnár et al. (2001)
GO	SS ¹ de touros em Central	69,4	SN ³	Faria et al. (2003)
GO	SS ¹ de rebanhos bovinos leiteiros/corte/ mistos	83	ELISA ⁴	Vieira et al. (2003)
SP	SS ¹ em touros de uma central de IA	80,3	SN ³	Okuda et al. (2004)
PA	SS ¹ de rebanho bubalino	76,48	ELISA ⁴	Moura et al. (2005)
GO	SS ¹ de rebanhos bovinos	51,9	SN ³	Barbosa, De Brito e Alfaia, (2005)
SP	SS ¹ de rebanho bovino de corte	68,3	SN ³	Junqueira et al. (2006)
PA	SS ¹ de rebanho bubalino	57,82	SN ³	Reis, (2008)

¹ – Soro Sangüíneo

² – Isolamento Viral

³ – Soronetralização

⁴ – *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*

O HBV-1 ocorre em todo Brasil, devendo-se salientar, que o número de rebanhos infectados com a doença é elevado. Vieira et al. (2003) ao estudar a prevalência do HBV-1 em 90 fazendas, verificou sua ocorrência em 96,7% das propriedades. Okuda et al. (2006) reportou que 100% das 85 propriedades examinadas em seu trabalho havia a presença de animais positivos.

2.4 EPIDEMIOLOGIA

A IBR é uma doença cosmopolita, facilmente transmitida através de secreções respiratórias, oculares e reprodutivas, sendo a última, a via de entrada mais comum em rebanhos (URBINA; RIVEIRA; CORREA, 2005).

Touros utilizados para produção de sêmen que possuem o vírus em estado de latência apresentam-se como um problema especial, uma vez que o sêmen pode sofrer contaminação com grandes quantidades de HBV-1 nos episódios de reativação viral. Animais clinicamente saudáveis nos quais a reativação do vírus está se processando, podem apresentar infecções leves ou sub-clínicas. O reconhecimento de sinais clínicos será, portanto, de pouco valor na prevenção da transmissão pelo coito (ROCHA; GOUVEIA; LEITE, 1995).

Os touros começam a eliminar o HBV-1 na mucosa prepulcial por volta de dois a sete dias após a infecção pelo coito. Este primeiro período de eliminação viral pode levar algumas semanas, e após esta primeira fase de infecção o vírus entra então em latência (HUCK et al., 1971).

Portanto, o sêmen contaminado pelo HBV-1 desempenha um papel fundamental na cadeia epidemiológica, podendo transmitir o agente pela monta natural e inseminação artificial (IA) (TAKIUCHI; ALFIERI; ALFIERE, 2001). O HBV-1 presente no sêmen permanece viável quando preservado a 4°C por sete dias e em temperatura ambiente por cinco dias (OIE, 2008).

O processo de congelamento do sêmen não desativa o vírus, permanecendo este com seu potencial infectivo ativo, e o uso dos antimicrobianos neste processo não afeta em nada o este patógeno. Assim a IA é uma forma potencial de transmissão do vírus nas populações. Devido a este motivo, touros utilizados para a IA devem ser submetidos a exames sorológicos para a doença periodicamente (LATA JAIN, 2006).

Outro fator importante ligado aos touros na epidemiologia da IBR é a não existência de uma correlação obrigatória entre a detecção de anticorpos específicos circulantes e a eliminação do vírus pelo sêmen uma vez que tem sido relatada a detecção do HBV-1 em amostras obtidas de animais soronegativos, e vice-versa (FARIA et al., 2003).

Segundo Urbina, Riveira e Correa (2005), vacas acima de quatro anos têm 2,36 vezes maior risco de contrair IBR do que as de menor faixa etária. Todas as idades e raças são suscetíveis a infecção, porém muitos trabalhos reportam maior ocorrência da doença em animais acima dos seis meses, observando-se elevadas taxas de prevalência nas idades mais avançadas (KAMPA et al., 2004; BARBOSA et al., 2005; JUNQUEIRA et al., 2006).

Quanto ao tipo de exploração, segundo Vieira et al. (2003), animais leiteiros possuem maiores porcentagens de animais positivos, quando comparados aos de corte. Isso talvez possa ser explicado pela maior aglomeração que animais de exploração leiteira são submetidos.

O sexo não parece ser um fator determinante da IBR, porém, Del Fava (2001) encontrou prevalência significativamente mais alta em touros, resultado contrário ao relatado por Vieira et al. (2003) que apontaram maiores índices em fêmeas. Já o escore corporal e a raça não influenciam na ocorrência desta doença (DEL FAVA, 2001).

Quincozes (2005) ao realizar o levantamento dos fatores de risco associados à ocorrência da IBR em rebanhos do Rio Grande do Sul verificou maior porcentagem de animais positivos nos rebanhos de aptidão mista (77,24% de animais soropositivos), em sistemas de criação extensivos (66,34% contra 23,08% nos sistemas semi-intensivos), e com utilização de monta natural e IA no manejo reprodutivo (70,26%, contra 64,29% nas propriedades onde utilizou-se somente touros, e 48,94% nas de IA). No mesmo estudo verificou-se ainda que nas fazendas com a presença de ovinos e caprinos, houve maiores índices de prevalência.

2.5 PATOGENIA

O crescimento dos herpesvírus causa distúrbios na arquitetura celular, com o aparecimento de inclusões intra-nucleares, marginação da cromatina e destruição dos nucléolos. Uma massa basofílica desenvolve-se centralmente no núcleo, e corresponde ao acúmulo de DNA recentemente sintetizado. Os vírus adquirem o envelope quando brota através da membrana nuclear, causando a morte celular (FENNER et al., 1993).

No momento da replicação viral nas mucosas, o vírus penetra nas terminações nervosas periféricas locais, onde por via axonal retrógrada, atinge os sítios de latência, neurônios dos gânglios trigêmeo e sacral, onde o nucleocapsídeo penetra no núcleo, permanecendo na forma latente não infecciosa, podendo ser reativado quando os animais são expostos a fatores predisponentes, que diminuem a resistência imunológica (TIKOO; CAMPOS; BABIUK, 1995).

A transmissão do HBV-1 é feita por via direta pelo contato nasal. No caso da infecção pelo trato genital, a transmissão ocorre pelo coito ou por fômites. Transmissões cruzadas entre a forma respiratória e genital podem ocorrer (LEITE, 1996).

A latência viral é caracterizada pela presença do genoma, ausência de expressão gênica considerável e produção de gene viral. Não havendo a apresentação de antígeno às células do hospedeiro, os animais infectados tornam-se portadores vitalícios (ENGELS; ACKERMANN, 1996).

Nos órgãos reprodutivos das fêmeas, Riet-Correa et al. (1996), verificaram que o vírus causa severa lesão necrosante nos ovários, principalmente se a infecção ocorre na época da ovulação. O desenvolvimento do corpo lúteo pode ser prejudicado, interrompendo os ciclos estrais subsequentes, que voltam ao normal em torno de dois meses após a infecção. Este processo tem uma evolução de quatro a sete dias.

O HBV-1 pode comprometer tanto o desenvolvimento do embrião como do feto, embora seja observado abortamento com maior frequência, em condições de campo, no segundo e terceiro trimestre de gestação (ROEHE; WEIBLEN, 2000).

Aly, Shehab e Abd El-Rahim (2003) relatam que os aspectos mais proeminentes nos exames *post-mortem* de animais infectados pelo HBV-1 são congestão e hemorragia do mesenquima bronquial, linfonodos bronquiais e baço, enquanto os rins, estavam pálidos. Microscopicamente observaram degeneração da mucosa epitelial e submucosa da traquéia e dos brônquios, assim como a presença de vacúolos nas células do epitélio bronquiolar e alveolar. Inclusões citoplasmáticas foram detectadas nas células alveolares, assim como neutrófilos, macrófagos e linfócitos, havendo vasculite e trombose nos vasos sanguíneos pulmonares. Exames nos rins revelaram nefrite.

2.6 RESPOSTA IMUNOLÓGICA

A resposta imune à infecção pelos herpesvírus é acionada quando este inicia sua replicação (BABIUK; VAN DRUNEN; TIKOO, 1996). A resposta imune humoral e celular ocorre após sete dias da infecção (ENGELS; ACKERMANN, 1996).

Anticorpos são produzidos contra as glicoproteínas virais gB, gC, gD, os quais induzem a proteção imunológica dos animais, prevenindo a viremia (CÂNDIDO et al., 2003). Estes contribuem ainda na resposta celular anticorpo-dependente, a qual também é reforçada pelo complemento (AUSTRALIA, 2005).

Os anticorpos persistem em níveis detectáveis por três anos após a vacinação (HAGE et al., 1998). Para Fulton et al. (2004), os anticorpos maternos persistem durante 123 dias após o desmame embora estes não protejam completamente os vitelos, que podem ter infecções latentes com o BoHV-1 nos primeiros anos de vida (AUSTRALIA, 2005). De acordo com ultimo autor a resposta imune mediada por células ao HBV-1 inclui a ação de macrófagos, a produção de interleucina-2 e interferon- γ e ativação dos linfócitos *natural-killer*.

O HVB-1 provoca uma ampla imunossupressão em bovinos infectados, o que muitas vezes leva a infecções bacterianas e virais secundárias. Imunossupressão é causada por deficiência de macrófagos, polimorfonucleares, neutrófilos e função linfocitária (TIKOO; CAMPOS; BABIUK, 1995), e pela diminuição da expressão do receptor de interleucina-2, diminuindo o estímulo mitogênico das células mononucleares no sangue periférico e reduzindo o número de linfócitos T circulantes, através da apoptose destes (WINKLER; DOSTER; JONES, 1999).

2.7 EFEITOS NA EFICIÊNCIA REPRODUTIVA

A introdução do HBV-1 em rebanhos causa importantes prejuízos na eficiência reprodutiva dos animais. Este vírus causa o comprometimento nos indicativos da

eficiência reprodutiva, tais como o intervalo entre partos, número de doses de sêmen utilizadas na inseminação artificial; número de serviços por concepção; taxa de concepção; taxa de mortalidade embrionária precoce ou tardia; porcentagem de abortos, natimortos e mortalidade neonatal; peso ao nascer; frequência de endometrites; entre outros (TAKIUCHI; ALFIERI; ALFIERE, 2001).

Nos machos, a replicação viral durante a reativação ocorre sem sintomas clínicos da doença, porém, os touros podem estar eliminando grandes quantidades de vírus no sêmen (VAN ENGELENBURG et al., 1995). Van Oirschot (1995) relata que animais que apresentam a balanopostite pustular, possuem redução da motilidade espermática, e há o aumento das anormalidades morfológicas dos espermatozoides. O agente causador da IBR é considerado o patógeno viral mais comumente encontrado no sêmen de bovinos (LATA JAIN et al., 2008).

Vários autores relatam que a maioria dos touros soropositivos, e mesmo aqueles em plena eliminação do vírus, não apresentam sinais clínicos da infecção, transmitindo o agente através do coito ou sêmen (IA) (PASSOS et al., 1992; ROCHA; GOUVEIA; LEITE, 1995; OKUDA et al., 2004).

Levantamentos bibliográficos reportam baixos índices de gestação em vacas inseminadas com sêmen de touros infectados com o HBV-1. Além de baixos índices de concepção, a ocorrência de endometrites, lesões no oviduto, altas taxas de retorno ao cio, encurtamento do ciclo estral, vulvovaginites, necrose focal do corpo lúteo, foram registradas (ROCHA; GOUVEIA; LEITE, 1999). Segundo os autores este fato deve-se a transmissão amplamente favorecida pelo desenvolvimento da biotécnica de criopreservação do sêmen, uma vez que as condições de processamento e armazenamento do sêmen são ideais para a preservação do HBV-1.

O aborto é uma das conseqüências mais preocupantes da infecção pelo HBV-1. Reed et al. (1971) investigaram 150 casos de abortamentos utilizando o teste de imunofluorescência, o exame histológico e o isolamento viral. O vírus da IBR foi detectado em 31 do total de casos analisados. Em 28 (90%) dos 31 casos, os autores encontram na placenta e feto, lesões histológicas típicas do vírus, as quais induziram o aborto. O vírus foi isolado em 15 (48%) amostras que apresentaram positivos no teste de imunofluorescência.

Em levantamento das causas de aborto realizado por Kirkbride (1985), em 953 casos entre 1982-1983 nos Estados Unidos, 6% eram causados pela IBR. Anos mais tarde, Kirkbride (1992) publicou um estudo de dez anos sobre os agentes causadores de

abortos em bovinos, no qual apontou o HBV-1 como principal causador do distúrbio, sendo isolado em 5,41% dos fetos abortados (n = 8962).

Espí et al. (2000), em trabalho semelhante, não isolaram este agente nos 261 casos de aborto pesquisados, apesar de 12% das amostras de soro maternos apresentarem-se positivas para esta doença.

Já Konrad et al. (2003) acharam correlação positiva entre o aparecimento de animais soropositivos para IBR no rebanho e a ocorrência de abortos, porém este resultado não se repete para as repetições de cio, as quais não apresentaram correlação. Os autores justificam este resultado sugerindo que as causas de infertilidade são múltiplas, sendo que as provocadas pelo HBV-1 participam, porém não são as principais responsáveis por perdas reprodutivas.

Cuteri et al. (2006), em trabalho acerca da ocorrência concomitante da IBR e da diarreia bovina viral, relacionando com dados reprodutivos, verificaram que a maior frequência de distúrbios reprodutivos estava presente no grupo de animais sorologicamente positivos para as duas doenças, sugerindo que a associação entre o HBV-1 e o vírus da diarreia bovina viral, pode aumentar o aparecimento de problemas reprodutivos.

No entanto, outros trabalhos têm demonstrado a ausência de relação significativa entre o desempenho reprodutivo de fêmeas e a infecção pelo HBV-1. Obando et al. (2004) estudaram o efeito da infecção pelo HBV-1 sobre a reprodução de bovinos não vacinados, e verificaram que o desempenho reprodutivo não variou entre os grupos estudados, tendo estes resultados semelhantes entre animais sadios e portadores de IBR.

Junqueira et al. (2006), realizaram trabalho semelhante, utilizando a inseminação artificial, porém, encontraram relação negativa entre a presença do HBV-1 e eficiência reprodutiva, demonstrando uma influência desta doença na reprodução. Porém estes autores ressaltam que não foram avaliadas neste experimento outras causas infecciosas e não infecciosas de problemas reprodutivos.

Matrizes criadas sob condições adequadas de manejo zootécnico extensivo e nutricional apresentaram bons índices de gestação, parição e natalidade, independente da presença de animais soropositivos para esta doença (DEL FAVA; PITUCO; GENOVEZ, 2007).

2.8 SINTOMATOLOGIA CLÍNICA

A forma genital ocasionada pelo BHV-1 manifesta-se pela IPV e IPB. Nos machos, a balanopostite pustular infecciosa (IPB) ocorre de forma clínica ou subclínica. Após um período de incubação de um a três dias, a mucosa do pênis e prepúcio tornam-se hiperêmicas. (VAN OIRSCHOT, 1995). De acordo com o autor, surgem pontos escuros-avermelhados que tendem a formar nódulos, vesículas e pústulas. O autor reporta que estas lesões podem formar placas, úlceras e infecções bacterianas secundárias, resultando em uma descarga prepucial purulenta. A IPB pode ser acompanhada por febre, depressão e perda de apetite.

Em bezerros infectados no final da gestação, durante ou logo após o parto, podem apresentar a forma sistêmica da doença (ROCHA, 1999). Os animais infectados desenvolvem lesões necróticas no sistema digestivo e respiratório, principalmente no fígado e também linfonodos, nascendo mortos ou debilitados.

Nas fêmeas há o aparecimento de pequenas vesículas, que evoluem para pústulas e erosões localizadas na vulva e vagina. O epitélio vulvar encontra-se edemaciado, hiperêmico e com secreção que podem tornar-se mucopurulenta devido à contaminação bacteriana secundária (TAKIUCHI; ALFIERI; ALFIERE, 2001).

Aly, Shehab e Abd El-Rahim (2003), reportaram severas manifestações oculares e respiratórias, como aumento da frequência respiratória, descarga nasal serosa e mucosa, dispnéia respiratória, tosse. Abortos, malformações congênitas (cegueira, deformidades músculo esqueléticas), nascimento de animais fracos também foram notificados neste trabalho.

2.9 DIAGNÓSTICO

A IBR confunde-se com outras doenças, devendo-se realizar o diagnóstico diferencial entre: vulvovaginite pustular infecciosa e infecções por *Mycoplasma*

bovinogenitalium, e *Ureaplasma diversum* agentes causadores de vulvovaginites; infecção respiratória pelo HBV-1 e outros patógenos agrupados no Complexo Respiratório Bovino, como o vírus respiratório sincicial bovino (BRSV), vírus parainfluenza tipo 3 (PI-3) e bactérias do gênero *Pasteurella*; e distúrbios reprodutivos ocasionados pelo HBV-1 e brucelose, leptospirose, campilobacteriose, neosporose, tricomonose, BVD e micoplasmose, além de descartar também, as causas não infecciosas, relacionadas ao manejo (nutrição, estresse térmico), corticóides exógenos, endotoxinas, desordens genéticas, etc. (TAKIUCHI; ALFIERI; ALFIERI, 2001).

Assim, ampla variedade de manifestações clínicas semelhantes a outras doenças infectoparasitárias e não infecciosas dificulta o diagnóstico clínico definitivo do complexo de doenças IBR/IPV/IPB (TAKIUCHI et al., 2003).

O histórico sanitário do rebanho, relacionado com as taxas de produtividade, programas de vacinação e manejo alimentar, são fundamentais importância na elaboração do diagnóstico. Porém, somente com o apoio de técnicas laboratoriais o diagnóstico do HBV-1 é conclusivo (TAKIUCHI; ALFIERI; ALFIERI, 2001).

2.9.1 Provas sorológicas

Os testes sorológicos podem ser utilizados para vários fins, sendo muito prático para detecção de infecções agudas e convalescentes nos animais. Os testes de vírusneutralização e os vários testes de ELISA são geralmente usados para detectar anticorpos para HBV-1 no soro sanguíneo. Por causa da latência, a identificação sorológica de anticorpos fornece uma útil e confiável indicação do estado da infecção no rebanho. Qualquer animal com anticorpos para o vírus é considerado um transportador e potencial excretor intermitente do vírus, com exceção dos animais muito novos (com anticorpos colostrais) e vacinados (OIE, 2008).

Em geral, os testes sorológicos podem ser divididos em testes convencionais e com marcadores. O único teste sorológico disponível que utiliza marcadores até o momento é o teste de ELISA bloqueador de anti-corpos gE HBV-1 (VAN OIRSCHOT

et al., 1997). Os testes sorológicos convencionais são a vírusneutralização, ELISA direto e ELISA indireto (OIE, 2008).

2.9.1.1 Soroneutralização

O teste de soro-neutralização, também chamado de soro-vírus-neutralização é utilizado para detectar anticorpos que possuem capacidade de neutralizar a infectividade do vírus (anticorpos neutralizantes) (SCHIEFER et al., 2006). Esta prova apresenta uma sensibilidade de 89.2% e especificidade próxima a 100%. Porém, pela dependência da manutenção de linhagens celulares, é muito onerosa, além de apresentar menor sensibilidade quando comparada ao teste de ELISA (CÁRDENAS et al., 2006). No Brasil a maioria dos estudos para detecção do BHV-1 utiliza a soroneutralização como teste sorológico padrão (ROCHA et al., 2001; BARBOSA; DE BRITO; ALFAIA, 2005; QUINCOZES, 2005; JUNQUEIRA et al., 2006).

Entretanto, Kunrath et al. (2004) defende que embora mais trabalhosa e demorada que o ELISA, a técnica de soroneutralização possui um custo menor do que os kits importados e pode encontrar aplicações em laboratórios que não dispõe de equipamentos para o teste imunoenzimático. Além disso, a soroneutralização pode ter aplicação importante na realização de testes sorológicos pareados, nos quais é necessário quantificar-se e comparar os títulos de anticorpos da fase aguda e convalescente, o que não é viável se fazer com os testes ELISA comerciais.

Os testes de vírusneutralização pode ser realizado de várias maneiras. Os testes diferem no que diz respeito à estirpe viral utilizada no protocolo, a origem/da partida da diluição do soro, ao período de incubação vírus/soro (1-24 horas), ao tipo de células utilizadas, ao dia da leitura final, e ao ponto de leitura final (PERRIN et al., 1993).

De todas estas variáveis, o tempo de incubação vírus/soro é o que apresenta maior efeito sobre a titulação do anticorpo. Um período de incubação de 24 horas pode pontuar 16 vezes mais títulos de anticorpos do que um período de 1 hora. Diversas células ou linhagens de células bovinas são adequadas para o uso no teste de vírusneutralização, dentre estas estão incluídas: células secundárias de testículo bovino,

células do rim, células pulmonares e da traquéia ou a linhagem Madin-Darby, células da linhagem renal bovina, já estabelecidas (OIE, 2008).

2.9.1.2 ELISA

Como método de escolha nos diagnósticos de rotina o ELISA é o mais utilizado na determinação de animais sorologicamente positivos. Os anticorpos para HBV-1 podem ser detectados no sangue dos animais soropositivos em aproximadamente sete dias pós-infecção, através da detecção de anticorpos específicos para a glicoproteína gB (KRAMPS et al., 1994).

Vários tipos de testes de ELISA para HBV-1 são comercialmente disponíveis e são adequados para a detecção de anticorpos no leite. O teste em granel de leite é utilizado como teste de triagem em rebanhos leiteiros, em programas de controle da IBR. No entanto, é somente a partir de dados individuais do soro de vários grupos de animais, que será possível obter mais precisamente a prevalência do HBV-1 nos rebanhos (OIE, 2008).

Cortez et al. (2001) analisaram o desempenho de um kit comercial de ELISA desenvolvido para detectar anticorpos bovinos contra o HBV-1, na detecção de anticorpos contra o mesmo vírus em amostras de soros de búfalos, comparando-o ao teste de soroneutralização. Estes autores verificaram que o teste de ELISA indireto apresentou sensibilidade e especificidade relativa de 97,14 e 46,03%, respectivamente. A baixa especificidade do ELISA em relação à soroneutralização poderia ser atribuída ao fato de que esta última detecta apenas anticorpos relacionados ao fenômeno de neutralização. Em contrapartida, a técnica de ELISA indireta detecta qualquer anticorpo direcionado contra proteínas estruturais e não-estruturais do HBV-1. A capacidade do ELISA indireto gerar sinal a partir de quantidades muito pequenas de anticorpos também poderia explicar a sua aparente perda de especificidade em relação à soroneutralização.

Cortez et al. (2001) reportaram ainda que outras causas da perda de especificidade poderiam estar associadas à eventual ocorrência de interações não

imunológicas ou de reações cruzadas com anticorpos produzidos após a infecção dos búfalos com outro vírus antigenicamente relacionado ao HBV-1. Assim os autores concluíram que as respostas imunitárias induzidas pelo HBV-1 subtipo 1 (HBV-1.1) não são distinguíveis daquelas induzidas pelo HBV-1 subtipo 2 (HBV-1.2) através de métodos sorológicos convencionais.

Devido às falhas na especificidade nos métodos convencionais de ELISA, pesquisas com anticorpos monoclonais para o HBV-1 foram desenvolvidas (SHEN et al., 1991). Spilki et al. (2005) descreveram um ensaio imunoenzimático que permitiu a discriminação entre respostas imunitárias em bovinos imunizados com qualquer subtipo de HBV-1, baseado em um anticorpo monoclonal que reconhece especificamente a região amino-terminal da glicoproteína C (gC) das estirpes HBV-1.1, deste modo, não reagindo com a estirpe HBV-1.2a. De acordo com os autores este teste apresentou uma sensibilidade de 92%, especificidade de 90% e uma boa correlação com o teste de seroneutralização em amostras de bezerros imunizados com a estirpe HBV-1.1. Os autores concluíram que este teste pode ser útil para fornecer novas alternativas para o diagnóstico, sendo possível distinguir o papel desempenhado por cada um dos subtipos virais do HBV na epidemiologia das infecções.

2.9.2 Identificação do agente viral no sêmen

2.9.2.1 Isolamento Viral

O isolamento viral em cultura celular tem como desvantagem a exigência da viabilidade da partícula viral na amostra, e conseqüentemente a permanência de sua infecciosidade, além de ter uma metodologia laboriosa e de alto custo (TAKIUCHI et al., 2003).

Para isolamento do vírus, várias culturas celulares podem ser utilizadas: células primárias ou secundárias de rim, pulmão ou testículos de bovinos; linhagens celulares

derivadas de pulmão fetal bovino, traquéia e cornetos; a linhagem celular de rim bovino Mardin-Darby. As culturas celulares podem ser cultivadas em tubos de vidro ou plástico. As culturas celulares são observadas diariamente para a avaliação do efeito citopático, que geralmente aparece dentro de três dias após a inoculação do HBV-1. O efeito citopático é caracterizado por células redondas, semelhantes a cachos de uvas, as quais aparecem em torno de buracos na monocamada de células. Quando não há o aparecimento do efeito citopático após sete dias de cultura, uma nova passagem deve ser realizada (BRUNNER et al., 1988).

Para identificar o vírus que produz o efeito citopático como o HBV-1, o sobrenadante da cultura deve ser neutralizado com uma monocultura de antisoro para HBV-1 ou o anticorpo monoclonal (OIE, 2008). Um método alternativo de identificação do vírus pode ser realizado pela demonstração direta do antígeno para HBV-1 em células em torno dos pontos de efeito citopático, através de imunofluorescência ou do teste de imunoperoxidase com anti-soro conjugado monoespecífico ou anticorpos monoclonais (KAASHOEK et al., 1994).

2.9.2.2 Detecção do antígeno viral

A vantagem da técnica de detecção de antígeno é sua rapidez, já que o diagnóstico pode ser obtido no mesmo dia. No entanto, a sensibilidade desta técnica é menor que a do isolamento viral (EDWARDS et al., 1983).

A partir de amostras de swabs nasal, ocular podem ser utilizados para detectar a presença do antígeno viral, através do teste de imunofluorescência direta e indireta. Na imunofluorescência direta a monocultura é testada com o antisoro conjugado com isotiocianato de fluoresceína. Para obter os melhores resultados, são necessárias amostra de vários animais que tenham febre e uma ligeira descarga nasal serosa. As amostras colhidas de bovinos com descarga nasal purulenta ou hemorrágica são muitas vezes negativas (OIE, 2008). Outra possibilidade para a rápida detecção direta de antígeno viral é a utilização do teste de ELISA para detectar antígenos, através de anticorpos monoclonais.

2.9.2.3 Detecção do DNA viral através da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

A técnica de detecção do ácido nucléico viral através da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) foi desenvolvida em 1985 por Kerry Mullis. O método é rápido, *in vitro*, capaz de amplificação enzimática de um segmento específico de DNA até 6 kb em centenas de milhares e milhões de vezes (VOET; VOET, 2004).

Durante a última década, a técnica de PCR vem cada vez mais sendo utilizado na rotina diagnóstica para detectar o HBV-1 (MOORE; GUNN; WALLS, 2000). Comparado com o isolamento viral, a PCR é mais sensível e mais rápida, podendo ser realizada em um a dois dias. Tem como desvantagem a maior facilidade de ocorrer contaminações e, portanto, medidas preventivas devem ser adotadas nos laboratórios de execução para assim evitar resultados de falso-positivos. O risco de contaminação é acentuadamente reduzido nas novas técnicas de PCR, como a PCR em tempo real, ou a PCR quantitativa (ABRIL et al., 2004).

Estudos mostram que o sêmen bovino contém componentes que inibem a PCR nas técnicas convencionais, assim novas técnicas foram desenvolvidos a fim de purificar o DNA do HBV-1 presente no sêmen (VAN ENGELENBURG et al., 1993). Vários protocolos para a detecção do BHV-1, em amostras de sêmen bovino, foram desenvolvidos utilizando diversos tipos de preparo da amostra, técnicas de extração do DNA viral e primers direcionados para diferentes regiões alvo, apresentando praticidade e desempenho bastante variados (MEYER et al., 2003).

Dentre as seqüências específicas de primers estão os genes decodificados da proteína timidina quinase (XIA; YASON; KIBENGE, 1995), da glicoproteína C (VAN ENGELENBURG et al., 1995), da glicoproteína D (GEE; WAGTER; HAGE, 1996), e da glicoproteína B (MEYER et al., 2003).

Atualmente, os laboratórios especializados no diagnóstico do HBV-1, chegaram a um consenso quanto à padronização da metodologia utilizada (SMITS et al., 2000). A técnica de PCR em tempo real foi então desenvolvida para detectar o HBV-1 no sêmen bovino destinado ao comércio ou experimentação (OIE, 2008).

A PCR em tempo real difere do padrão da PCR convencional, sendo que na primeira os produtos amplificados são diretamente detectados durante o ciclo de hibridação da amplificação do DNA, o que reforça a especificidade da técnica. A PCR

em tempo real tem várias vantagens, já que neste ensaio utiliza-se apenas um par de primers para fornecer sensibilidade próxima ou igual aos métodos da PCR convencional. A amplificação e detecção do alvo são realizadas simultaneamente, não havendo a manipulação das amostras pós-amplificação, há significativa redução no risco de contaminação da amostra (OIE, 2008).

Quanto aos cuidados para conservação das amostras, para manter a viabilidade do HBV-1 para realização da PCR, as amostras de sêmen são tipicamente armazenadas em nitrogênio líquido. Para o transporte do sêmen para o laboratório pode ser utilizado o nitrogênio líquido, ou conservação em caixa isotérmica com gelo a 4°C. As amostras podem ainda ser armazenadas por curtos períodos a 4°C (até sete dias), sem afetar o resultado do teste de PCR (OIE, 2008). Lata Jain (2006) relata ainda que o HBV-1 sobrevive bem no sêmen em temperatura ambiente por até cinco dias.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 LOCAL DO EXPERIMENTO

A colheita do material foi realizada em oito fazendas, localizadas nos estados do Amapá e Pará cujo sistema de manejo é o extensivo.

3.1.1 Amapá

O estado do Amapá possui dois tipos climáticos segundo a classificação de Köppen, *Afi*, que se caracteriza por apresentar chuvas abundantes durante o ano, onde os totais pluviométricos mensais são iguais ou superiores a 60 mm, ocorrendo na porção central do Amapá, e *Ami* de regime pluviométrico elevado, mas com uma estação relativamente seca, predominando na maior parte do Estado (CAVALCANTE, 1996).

Os rios do Amapá estão sujeitos a um período de enchente, durante o qual, a água transborda dos seus leitos e invade as áreas marginais, inundando-as em diferentes graus de intensidade (LIMA; TOURINHO, 1994; TOURINHO, 1996).

As propriedades estudadas no Amapá localizam-se em municípios ao longo dos rios Araguari, no arquipélago do Bailique e no Rio Piririm. Os municípios estudados foram: Itaubal do Piririm, Cutias do Araguari, Tartarugalzinho e Bailique distrito de Macapá. O acesso as fazendas de Cutias do Araguari, Tartarugalzinho e Bailique, foi de transporte fluvial.

O controle sanitário, zootécnico e reprodutivo não é efetivamente realizado nas fazendas, havendo na maioria delas poucas informações sobre data do parto e morte de animais, assim como a vacinação contra Aftosa e raiva, e exames periódicos por amostragens de brucelose e tuberculose. Somente em uma fazenda obtivemos

informações sobre intervalo entre partos, período de serviço, taxa de concepção, porcentagem de mortalidade embrionária, abortos, natimortos e mortalidade neonatal.

3.1.2 Pará

O clima predominante no nordeste Paraense, segundo a classificação de Köppen, é quente e úmido, dividido em duas estações: uma mais chuvosa, entre os meses de dezembro e maio, e outra menos chuvosa, entre os meses de junho e novembro. A precipitação pluviométrica média está em torno de 2.200 mm anuais. A temperatura máxima varia entre 29° C e 31°C, sendo que a temperatura média fica em torno de 26° C. A umidade relativa do ar se apresenta entre 78% e 93% (SEPOF, 2008).

Na ilha de Marajó, arquipélago situado na região nordeste do Pará, apresenta período de enchente e seca assim como ocorre no Amapá,

Foram estudadas duas propriedades na da Ilha de Marajó, as quais utilizam o sistema extensivo como forma de manejo, não havendo o mínimo controle sanitário (somente a vacinação contra aftosa), nutricional ou reprodutivo.

O número de animais estudados de acordo com a propriedade e local de coleta esta ilustrado na Tabela 3.

Tabela 3. Distribuição do número total de touros examinados, de acordo com a localização das propriedades estudadas, no Amapá e Pará, Brasil, 2008.

Estado	Município	Propriedade	Número de Touros
Amapá	Itaubal do Pírim	A	59
Amapá	Cutias do Araguari	B	17
Amapá	Cutias do Araguari	C	5
Amapá	Cutias do Araguari	D	11
Amapá	Tartarugalzinho	E	14
Amapá	Bailique (Macapá)	F	20
Pará	Soure	G	38
Pará	Muaná	H	24
Total			188

3.2 ANIMAIS

Nas oito propriedades estudadas, 188 reprodutores bubalinos foram utilizados. Os animais são criados em sistema extensivo, a idade variou de dois a 15 anos. Os animais eram identificados por meio de brincos, ferra a fogo no couro na anca ou no chifre. Os dados como idade, raça e escore de condição corporal (ECC) foram registrados em fichas específicas individuais.

3.3 EXAME CLÍNICO DOS TOUROS

Os touros foram submetidos a exame clínico andrológico, segundo a técnica descrita pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998). Onde foram analisados, escore corporal, bolsa escrotal, testículos, epidídimo, prepúcio e pênis e glândulas genitais acessórias por palpação retal e análise do sêmen.

3.4 AMOSTRAS DO SORO

A coleta de sangue foi realizada através da punção da veia jugular externa ou veia sacral média, utilizando-se agulhas para *vacutainer* descartáveis 25 x 0,8 mm e tubos *vacutainer* de 5.0 mL esterilizados, devidamente identificados com o número do animal, para a obtenção do soro. Após a separação do soro, este foi transferido para frascos eppendorf de 1.0mL, e estes foram refrigerados a uma temperatura próxima a 4 °C, ficando netas condições, até a realização do congelamento em freezers de temperatura controlada. As amostras foram reunidas e enviadas para o Instituto Biológico no estado de São Paulo, Brasil, para realização do teste de soroneutralização para detecção de anti-corpos virais para o HBV-1.

3.5 AMOSTRAS DE SEMEN

Dos 188 touros examinados, somente de 51 foi possível obter amostras de sêmen em boas condições para análise. A coleta foi realizada através da massagem das ampolas, e o sêmen coletado em tubos de ensaio plásticos individuais, devidamente esterilizados e identificados, utilizando funis plásticos, também estéreis para auxiliar na coleta. A quantidade de amostras de sêmen de acordo com o local de coleta esta ilustrada na Tabela 4.

Tabela 4. Distribuição do número total de touros examinados, de acordo com a localização das propriedades estudadas.

Estado	Município	Propriedade	Número de Touros
Amapá	Itaubal do Piriri	A	11
Amapá	Cutias do Araguari	B	05
Amapá	Cutias do Araguari	C	00
Amapá	Cutias do Araguari	D	04
Amapá	Tartarugalzinho	E	05
Amapá	Bailique (Macapá)	F	09
Pará	Soure	G	11
Pará	Muaná	H	06
Total			51

O sêmen foi separado em alíquotas, e acondicionado em frascos ependorf, e posteriormente refrigerados a uma temperatura aproximada a 4 °C. As amostras de Itaubau do Piririm, Cutias do Araguari, Tartarugalzinho e Macapá (Bailique) foram acondicionadas em recipientes plásticos, colocados em caixas de isopor, com gelo em temperaturas acima de 4°C por até mais de cinco dias (tempo da viagem).

Na propriedade localizada em Soure, as amostras foram congeladas em freezers domésticos a uma temperatura média de -20 °C logo após o final das coletas.

O transporte das amostras das propriedades até o laboratório da Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA) foi realizado em caixas de isopor isotérmicas, acondicionadas em recipientes plásticos, envoltos de gelo comum. Após a chegada das amostras ao laboratório estas foram congeladas a -20°C em freezers, até o envio ao laboratório.

Para o envio do material ao laboratório do Instituto Biológico no estado de São Paulo, as alíquotas de sêmen foram acondicionadas em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável, para realização da identificação viral através da PCR. O tempo entre o envio e a chegada ao laboratório foi aproximadamente de 12 horas.

3.6 TESTES DIAGNÓSTICOS

3.6.1 Soroneutralização

As amostras de soro sanguíneo foram submetidas ao teste de soroneutralização, utilizando-se a técnica descrita pelo *Manual for Standards for Diagnostic Tests and Vaccines* (OIE, 2008).

No primeiro passo, as alíquotas de soro foram inativadas em banho-maria à 56 °C por 30 minutos. Utilizou placas para microneutralização de 96 poços de fundo plano, com cultivo celular, na qual se reservou as quatro primeiras colunas (uma a quatro) para controle do vírus e de célula.

Nas placas, adicionou-se 50 µl dos soros para teste nas linhas A e B. Os poços das colunas onze e doze foram reservados para controle positivo e negativo, respectivamente.

Com auxílio de uma pipeta multicanal as amostras foram diluídas. Iniciou-se na linha B, transferindo-se 50 µl da linha B para a linha C, e assim por diante até a linha G. A cada diluição as ponteiros foram substituídas.

No passo seguinte, realizou-se a diluição do vírus BHV-1 Cooper em meio de cultivo. Baseado no título do vírus foi preparado uma diluição com 100TCID₅₀/50µl ou então 2000TCID₅₀/µl. Foram adicionados 50 µl do vírus em todos os poços da coluna cinco a doze. A diluição final do soro na linha A foi 1:2, na linha B 1:4, assim sucessivamente até a linha G onde a diluição 1:256. As placas foram incubadas em estufa de CO₂ à 37 °C por 1,5 horas.

Foram adicionados 100 µl em cada poço (linhas B até H e nas colunas de cinco a 12), de uma suspensão de células da linhagem de rim bovino (CRIB), na razão de 3 x 10⁴ células por poço. As placas foram incubadas novamente na estufa com 5 % de CO₂ durante 96 horas. A leitura foi realizada após 72 horas, iniciando pelo soro controle e depois pela diluição do vírus.

O cultivo foi monitorado diariamente (durante 3 a 5 dias) para ver se houve a produção de efeito citopático (CP). No soro onde estavam presentes anticorpos (positivo

para IBR), o vírus foi neutralizado e não produziu efeito citopático nas células. Já no soro no qual não houvesse a presença anticorpos (negativo para IBR), o vírus permaneceu viável e causou citopatologia nas células do cultivo.

Nas amostras de soro que obtiveram titulação 256 foram testadas para diluição 1.024.

3.6.2 Identificação viral através da reação em cadeia de polimerase (PCR)

As amostras de sêmen foram submetidas ao teste de reação em cadeia de polimerase, utilizando-se a técnica descrita pelo *Manual for Standards for Diagnostic Tests and Vaccines* (OIE, 2008).

3.6.2.1 Extração do DNA viral

O DNA viral foi extraído a partir do sêmen, utilizando-se uma solução tampão de lise, Chelex-100 quelatante resina, juntamente com proteinase K e DL-ditiotreitol (TDT), conforme descrito a seguir:

- Em um tubo eppendorf de 1,5 mL adicionou-se 100 µl de *Chelex 100 sodium* (solução tampão a 10 % em água destilada da marca Sigma), 11.5 µl de Proteinase K (10 mg/mL, Sigma), 7,5 µl de TDT (1 M, Sigma), 90 µl água livre de nuclease e 10 µl da amostra de sêmen, utilizando a pipeta para homogeneizar. Seguiu-se a incubação a 56 ° C durante 30 minutos e depois a passagem no vórtex em alta velocidade por 10 segundos. Os tubos foram então incubados em um banho de água fervente por 8 minutos e em seguida em alta velocidade para vortexed 10 segundos. Os tubos foram então centrifugados a 10.000 g por 3 minutos. O sobrenadante foi transferido para um microtubo novo, para ser utilizado na PCR.

3.6.2.2 Procedimento para preparação da PCR em tempo real

Foram utilizados os primers descritos por Abril et al. (2004). Foram reservados um microtubo controle (apenas com os reagentes), um microtubo com controle negativo (amostra negativa) e dois tubos de controle positivo (amostras fracamente e fortemente positivas). Cada amostra de controle também foi duplicada.

Os reagentes para a PCR foram misturados em uma sala limpa (sem a presença de outras culturas virais, estratos de DNA ou sub-produtos de ampliações), específica esta fase da reação.

Em um eppendorf adicionou-se 12.5 μ l de 2 \times Platinum Quantitative PCR SuperMix-UDG, 0,5 μ l do corante de referência ROX, 1 μ l do primer apresentador (gB-F, 4.5 μ M), 1 μ l do primer reverso (gB-R, 4.5 μ M), e 1 μ l do Probe (3 μ M, peso molecular viral). Em outra sala, 5 μ l do DNA teste (que foi amplificado) foram então adicionados à mistura para de reagentes para a PCR totalizando um volume final de 25 μ l.

3.6.2.3 Reação em cadeia de polimerase

Após a preparação dos reagentes e adição do DNA teste, os eppendorfs foram colocados no termociclador, para a reação. As misturas foram submetidas a ciclos subsequentes de desnaturação, anelamento e extensão, descritos abaixo:

- Um ciclo de 50 °C por 2 minutos;
- Um ciclo de 95 °C por 2 minutos;
- 45 ciclos: de 95 °C por 15 segundos;
de 60 °C por 45 segundos.

Todos os produtos da RT-PCR foram conservados a 4 °C e, em seguida, aplicados em gel de agarose a 1,5 % em tampão tris-borato-EDTA (TEB) adicionado de

brometo de etídio. Após eletroforese de aproximadamente uma hora a 90 Volts, pode-se visualizar e fotografar o DNA testado.

Os resultados foram interpretados com base na análise do peso molecular, da seguinte maneira: Resultado positivo: Qualquer amostra que teve um *cycle threshold* (Ct, marca do peso molecular correspondente ao DNA do vírus no gel) com valor igual ou inferior a 45 foi considerada positiva. O controle positivo teve um valor de Ct dentro de uma faixa aceitável (valores de ± 3 Ct). Resultado negativo: Qualquer amostra que não apresenta valor Ct foi considerada negativa. Controle negativo e a amostra controle não tiveram valores de Ct.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística teve a finalidade de avaliar e comparar a prevalência do HBV-1 no estado do Amapá e Ilha de Marajó no estado do Pará. Para realizar estes objetivos foram aplicados métodos estatísticos descritivos e inferenciais. A estatística descritiva foi aplicada através da distribuição proporcional e determinação dos quadris e medianas de variáveis categóricas. A parte inferencial constou da aplicação do teste Binomial (AYRES, 2007) para: comparar a prevalência do HBV-1 nas propriedades examinadas nos municípios de Itaubal do Piririm, Cutias do Araguari, Tartarugalzinho e Macapá (Bailique), comparar a prevalência do HBV-1 nas propriedades examinadas nos municípios de Muaná e Soure na Ilha de Marajó, comparar a prevalência entre as classes de raça, escore corporal e idade. Para avaliar a distribuição da titulação de anticorpos para HBV-1, entre Amapá e Marajó, foi utilizado o teste estatístico de Mann-Whitney o qual compara amostras independentes em escores ordinais. Todos os procedimentos foram executados sob o suporte computacional do pacote BioEstat 5. Em todas as inferências foi adotado o nível de significância $\alpha=0.05$ para rejeição da hipótese de nulidade.

4 RESULTADOS

4.1 RESULTADOS DA SOROLOGIA

Os resultados das análises de soroneutralização dos touros estudados encontram-se sumarizados na Tabela 5.

Tabela 5. Número total de touros bubalinos examinados e número total de touros sorologicamente positivos para o IBR, de acordo com a localização das propriedades e municípios no estado do Amapá e Ilha de Marajó no Pará, no ano de 2008.

Estado	Município	Propriedade	Touros	Positivos
Amapá	Itaubal do Piririm	A	59	53
Amapá	Cutias do Araguari	B	17	17
Amapá	Cutias do Araguari	C	05	05
Amapá	Cutias do Araguari	D	11	11
Amapá	Tartarugalzinho	E	14	14
Amapá	Bailique	F	20	20
Pará	Soure	G	38	15
Pará	Muaná	H	24	20
Total			188	155

Como ilustrado no gráfico da Figura 1, foi observada sorologia positiva em 82,4% (n=188) dos touros examinados, sendo que em todas as oito propriedades estudadas encontram-se animais sorologicamente positivos para IBR.

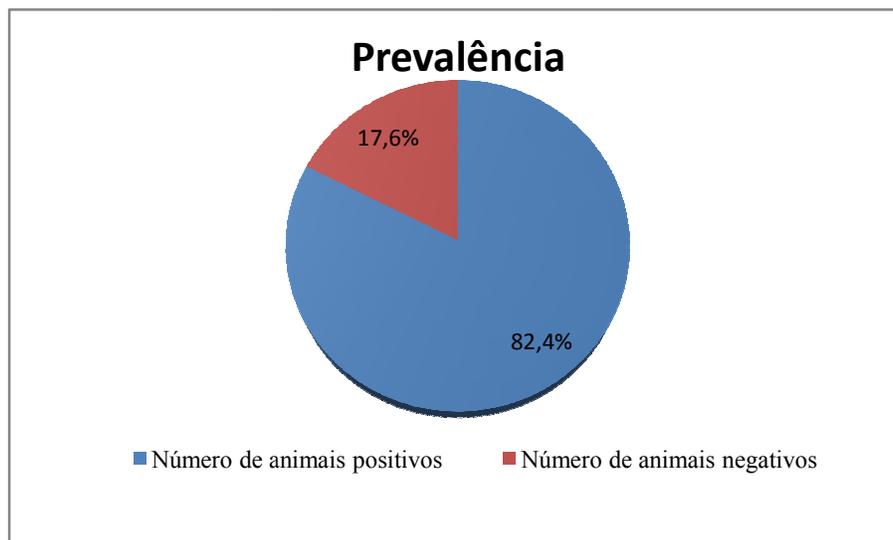


Figura 1. Prevalência da IBR em touros bubalinos em propriedades localizadas no Amapá e Ilha de Marajó, Pará, no ano de 2008.

A prevalência da IBR entre as raças Mediterrâneo, Murrah e seus mestiços é descrita na Tabela 6.

Tabela 6. Prevalência da IBR entre as raças Mediterrâneo, Mestiço e Murrah do total de touros estudados no Amapá e Marajó no Pará, no ano de 2008.

Raça	N	Positivos	Negativos	Prevalência	IC 95%
Murrah	92	79	8	85,8%	85% a 97%
Mestiço	65	52	13	80,0%	70% a 90%
Mediterrâneo	31	21	12	67,7%	47% a 80%

p-valor (Mediterrâneo vs. Mestiço) = 0.0791, Teste Binomial

p-valor (Mediterrâneo vs. Murrah) = 0.0004*, Teste Binomial

p-valor (Mestiço vs. Murrah) = 0.0562, Teste Binomial

Como observado na Tabela 6, entre as raças há diferença real de prevalência somente entre as raças Mediterrâneo (67.7%) e Murrah (85.8%). Não existe real diferença nas comparações entre Mediterrâneo e Mestiço, e Mestiço e Murrah.

A Tabela 7. mostra as prevalências da IBR entre as classes de ECC nos touros.

Tabela 7. Prevalência da IBR entre as classes de Escore de Condição Corporal do total de touros estudados no Amapá e Marajó no Pará, no ano de 2008.

ECC	N	Positivo	Negativo	Prevalência	IC 95%
< 3	77	55	22	71.4%	61.3% a 81.5%
=3	104	94	10	90.4%	84.7% a 96.1%
>3	7	7	0	100.0%	na

na: Não foi possível calcular o IC 95%. (limitação do método estatístico, npq <5)

p-valor (Menor que 3 vs. Igual a 3) = 0.009*, Teste Binomial

p-valor (Menor que 3 vs. Maior que 3) = Não pode comparar porque a prevalência em "Maior que 3" é 100%

p-valor (Igual a 3 vs. Maior que 3) = Não pode comparar porque a prevalência em "Maior que 3" é 100%

Como demonstrado na Tabela 7 a prevalência nos animais com ECC < 3 (71,4%) é significativamente menor que nos animais com ECC =3 (90,4%), visto que o p-valor = 0.009* é altamente significativa.

Tabela 8. Prevalência da IBR entre as faixas etárias no total de touros estudados no Amapá e Marajó no Pará, no ano de 2008.

Idade (anos)	N	Positivo	Negativo	Prevalência	IC 95%
2*	64	39	25	60.9%	49.0% a 2.9%
3 – 4**	75	72	3	90.6%	84.0% a 79.0%
5 – 6**	31	31	0	100%	na
6 – 15**	18	18	0	100%	na

na: Não foi possível calcular o IC 95%. (limitação do método estatístico, npq <5)

p-valor (2 anos vs. 3 a 4 anos) <0.0001*, teste Binomial

p-valor (2 anos vs. Animais com 3 anos ou mais) <0.0001*, teste Binomial

*Anos Completos

**Anos Incompletos

O resultado da comparação da prevalência conforme a idade mostrou que existe uma diferença significativa ($p < 0.0001^*$) entre os animais com dois anos e os touros com mais de dois anos de idade. Os animais pertencentes à faixa etária de até dois anos de idade apresentaram as menores prevalências para IBR. Todos os touros com mais de cinco anos apresentaram-se positivos na sorologia para a IBR.

A prevalência do HBV-1 no Amapá e na Ilha de Marajó no Pará é descrita na Tabela 9.

Tabela 9. Prevalência do HBV-1 em touros estudados no Amapá e Ilha de Marajó no Pará, no ano de 2008.

Touros	Amapá (n=126)	Marajó (n=62)
Positivos	120	36
Negativos	6	26
Prevalência	95,2%	58,1%
IC 95%	91,5% a 99,0%	45,8% a 70,3%

p-valor = <0.0001*, teste Binomial

As prevalências são significativamente diferentes ($p < 0.0001^*$), sendo que a porcentagem no Amapá (92,5%) supera a do Marajó (58,1%), como ilustra o gráfico da Figura 2.

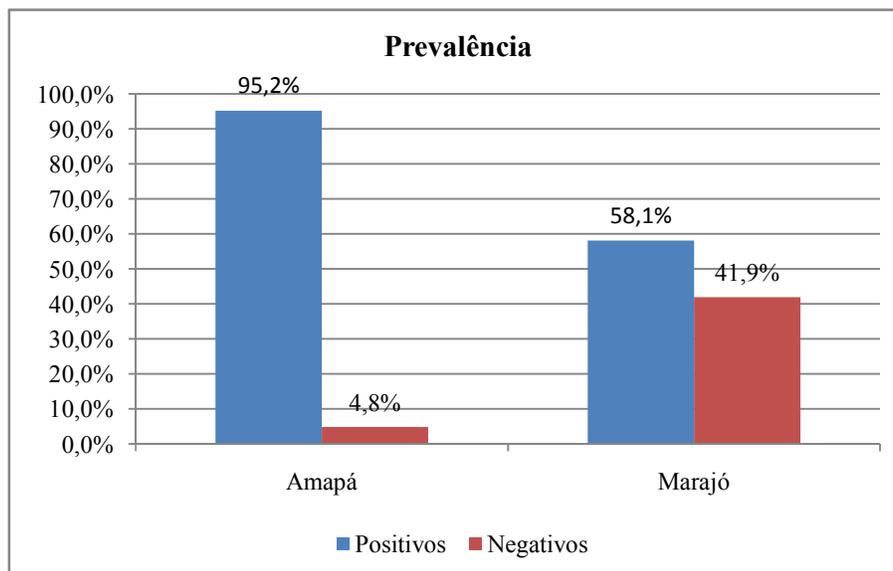


Figura 2. Prevalência da IBR em touros bubalinos localizados no estado do Amapá e Ilha de Marajó, Pará, no ano de 2008.

A análise das porcentagens de animais positivos e negativos de acordo com as raças Mediterrâneo, Mestiço e Murrah encontram-se descrita na Tabela 10.

Tabela 10. Prevalência da IBR entre as raças Mediterrâneo, Mestiço e Murrah em touros estudados no Amapá e Marajó no Pará, no ano de 2008.

Raça	Amapá			Marajó (PA)			Amapá x Marajó
	POS	NEG	Prevalência	POS	NEG	Prevalência	p-valor
Murrah	63	1	98.4%	21	7	75.0%	0.0002*
Mediterrâneo	15	3	83.3%	4	9	30.8%	0.0098*
Mestiço	42	2	97.7%	11	10	52.4%	<0.0001*

p-valor (Amapá)

p = 0.0086* (Mediterrâneo x Murrah)

p= 0.1116 (Mediterrâneo x Mestiço)

p= 0.3540 (Murrah x Mestiço)

p-valor (Marajó)

p = 0.0236* (Mediterrâneo x Murrah)

p= 03855 (Mediterrâneo x Mestiço)

p = 0.997 (Murrah x Mestiço)

Avaliando a prevalência em cada uma das raças e seus mestiços, observa-se que o Amapá apresentou índices superiores aos encontrados no Marajó. Na raça Murrah, o Amapá (98.4%) superou a prevalência do Marajó (75%) e o p-0.0002* é altamente significativo indicando a ocorrência de animais positivos para o HBV-1 no Amapá é significativamente mais prevalente. O mesmo ocorre na raça Mediterrâneo, (Amapá 83.3%; Marajó 30.8%; p-0.0098* é altamente significativo) e Mestiço (Amapá 97.7%; Marajó 52.4%; p <0.0001* é altamente significativo).

O menor número de animais contaminados foi observado na raça Mediterrâneo, no Amapá (83.3%) e no Marajó (30.8%). No Amapá a raça Mediterrâneo (83.3%) apresenta prevalência significativamente ($p=0.0086^*$) menor que a raça Murrah (98.4%). No Marajó a raça Mediterrâneo (30.8%) apresenta prevalência significativamente ($p=0.0236^*$) menor que a raça Murrah (70%).

Quanto à distribuição da prevalência do HBV-1 no Amapá e Ilha de Marajó de acordo com a idade, a Tabela 11 descreve a seguir.

Tabela 11. Prevalência da IBR entre as idades em touros estudados no Amapá e Marajó no Pará, no ano de 2008.

Idade	Amapá			Marajó			Amapá x Marajó
	POS	NEG	Prevalência	POS	NEG	Prevalência	p-valor
2 - 3	53	6	89.8%	28	24	53.8%	<0.0001*
3 - 5	38	0	100.0%	2	2	50.0%	<0.0001*
5 - 15	29	0	100.0%	6	0	100.0%	1

p-valor(até 3 anos) = 0.0067* Amapá
p-valor(até 3 anos) = 0.1248 Marajó

Como foi possível observar, o Amapá possui prevalência maior em todas as faixas etárias de animais, quando se compara com a Marajó. Na faixa de 2 a 3 anos o Amapá (89.8%) superou consideravelmente a prevalência de Marajó (53.8%), e o p-valor <0.0001* é altamente significativo indicando a prevalência no Amapá é comprovadamente de maior. O mesmo ocorre na faixa etárias de 3 a 5 anos, (Amapá 100%; Marajó 50%; p-valor <0.0001* é altamente significativo) . Na faixa de 5 a 15 anos, no Amapá (100%), no Marajó (100%) as prevalências são iguais.

A menor prevalência foi observadas na faixa de 3 a 5 anos na Ilha de Marajó (50%).

No Amapá, nos animais com até três anos de idade a prevalência é significativamente menor ($p\text{-valor}=0.0067^*$). No Marajó a prevalência do HBV-1 não sofre variação conforme a idade do animal.

A Tabela 12 sumariza a prevalência da IBR no estado do Amapá e Ilha de Marajó de acordo com o ECC.

Tabela 12. Prevalência da IBR entre fixas de ECC em touros estudados no Amapá e Marajó no Pará, no ano de 2008.

ECC	Amapá			Marajó			Amapá x Marajó
	POS	NEG	Prevalência	POS	NEG	Prevalência	p-valor
< 3	33	0	100.0%	22	22	50.0%	<0.0001*
= 3	81	6	93.1%	13	4	76.5%	0.0334*
> 3	6	0	100.0%	1	0	100.0%	na
p-valor (<3 vs ≥3)		= 0.1349, Amapá = 0.0012*, Marajó					

na: Não foi possível calcular o IC 95%. (limitação do método estatístico, npq <5)

Avaliando a prevalência em cada uma das três faixas de ECC, pode-se ver que os touros criados nos municípios do estado do Amapá a prevalência supera os animais da Ilha de Marajó. Na faixa de ECC menor que 3, os animais do estado do Amapá (100%) apresentaram maior prevalência que os da Ilha de Marajó (50%) e o p-valor <0.0001* é altamente significativo indicando no estado Amapá uma prevalência estatisticamente maior. O mesmo ocorre com a faixa de ECC igual a 3 (Amapá 93.1%; Marajó 76.5%; p-valor 0.0334* é altamente significativo). Na faixa de ECC maior que 3, as prevalências foram similares.

A menor prevalência foi observada no ECC menor que 3 nos reprodutores criados na Ilha de Marajó (50%). Já no Amapá a prevalência do HBV-1 não variou conforme o valor do ECC (p-valor =0.1349). Nos animais da Ilha de Marajó a prevalência do HBV-1 aumenta nos touros com ECC ≥ 3, o (p-valor = 0.0012*) é um indicador altamente significativo dessa variação da prevalência em relação ao valor do ECC.

As prevalências da IBR nos municípios de Itaubal do Pírrim, Cutias do Araguari, Tartarugalzinho e Bailique no estado Amapá e Soure e Muaná, na Ilha de Marajó no estado Pará, encontram-se descritas na Tabela 13.

Tabela 13. Prevalências da IBR em touros estudados nos municípios de Itaubal do Piriri, Cutias do Araguari, Tartarugalzinho e Macapá (Bailique). Soure e Muaná, no ano de 2008.

	Itaubal	Cutias	Tartarugalzinho	Bailique	Soure	Muaná
n	59	33	14	20	38	24
Positivos	55	33	14	20	15	20
Negativos	6	0	0	0	23	4
Prevalência	93,2%	100,0%	100,0%	100,0%	39,5%	83,3%
IC 95%	na	Na	na	na	23.9 a 55%	na
p-valor (I Piriri)		0.1269	0.3163	0.2321	< 0.001*	0.1664
p-valor (C Araguari)			1.0	1.0	< 0.001*	0.0150*
p-valor (Tartarugalzinho)				1.0	< 0.001*	0.1063
p-valor (Bailique)					< 0.001*	0.0555
p-valor (Soure)						0.0007*

* Teste Binomial

na: Não foi possível calcular o IC 95%. (limitação do método estatístico, npq <5)

Como se observa na Tabela 13, as prevalências são significativamente mais altas nos municípios de Itaubal do Piririm (93.2%), Cutias do Araguari (100%), Tartarugalzinho (100%), Bailique, no município de Macapá (100%) e Mauná (83.3%), quando comparamos com o resultado encontrado em Soure (39,5%).

A prevalência da IBR nos municípios estudados é ilustrada na Figura 3.

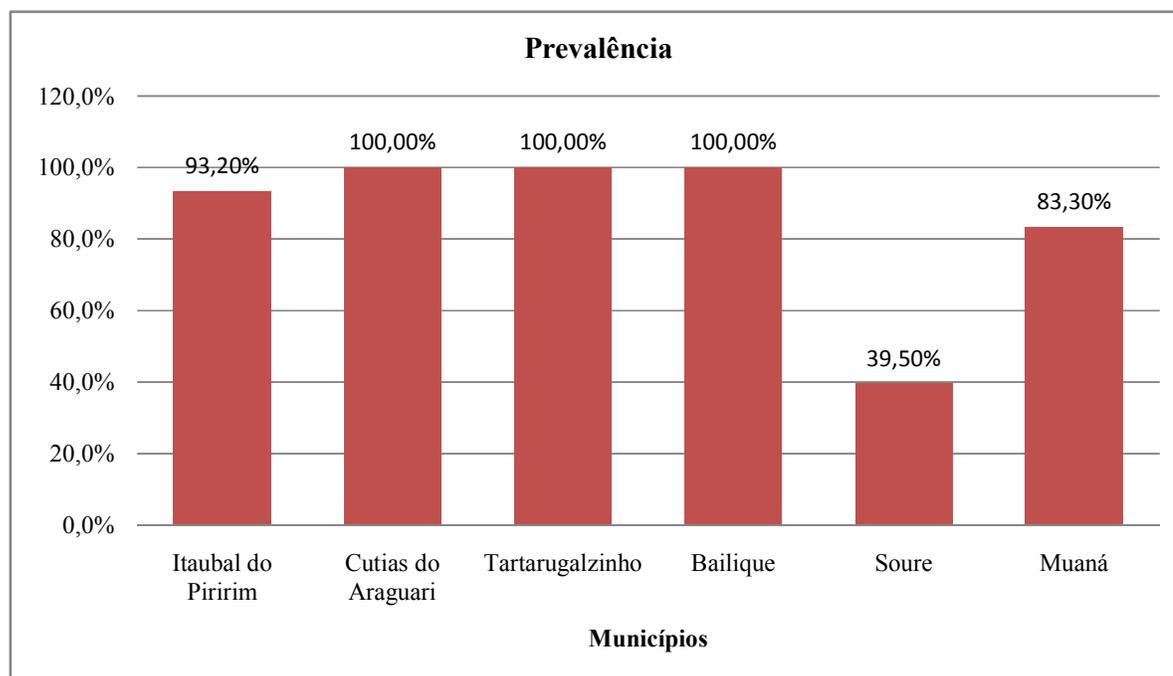


Figura 3. Prevalência do HBV-1 em touros nos municípios de Itaubal do Piririm, Cutias do Araguari, Tartarugalzinho e Macapá (Bailique), Soure e Muaná, em 2008.

Observa-se que o município de Soure teve menor prevalência que os outros. Nos municípios de Cutias do Araguari, Tartarugalzinho e Bailique, todos os animais examinados apresentaram-se sorologicamente positivos para a doença.

Na Tabela 14 encontram-se descritas as distribuições dos resultados da titulação de anticorpos anti-HBV-1 de todos os touros examinados neste experimento. São considerados animais reagentes à prova de soroneutralização os que obtiveram título superior a “2”.

Tabela 14. Distribuição da titulação de anticorpos para HBV-1 em touros bubalinos no estado do Amapá (n=126) e na Ilha de Marajó (n=62) no Pará, em 2008.

Titulação	Amapá		Marajó	
	N	Percentual	n	Percentual
0	6	4.8%	26	41.9%
2	0	0.0%	2	3.2%
4	1	0.8%	3	4.8%
8	1	0.8%	1	1.6%
16	2	1.6%	4	6.5%
32	4	3.2%	3	4.8%
64	16	12.7%	7	11.3%
128	54	42.9%	13	21.0%
256	33	26.2%	3	4.8%
512	7	5.6%	0	0.0%
1024	2	1.6%	0	0.0%
Total	126	100,0%	62	100,0%

Fonte: Protocolo da pesquisa.
p-valor <0.0001, Teste U de Mann-Whitney

A Tabela 15 descreve a distribuição da titulação em quadrantes segundo a estatística descritiva do HBV-1 nos animais estudados.

Tabela 15. Estatística descritiva da titulação de anticorpos para HBV-1 no total de touros bubalinos no Amapá (n=126) e no Marajó (n=62) no Pará, no ano de 2008.

	Amapá (n=126)	Marajó (n=62)
Mínimo	0	0
Primeiro Quartil	128	0
Mediana	128	8
Terceiro Quartil	256	128
Máximo	1.024	256

Fonte: protocolo da pesquisa.
Comparado pelo teste U de Man-Whitney

O p-valor <0.0001* é altamente significativo indicando que os níveis de título no soro sanguíneo dos animais não são semelhantes entre os dois grupos. as prevalências

são significativamente mais altas nos municípios de Itaubal do Pírrim (93.2%), Cutias do Araguari (100%), Tartarugalzinho (100%), Bailique, no município de Macapá (100%) e Mauná (83.3%), quando comparamos com o resultado encontrado em Soure (39,5%). Observou-se que a resposta imunológica dos animais estudados no Amapá também foi maior que no Marajó, como se observa no gráfico da Figura 4. O nível esperado de titulação no Amapá (128) supera o Marajó (8), esta é uma das observações verificadas a partir da estatística descritiva.

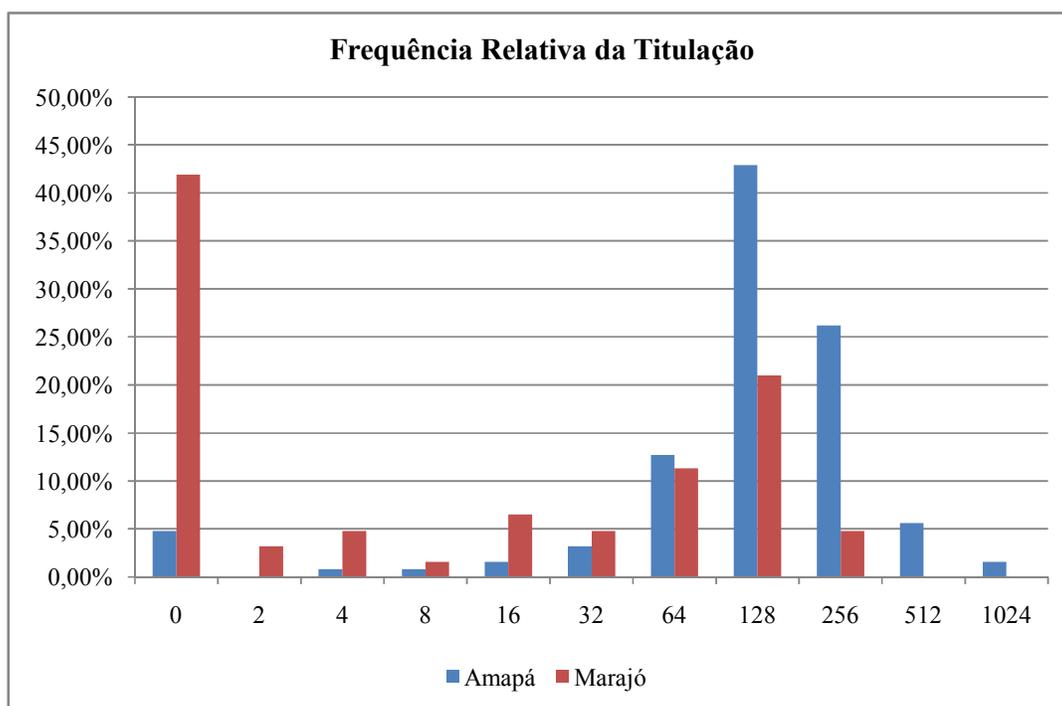


Figura 4. Distribuição da titulação de anticorpos para HBV-1 em touros bubalinos no estado do Amapá (n=126) e na Ilha de Marajó (n=62) no Pará, em 2008.

4.2 RESULTADOS DA PCR

Todas as 51 amostras analisadas pela técnica de PCR apresentaram-se negativas para a presença do agente HBV-1 no sêmen, como demonstra a Tabela 16.

Tabela 16. Número total de touros bubalinos examinados e número total de touros positivos no teste de Reação em Cadeia de Polimerase, para o HBV-1, de acordo com a localização das propriedades e municípios no estado do Amapá e Ilha de Marajó no Pará, no ano de 2008.

Estado	Município	Propriedade	Número de Touros	Positivos
Amapá	Itaubal do Piriri	A	11	0
Amapá	Cutias do Araguari	B	05	0
Amapá	Cutias do Araguari	C	00	0
Amapá	Cutias do Araguari	D	04	0
Amapá	Tartarugalzinho	E	05	0
Amapá	Bailique (Macapá)	F	09	0
Pará	Soure	G	11	0
Pará	Muaná	H	06	0
Total			51	0

A distribuição da titulação de anticorpos para HBV-1 nos touros e número de animais positivos para IBR na análise do sêmen pela PCR, encontra-se descrita na Tabela 17.

Tabela 17. Distribuição da titulação de anticorpos para HBV-1 em touros bubalinos e número de animais positivos para IBR na análise do sêmen pela PCR, no estado do Amapá e na Ilha de Marajó no Pará, em 2008.

Titulação	N	Positivos
0	7	0
2	1	0
4	2	0
8	0	0
16	0	0
32	2	0
64	9	0
128	18	0
252	11	0
512	1	0
1024	0	0
Total	51	0

5. DISCUSSÃO

A prevalência observada nos 188 touros bubalinos criados em sistema de produção extensiva no estado do Amapá e Ilha de Marajó no estado do Pará, foi de 82,44%, índice muito superior aos encontrados nos rebanhos bovinos, em vários países. Janzen, Smart e Nicholson (1980) na Finlândia (40%), Durham e Sillars (1986) na Nova Zelândia (57%), Renukaradhya, Rajasekhar e Raghavan (1996) na Índia (50,9%), Mweene et al. (2003) na Zâmbia (48,28%), Kampa et al. (2004) na Tailândia (18%), Obando et al. (2004) na Venezuela (51%), Urbina, Riveira e Correa (2005) no México (22%), Waldner (2005) nos Estados Unidos (20,4%), Cuteri et al. (2006) na Itália (26,3%) e aos resultados de Guarino et al., (2008) no Uruguai (37%).

Quando compara-se a prevalência observada nas criações extensivas examinadas na Amazônia com a de outras pesquisas em rebanhos de outras regiões brasileiras (prevalências em torno dos 50%), verifica-se também um maior índice de contaminação pelo HBV-1 na população estudada (CASTRO et al., 1992; PASSOS et al., 1992; ROCHA; GOUVEIA; LEITE, 1995; MOREIRA et al, 2001; ROCHA et al, 2001; FARIA et al., 2003; BARBOSA; DE BRITO; ALFAIA, 2005; JUNQUEIRA et al., 2006). Entretanto, nos resultados de Moreira et al. (2001) em bezerros em São Paulo e de Vieira et al. (2003) em Goiás, esses autores relataram uma prevalência (86,8%) e (83%) respectivamente, similares aos resultados desse experimento.

A prevalência de 82,44% supera os resultados encontrados por Moura et al. (2005) de 76,48% em rebanhos bubalino localizados nos municípios de Cachoeira do Arari, Soure, Nova Timboteua, Ipixuna e Moju, no estado Pará, e é consideravelmente maiores, quando comparados ao resultado relatado por Reis (2008), o qual descreveu uma incidência de 57,82% também em bubalinos no município de Soure, na Ilha de Marajó, Pará.

Quando a prevalência da IBR é avaliada de acordo com a localização das propriedades, as fazendas do estado do Amapá apresentaram altos índices de contaminação em relação ao encontrado nas duas propriedades dos municípios na Ilha de Marajó no estado Pará. Entretanto, não foi possível realizar uma comparação da real situação epidemiológica entre os estados, devido à quantidade desproporcionalmente menor de animais e propriedades examinados no Pará.

Os municípios de Cutias do Araguari, Tartarugalzinho e Bailique no estado do Amapá, apresentaram sorologia positiva em 100% dos seus reprodutores. Estes índices superam os verificados dentro de uma única propriedade, em muitos trabalhos já citados (PASSOS et al., 1994; KONRAD et al., 2003; OKUDA et al., 2004; JUNQUEIRA et al., 2006; REIS, 2008).

Observou-se que o município de Soure no estado do Pará, foi o local que apresentou a menor prevalência. Este resultado deve-se a grande quantidade de animais jovens (a maioria na faixa etária dos dois anos) na população estudada neste local, sendo que muitos animais ainda não haviam entrado na maturidade sexual, estando estes menos expostos ao risco de contaminação com o vírus da IBR.

No município de Itaubal do Pírim, onde uma parcela dos animais recebe um razoável manejo reprodutivo, inclusive com uso de inseminação artificial, a prevalência de touros positivos foi alta. Nesta propriedade as novilhas ficam com os reprodutores, antes da primeira Inseminação artificial, deixando-as expostas a infecção pelo HBV-1. Analisando os dados da eficiência reprodutiva verificou-se que as taxas de prenhez pela IA são baixos (por volta dos 30-35%) apesar do controle e vacinação para brucelose realizado nesta fazenda. A alta incidência de animais contaminados com o HBV-1 ocorrendo nos reprodutores desta propriedade mostra-se como uma possível causa da baixa eficiência reprodutiva do rebanho. Entretanto, vários outros fatores podem ser responsáveis por estes baixos índices. Investigações mais específicas com a utilização do isolamento viral e PCR e uma análise da sorologia das fêmeas seriam necessárias para verificar a participação da IBR nos baixos índices reprodutivos observados.

Todas as propriedades apresentaram touros sorologicamente positivos, resultado semelhante ao observado por Okuda et al. (2006) os quais verificaram a presença de bovinos contaminados em todas as 85 propriedades examinadas em Rondônia, porém superiores aos encontrados por Quincozes (2005) a qual verificou que em 84,70% das fazendas pesquisadas no Rio Grande do Sul havia pelo menos um animal positivo e de Vieira et al. (2003) que encontram animais positivos em 96,7% de 90 propriedades estudadas em Goiás, dados que apontam para uma disseminação da IBR em vários rebanhos em todo o território brasileiro. Estes resultados comprovam uma alta prevalência da IBR em reprodutores no baixo Amazonas, Brasil, demonstrando que esta doença é facilmente transmitida entre as populações nesta região.

Ressalta-se ainda a importância dos reprodutores na epidemiologia da IBR, já que esta tem o coito como o principal mecanismo de transmissão. O elevado número de

touros soropositivos nas propriedades sugere uma alta contaminação desses rebanhos, sendo que provavelmente vem ocorrendo ampla disseminação da infecção pelo HBV-1 nas regiões estudadas, visto que a utilização de vacinas contra a IBR nunca foi realizada.

Analisando conjuntamente os resultados obtidos neste trabalho com os dados descritos em bovinos e bubalinos relatados na literatura nacional, verifica-se que a IBR está disseminada em muitos rebanhos em várias regiões do Brasil. Para Del Fava (2001) a obtenção de dados clínicos e zootécnicos a campo é indispensável para a interpretação do impacto da IBR nos rebanhos endemicamente infectados, pois uma elevada taxa de infecção pode caracterizar uma situação de imunidade naturalmente adquirida.

A análise das prevalências entre as raças demonstrou uma significativa diferença entre as raças Mediterrâneo e Murrah. A maior ocorrência da IBR na raça Murrah também foi observada de acordo com a localidade das fazendas. Estes resultados sugerem que os touros da raça Murrah apresentaram-se mais susceptíveis em relação aos da raça Mediterrâneo. Estudos sobre suscetibilidade racial em bubalinos não foram encontrados, entretanto Del Fava (2001) ao realizar levantamentos sorológicos em bovinos das raças Gir, Guzerá, Nelore e Caracu não encontrou diferenças nas prevalências entre raças.

Os resultados referentes à faixa etária demonstraram que os animais pertencentes à faixa etária de até dois anos de idade apresentaram as menores prevalências para IBR e que todos os touros com mais de cinco anos apresentaram-se positivos na sorologia para a IBR. No Marajó a prevalência do HBV-1 não sofreu variação conforme a idade do animal, entretanto no Amapá ocorreu menor índice nos animais de até três anos de idade (p -valor = 0.0067*), havendo um incremento nas taxas de infecção com o avançar da idade.

Estes resultados corroboram com Sarumathi, Reddy e Sreedevi (2002) que relataram em bubalinos da Índia incidência bastante elevada nos animais entre três a seis anos, e com Viera et al. (2003), os quais concluíram que o índice de positividade para o HBV-1 são diretamente proporcionais à idade dos animais, em estudo com bovinos. Faria et al. (2003) também obtiveram dados de prevalência proporcionais a faixa etária, observando ainda que a infecção ocorre com maior frequência em animais com mais de dois anos de idade. Singh et al. (2006) afirmam porém que bubalinos jovens, com idade menor que três anos mostraram-se mais susceptíveis a infecção pelo HBV-1 que as outras faixas de idade (estudo com 472 amostras).

A menor prevalência de animais positivos na população de animais mais jovens demonstra que a idade é um fator que influencia na infecção pelo HBV-1. Aos 24 meses de idade os animais entram na puberdade, iniciando a vida reprodutiva, ficando estes mais facilmente expostos a contaminação pelo agente. Leite et al. (2003) realizaram pesquisa de anti-corpos em bovinos com idade de zero a 30 meses, e verificaram menor prevalência dos seis aos 18 meses, demonstrando que durante este período os animais ainda encontram-se protegidos pelos anti-corpos maternos, entretanto ha uma janela de susceptibilidade ocorrendo nesta faixa etária, sugerindo-se então este o melhor período para se realizar a vacinação contra a IBR.

Os resultados acerca das prevalências nas classes de ECC demonstraram que a prevalência nos animais com ECC “Menor que 3” (71,4%) é menor que nos animais com ECC “Igual a 3”. No Amapá este índice não variou, entretanto na Ilha de Marajó houve um aumento na incidência nas classes de ECC mais elevadas. Outros estudos que avaliam a influência da condição corporal dos indivíduos na prevalência não foram encontrados.

As Diferenças entre os índices de prevalência com relação ao ECC, provavelmente poderão estar relacionadas ao fato de que os animais com maiores escores, possuem uma melhor resposta imune em relação aos outros de menor escore, que provavelmente sofrem de carências nutricionais. Entretanto estes índices podem ainda variar conforme à metodologia empregada, ao tipo de população estudada, ao uso de diferentes técnicas de amostragem, à origem e ao manejo dos animais testados e por diferenças regionais (PITUCO; DEL FAVA, 1998; GUIMARÃES et al., 2000).

Ao realizar-se a análise da distribuição dos títulos de anticorpos neutralizantes para a IBR, observou-se maior frequência de títulos baixos ocorrendo no Marajó, resultado inverso ao visto nos animais pertencentes ao Amapá. Os títulos dos anticorpos na maioria dos indivíduos estudados superam os encontrados por Quincozes (2005), Cerqueira et al. (2000) e Calderon et al. (2003). Van Reenen et al. (2000), relatam que os bovinos com menos de dois anos de idade com títulos de anticorpos de 128 poderiam estar recuperando-se da doença pouco antes da coleta da amostra, ou haver sofrido uma reativação sub-clínica recente.

Pariente, Ccama e Rivera (2006) afirmam que os títulos de anticorpos encontrados em animais reagentes são usualmente observados em infecções por herpesvírus que não se encontram associadas a infecções agudas. Assim, como foi possível observar também neste trabalho, a alta resposta imunológica sugere estar

havendo a multiplicação viral nos indivíduos com altos títulos de anticorpos anti-HBV-1, havendo assim a presença de um grande número de animais que provavelmente estão eliminando o vírus, sem, entretanto demonstrar sintomas clínicos da doença.

Não se determinou, entretanto, que os touros com maiores titulações estavam realmente eliminando o HBV-1 no sêmen, visto que os resultados obtidos no exame de PCR foram todos negativos. Em todas as amostras não havia a presença de DNA viral viável para ser detectado.

Estes resultados diferem dos encontrados por Van Oischort et al. (1993), os quais observaram relação direta entre aumento nos títulos de anticorpos neutralizantes para o HBV-1 e seu isolamento em sêmen, assim como Rocha, Gouveia e Leite (1995), em um experimento realizado em uma central de congelamento de sêmen. Van Engelenburg et al. (1995), utilizaram a técnica de PCR para detectar o HBV-1 no sêmen bovino e obteve sucesso. Em bubalinos, Lata Jain (2006) detectou o vírus da IBR no sêmen utilizando a PCR, e anos mais tarde Lata Jain et al. (2008) reportaram a presença do vírus no sêmen através da técnica de imunofluorescência.

Esta ausência de animais positivos na PCR corrobora com o descrito por Faria et al. (2003), que apontam como uma importante característica epidemiológica da IBR nos touros: a ausência de uma correlação obrigatória entre a detecção de anticorpos específicos circulantes e a eliminação do vírus pelo sêmen. Esta característica deve-se ao que foi descrito por Huck et al. (1971), os quais observaram que a eliminação do vírus pelos touros por volta de dois a sete dias após a infecção pelo coito, sendo que este primeiro período de eliminação viral pode levar algumas semanas, e após esta primeira fase de infecção o vírus entra então em latência não sendo eliminado mais no sêmen.

Outra possível justificativa para a ausência do HBV-1 no sêmen dos touros analisados neste estudo é a conservação incorreta das amostras, pois em muitas propriedades estudadas não havia um modo eficiente de mantê-las refrigeradas, a uma temperatura estável. Entretanto, segundo o *Manual for Standards for Diagnostic Tests and Vaccines* (OIE, 2008), para o transporte do sêmen para o laboratório pode ser utilizado o nitrogênio líquido, ou conservação em caixa isotérmica com gelo a 4°C. As amostras podem ainda ser armazenadas por curtos períodos a 4°C (até sete dias), sem afetar o resultado do teste de PCR. Entretanto durante o transporte das amostras neste experimento, não foi possível realizar o controle da temperatura de conservação, havendo grandes variações, o que comprometeu a viabilidade do HBV-1 para a realização da PCR.

6 CONCLUSÃO

De acordo com as condições dos materiais e métodos utilizados no estudo, podemos concluir que:

- 1- A IBR encontra-se difundida em um elevado número de touros nas propriedades contaminadas.
- 2- Todos os reprodutores nos rebanhos estudados nos municípios de Cutias do Araguari, Tartarugalzinho e Bailique no estado do Amapá, apresentaram-se contaminados pela IBR.
- 3- Os touros da raça Murrah são mais susceptíveis.
- 4- Houve um incremento gradativo das taxas de infecção com o avançar da idade nos touros examinados, assim como nos com melhores ECC.
- 5- Os touros analisados não estavam na ocasião da coleta eliminando o vírus pelo sêmen.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRIL C.; et al. Both viral and host factors contribute to neurovirulence of bovine herpesviruses 1 and 5 in interferon receptor-deficient mice. **Journal of Virology**, v. 78, p. 3644–3653, 2004.

ALY, N. M.; SHEHAB, G. G.; ABD EI-RAHIM, I. H. A. Bovine viral diarrhea, bovine herpesvirus and parainfluenza-3 virus infection in three cattle herds in Egypt in 2000. **Rev. Science Technology Off International Epizootic**, v. 22, n. 3, p. 879-892, 2003.

AOKI, S. M. **Desenvolvimento de novas metodologias para a identificação e caracterização genética de Herpesvírus Bovino tipo 1 (BHV-1)**. 2006. 119 f. Dissertação (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2006.

AUSTRALIA. Australian Government Department of Agriculture, Fisheries and Forestry. **The biology of bovine herpesvirus 1 (BoHV-1)**. Australia, 2005. Disponível em: <www.ogtr.gov.au/pdf/ir/biologybovineherpesvirus.pdf>. Acesso em: 5 nov. 2007.

AYRES, M.; et al. **BioEstat 5: Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas**. 5. ed. Belém-PA: Publicações Avulsas do Mamirauá, 2007. 361 p.

BABIUK, L. A.; VAN DRUNEN, S.; TIKOO, S. K. Immunology of bovine herpesvirus 1 infection. **Veterinary Microbiology**, v. 14, p. 143-148, 1996.

BANKS, M. Living with IBR. **Holstein Journal**, v. 1, n. 3, p. 84-92, 1999.

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

BARBOSA, N. G. S. Bubalinocultura no Estado do Pará. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 29, n. 1, p. 34-38, 2005.

BRUNNER, D.; et al. A comparison of three techniques for detecting bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) in naturally and experimentally contaminated bovine semen. **Zuchthygiene**, v. 23, p. 1–9, 1988.

CALDERON, S. J. J.; et al. Seroprevalence of and risk factors for infectious bovine rhinotracheitis in beef cattle herds of Yucatan, Mexico. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 57, p. 199-208, 2003.

CÂNDIDO, A. L.; et al. Resposta sorológica de ovinos inoculados com plasmídeos codificando a glicoproteína D do herpesvírus bovino 1 (BHV-1). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 3, p. 358-368, 2003.

CÁRDENAS, A. B.; et al. Comparación de tres pruebas diagnósticas para el aborto por rinotraqueítis infecciosa bovina en hatos lecheros. **Veterinaria México**, v. 37, n. 2, p. 151-163, 2006.

CASTRO, R. S.; et al. Prevalence of antibodies to selected viruses in bovine embryo donors and recipients from Brazil, and its implications in international embryo trade. **Tropical Animal Health and Production**, v. 24, n. 3, p. 173-176, 1992.

CAVALCANTE, E. S. Experiências agrícolas nas várzeas do Estado do Amapá. In: WORKSHOP SOBRE AS POTENCIALIDADES DE USO DO ECOSISTEMA DE VÁRZEAS DA AMAZÔNIA, 1., Manaus-AM. **Anais...** EMBRAPA – Conselho Assessor Regional Norte, 1996.

CERQUEIRA, R.B.; et al. Serological survey for bovine herpesvirus 1 in cattle from different regions in the state of Bahia, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 37, n. 6, p. 1-8, 2000.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2 ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998. 49p.

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

CUTERI, V.; et al. Interaction between BVDV and BOHV-1 infection in dairy herds in Italy. In: CONGRESO INTERNACIONAL DE LA FEDERACIÓN MEDITERRÁNEA DE SANIDADE Y PRODUCCIÓN DE RUMINANTES, 14., 2006, Lugo-Santiago de Compostela. **Anais...** Federación Mediterránea de Sanidad y production de ruminantes, 2006. p. 180-186.

DE CARLOS, E.; et al. Molecular characterisation of a field strain of bubaline herpesvirus isolated from buffaloes (*Bubalus bubalis*) after pharmacological reactivation. **The Veterinary Record**, v. 154, n. 6, p. 171-174, 2004.

DEL FAVA, C. **Índices reprodutivos e características de desempenho em bovinos de corte infectados e não infectados pelo herpesvírus bovino tipo 1 (HVB-1)**. 2001. 127f. Dissertação (Doutorado em clínica veterinária). Departamento Clínica Médica, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

DEL FAVA, C.; PITUCO, E. M.; GENOVEZ, M. E. Diagnóstico diferencial de doenças da reprodução em bovinos: experiência do instituto biológico. **Arquivo Instituto Biológico**, v. 69, n. 2, p. 73-79, 2007.

REIS, W. M. **Ocorrência de anticorpos para Herpesvírus Bovino tipo 1 em Búaflos (*Bubalus bubalis*)**. 2008. 47 f. Dissertação (Graduação em Medicina Veterinária) – Universidade Federal Rural da Amazônia, Pará, 2008.

DURHAM P. J. K.; SILLARS H. M. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for serodiagnosis of infectious bovine rhinotracheitis infection, with results of a preliminary survey. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 34, n. 3, p. 27-30, 1986.

EDWARDS, S.; ROEDER, P. L. Attempted reactivation of latent bovine herpesvirus 1 infection in calves by infection with ruminant pestiviruses. **Veterinary Microbiology**, v. 8, n. 6, p. 563-569, 1983.

ENGELS, M.; ACKERMANN, M. Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. **Veterinary Microbiology**, v. 53, n. 1-2, p. 3-15, 1996.

ESPÍ, A.; et al. Etiología del aborto infeccioso en los bovinos en Asturias. **Medicina Veterinaria**, v. 17, n. 5, p. 117-132, 2000.

FAO. Food and Agricultura Organization of the United Nations. Disponível em: <<http://faostat.fao.org>>. Acesso em: 05 jan. 2005.

FARIA, B. O.; et al. Estudo de anticorpos contra o herpesvírus bovino tipo 1 em municípios de entorno de Goiânia, Go. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, n. 3, p. 543-545, 2003.

FENNER, F. J.; et al. **Veterinary virology**, 2 ed. San Diego: Academic Press, 1993. p. 337-368.

FRAZIER, K.; et al. Endometritis in postparturient cattle associated with bovine herpesvirus-4 infection: 15 cases. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 13, p. 502-508, 2001.

FULTON, R. W.; et al. Maternally derived humoral immunity to bovine viral diarrhea virus (BVDV) 1a, BVDV1b, BVDV2, bovine herpesvirus-1, parainfluenza-3 virus, bovine respiratory syncytial virus, Mannheimia haemolytica and Pasteurella multocida in beef calves, antibody decline by half-life studies and effect on response to vaccination. **Vaccine**, v. 22, p. 643-649, 2004.

GALVÃO, C.; DOLIA, J.; ALICE, F. Anticorpos neutralizantes para o vírus da rinotraqueíte infecciosa dos bovinos no Brasil. **Instituto biológico**, v. 6, n. 1, p. 15-25, 1963.

GEE, A. L. W.; WAGTER, L. H. A.; HAGE, J. J. The use of a polymerase chain reaction assay for the detection of bovine herpesvirus 1 in semen during a natural outbreak of infectious bovine rhinotracheitis. **Veterinary Microbiology**, v. 53, p. 163-168, 1996.

GUARINO, H.; et al. Prevalence of serum antibodies to bovine herpesvirus-1 and bovine viral diarrhea virus in beef cattle in Uruguay. **Preventive Veterinary Medicine**, 2008. No prelo.

GUIMARÃES, P. L. S. N.; et al. Frequência de anticorpos contra o vírus da diarréia viral bovina em bovinos do entorno de Goiânia, em regime de criação semi-extensivo. **Ciência Animal Brasileira**, v. 1, n. 2, p. 137-142, 2000.

HAGE, J. J.; et al. Reactivation of latent bovine Herpesvirus 1 in cattle seronegative to gB and gE. **Veterinary Microbiology**, p. 60, n. 2-4, p. 87-98, 1998.

HUCK, R. A.; et al. Penoposthitis associated with infectious bovine rhinotracheitis-infectious pustular vulvovaginitis (I.B.R-I.P.V.) virus in a stud of bulls. **Veterinary Records**, v. 88, p. 292-297, 1971.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo Agropecuário 2009: resultados preliminares. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/2009/default.shtm>>. Acesso em: 30 abril 2009.

JANZEN, E. D.; J.N. SMART, J. N.; NICHOLSON, H. H. Observations on an outbreak of infectious bovine rhinotracheitis in a bull test station. **Canada Veterinary Journal**, v. 21, p. 24-27, 1980.

JUNQUEIRA, J. R. C., ALFIERI, A. A. Falhas na reprodução na pecuária bovina de corte com ênfase para causas infecciosas. **Ciências Agrárias**, v. 27, n. 2, p. 289-298, 2006.

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

KAMPA, J.; et al. BVDV and BHV-1 Infection in dairy herds in northern and northeastern Thailand. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 45, p. 181-192, 2004.

KIRKBRIDE, C. A. Managing an outbreak of livestock abortion - 2: diagnosis and control of bovine abortion. **Veterinary Medicine**, v. 80, n. 5, p. 70-79, 1985.

KIRKBRIDE, C. A. Viral agents and associated lesions detected in a 10-year study of bovine abortions and stillbirths. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 4, p. 374-379, 1992.

KONRAD, P. A.; et al. Associação da ocorrência da rinotraqueíte infecciosa bovina e problemas reprodutivos em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, n. 4, p. 647-651, 2003.

KAASHOEK, M. J.; et al. A conventionally attenuated glycoprotein E-negative strain of bovine herpesvirus type 1 is an efficacious and safe vaccine. **Vaccine**, v. 12, p. 439-444, 1994.

KRAMPS, J. A.; et al. A simple, specific, and highly sensitive blocking enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to bovine herpesvirus 1. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, p. 2175-2181, 1994.

KUNRATH, C. F.; et al. Soroneutralização e imunofluorescência utilizando anticorpos monoclonais no diagnóstico rápido de infecções pelo herpesvírus bovino tipos 1 e 5 (BHV-1 e BHV-5). **Ciência Rural**, v. 34, n. 6, p. 1877-1883, 2004.

LATA JAIN B. V. **Detection of Bovine Herpesvirus 1 (BHV-1) infection in breeding bulls by serological and molecular methods and its characterization by sequencing of pcr products.** 2006. 95 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Veterinária) – College of Veterinary Science and Animal Husbandry – Anand Agricultural University, 2006.

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

LEITE, R. C. Infecções por herpesvírus bovino-1(HBV-1). SIMPÓSIO PFIZER SOBRE DOENÇAS INFECCIOSAS E VACINAS PARA BOVINOS, 1., 1996, Guarulhos-São Paulo. **Anais...** Guarulhos: Laboratórios Pfizer, 1996. p. 33-34.

LEITE, R. M. H; et al. Distribuição por faixa etária de IBR e BVD para bovinos no Estado da Paraíba, Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, n. 3, p. 541-543, 2003.

LIMA, R. R.; TOURINHO, M. M. **Várzeas da Costa Amapaense: principais características e possibilidades agropecuárias.** Belém: FCAP, Serviço de Documentação e Informação, 1994. 56p.

MCKERCHER, D. C.; et al. Recent development on upper respiratory disease of cattle. **Proceeds AMU Meet US Animal Health Association**, v. 59, p. 151-172, 1955.

MEYER, A. D.; et al. Comparação das técnicas de isolamento viral e nested PCR na detecção do BHV-1 em sêmen bovino experimentalmente e naturalmente contaminado. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 70, n. 2, p. 123-126, 2003.

MISHRA, P. K.; et al. Detection of infectious bovine rhinotracheitis (IBR) virus in semen by immunofluorescence technique. **Indian Journal of Veterinary Medicine**, v. 2, p. 62-64, 1982.

MOLNÁR, E.; et al. Prevalência da infecção pelo vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) em bubalinos e bovinos no estado do Pará, Brasil, **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 25, n. 2, 2001.

MOORE, S.; GUNN, M.; WALLS D. A rapid and sensitive PCR-based diagnostic assay to detect bovine herpesvirus 1 in routine diagnostic submissions. **Veterinary Microbiology**, v. 75, p. 145–153, 2000.

MOREIRA, S. P. G.; et al. Monitoração de anticorpos neutralizantes para o vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina em bezerros. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, n. 3, p. 127-130, 2001.

MOURA, A. C. B. ; et al. Ocurrencia de bufalinos (*Bubalus bubalis*) sororeaccionantes a los virus de la rinotraqueitis infecciosa bovina, diarrea bovina a virus, estomatitis vesicular y leucosis enzootica de los bovinos, criados en La Amazônia Oriental. In: CONGRESO LATINOAMERICANO DE BUATRÍA, 12. 2005, Valdivia. **Anales...** Valdivia: 2005. p. 270-271.

MWEENE, A. S.; et al. The prevalence of bovine herpesvirus-1 in traditional cattle in Southern Province, Zambia. **Revue Scientifique et Technique del Office International Des Epizooties**, v. 22, n. 3, p. 873- 877, 2003.

NASCIMENTO, C.; CARVALHO, L. O. M. **Criação de búfalos: alimentação, manejo, melhoramento e instalações**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1993.

OBANDO, C.; et al. Efecto de la infección con los virus de rinotraqueitis infecciosa bovina y diarrea viral bovina sobre la reproducción en bovinos no vacunados. **Veterinária**, v. 14, n. 3, p. 1-11, 2004.

OIE. WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH. **Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals**. 6 ed. Paris: OIE, 2008. v. 2. 1343 p.

OKUDA, L. H.; et al. Inquérito soro-epidemiológico do herpesvírus bovino tipo 1 (BOHV-1) no município de Monte Negro, estado de Rondônia, Brasil. **O Biológico**, v. 68, Suplemento 2, p. 272-275, 2006.

OKUDA, L. H.; et al. Ocorrência de HVB-1 em partidas de sêmen de uma central de inseminação artificial, Brasil. Resultados preliminares. **Arquivo Instituto Biológico**, v. 71, p. 474-476, 2004.

PACELLI, F.; et al. A multiplex PCR for the detection of the main agents responsible of abortion in mediterranean búfalo (*Bubalus bubalis*) from aborted fetuses. In: CONGRESSO NAZIONALE SULL ALLEVAMENTO DEL BUFALO, 3., 2005, Capaccio-Paestum (SA). **Anais...** Associazione Nazionale Allevatori Specie Bufalina, 2005. p. 12-15.

PARIENTE, E. A.; CCAMA, A. S.; RIVERA, H. G. Anticuerpos contra el virus causante de la rinotraqueitis infecciosa en vacunos de la provincia de Melgar, Puno. **Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú**, v. 17, n. 2, p. 137-143, 2006.

PASSOS, E.C.; et al. Pesquisa do vírus da rinotraqueíte infecciosa (IBR/IPV) em sêmen e swab prepulcial e estudo da persistência de anticorpos em touros doadores. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 16, n. 3-4, p. 87-93, 1992.

PASTORET, P .P.; THIRY, E. Diagnosis and prophylaxis of infectious bovine rhinotracheitis: the role of virus latency. **Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases**, v. 8, n. 1, p. 35-42, 1985.

PELLEGRIN, A. O.; et al. Doenças da reprodução e conservação genética: levantamento no núcleo de conservação do bovino pantaneiro. **EMBRAPA: Comunicado Técnico**, n. 21, p. 1-4, 1997.

PERRIN, B.; et al. European comparative study of serological methods for the diagnosis of infectious bovine rhinotracheitis. **Revue Scientifique et Technique International des Epizooties**, v. 12, p. 969–984, 1993.

PHARANDE, R. R., DESHMUKH, V. V., GUJAR, M. B. Seroprevalence and Characterization Studies of Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus. In: INTERNATIONAL CONFERENCE OF THE ASSOCIATION OF INSTITUTIONS FOR TROPICAL VETERINARY MEDICINE AND 16TH VETERINARY ASSOCIATION MALAYSIA CONGRESS, 11., 2004, Petaling-Jaya. **Anais...** Petaling: Veterinary Association Malaysia, 2004. p. 300-301.

PIDONE, H.; GALOSI, C.; ETCHEVERRIGARAY, M. Herpes bovinos 1 y 5. **Analecta Argentina**, v. 19, p. 40-50, 1999.

PITUCO, E. M.; DEL FAVA, C. Situação do BHV-1 na América do Sul. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE HERPESVÍRUS BOVINO (TIPO 1 E 5) E VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA (BVDV), 1., 1998, Santa Maria – RS. **Anais...** Santa Maria, 1998. p. 75-81.

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

QUINCOZES, C. G. **Prevalência e fatores de risco associados às infecções pelos herpesvírus bovino tipo 1 e 5 (BHV-1 e 5) e pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV) nos rebanhos dos municípios de Santa vitória do palmar e Chuí.** 2005. 117f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade Federal de Pelotas, Rio Grande do Sul, 2005.

REED, D. E.; et al. Infectious bovine rhinotracheitis virus-induced abortion: rapid diagnosis by fluorescent antibody technique. **American Journal of Veterinary Research**, v. 32, p. 1423-1426, 1971.

RENUKARADHYA G. J, RAJASEKHAR M., RAGHAVAN R. Prevalence of infectious bovine rhinotracheitis in southern India. **Revue Scientifique et Technique**, v. 15, n. 3, p. 1021-1028, 1996.

RIET-CORREA, F.; et al. Viroses confundíveis com febre aftosa: revisão bibliográfica. **Ciência Rural**, v. 26, p. 323-332, 1996.

ROCHA, M. A.; GOUVEIA, A. M. G.; LEITE, R. C. Detecção de anticorpos para o herpesvírus bovino-1 em touros de uma central de sêmen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 19, n. 3-4, p. 181-186, 1995.

ROCHA, M. A.; GOUVEIA, A. M. G.; LEITE, R. C. Herpesvírus bovino tipo 1 no sêmen. **Ciência Rural**, v. 29, n. 2, p. 373-380, 1999.

ROCHA, M. A.; et al. Pesquisa de anticorpos para IBR em amostragem de demanda no Estado de Minas Gerais, 1990-1999. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 6, p. 645-647, 2001.

ROCHA, M.A. Diagnóstico da rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.23, p.535-539, 1999.

ROEHE, P. M.; WEIBLEN, R. IBR e BVD: perguntas e respostas mais comuns. **A Hora Veterinária**, v. 20, n. 116, p. 69-73, 2000.

SARUMATHI, C.; REDDY, T. V.; SREEDEVI, B. A study on seroepizootiology of infectious bovine rhinotracheitis in Andhra Pradesh. **Indian Journal of Comparative Microbiology, Immunology**, v. 23, p. 153-155, 2002.

SAXEGAARD, F. Infectious bovine rhinotracheitis/ infectious pustular vulvovaginitis (IBR/ IPV) virus infection of cattle with particular reference to genital infections. **Veterinary Bull**, v. 40, p. 605-611, 1970.

SCHIEFER, P.; et al. Seroprevalence of antibodies to ruminant pestiviruses in sheep and goats in Tyrol (Austria). **Dtsch. Tierarztl. Wochenschr**, v. 113, n. 2, p. 55-58, 2006.

SCHROEDER, R. J.; MOYS, M. D. An acute upper respiratory infection of dairy cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 125, p. 471-472, 1954.

SCHWYZER, M.; ACKERMANN, M. Molecular virology of ruminant herpesviruses. **Veterinary Microbiology**, v. 53, p. 17-29, (1996).

SEPOF. Secretaria executiva de Estado de Planejamento, Orçamento e Finanças. 2008. Disponível em: <<http://www.sepof.pa.gov.br>>. Acesso em 23 jan. 2008.

SETIÉN, J. A. A. El virus de la einotraqueítis infecciosa bovina (*Bovid Herpesvirus 1*) propiedades y vacunación. **Ciência Veterinária**, v. 4, p. 161-202, 1987.

SHEN, D. T.; BURGER, D.; LI, Z.; GORHAM, J. R. Characterization of monoclonal antibodies to bovine herpesvirus type 1, Los Angeles strain, **Veterinary Microbiology**, v. 28, n. 1, p. 25-37, 1991.

SHOPE JUNIOR, R. E. Bovine rhinotracheitis complex. **Journal of Dairy Science**, v. 53, n. 5, p. 619-621, 1970.

SINGH, R.; et al. Infectious bovine rhinotracheitis serosurveillance in Uttar Pradesh. **Journal of Immunology and Immunopathology**, v. 8, n. 2, 2006.

SILVA, M. S. T.; et al. **Programa de Incentivo a Criação de Búfalos por Pequenos Produtores** – PRONAF. Belém, PA: CPATU, 2003.

SMITS, C. B.; et al. Comparison of three polymerase chain reaction methods for routine detection of bovine herpesvirus 1 DNA in fresh bull semen. **Journal of Virological Methods**, v. 85, p. 65-73, 2000.

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

TAKIUCHI, E.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Herpesvírus bovino tipo 1: Tópicos sobre a infecção e métodos de diagnóstico. **Ciências Agrárias**, v. 22, n. 2, p. 203-209, 2001.

TAKIUCHI, E.; et al. A. Otimização da reação em cadeia pela polimerase (*Semi Nested-PCR*) para a detecção do herpesvírus bovino tipo 1 em fragmentos de órgãos fetais e em sêmen de bovinos naturalmente infectados. **Ciências Agrárias**, v. 24, n. 1, p. 43-56, 2003.

TIKOO, S. K., CAMPOS, M., BABIUK, L. A. Bovine herpesvirus 1 (BHV-1): biology, pathogenesis, and control. **Advances in Virus Research**, v. 45, p. 191-223, 1995.

TOURINHO, M. M. Fatores que interferem na formação e padrão do uso das várzeas. In: WORKSHOP SOBRE AS POTENCIALIDADES DE USO DO ECOSSISTEMA DE VÁRZEAS DA AMAZÔNIA, 1., Manaus-AM. **Anais...** EMBRAPA – Conselho Assessor Regional Norte, 1996.

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

VAN ENGELENBURG, F. A.; et al. Development of a rapid and sensitive polymerase chain reaction assay for detection of bovine herpesvirus type 1 in bovine semen. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, p. 3129-3135, 1993.

VAN ENGELENBURG, F. A.; et al. Excretion of bovine herpesvirus 1 in semen is detected much longer by PCR than by virus isolation. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 308-312, 1995.

VAN OIRSCHOT, J. T. Bovine herpesvirus 1 in semen of bulls and the risk of transmission: a brief review. **Veterinary Quarterly**, v.17, p. 29-33, 1995.

VAN OIRSCHOT J. T.; et al. An enzyme-linked immunosorbent assay to detect antibodies against glycoprotein gE of bovine herpesvirus 1 allows differentiation between infected and vaccinated cattle. **Journal of Virological Methods**, v. 67, p. 23–34, 1997.

VAN OIRSCHOLT, J. T.; et al. A subclinical infection of bulls with bovine herpesvirus type I at an artificial insemination centre. **Veterinary Record**, 132: 32-35, 1993.

VAN REENEN, C.; et al. Social isolation may influence responsiveness to infection with Bovine Herpesvirus 1 in veal calves. **Veterinary Microbiology**, v. 75, p. 135-143, 2000.

VIERA, S.; et al. Anticorpos para o herpesvírus bovino 1 (BHV-1) em bovinos do estado de Goiás. **Ciência Animal Brasileira**, v. 4, n. 2, p. 131-137, 2003.

VOET, D; VOET, J. G **Biochemistry**, 3 ed. New York: Wiley, 2004, 566 p.

WALDNER, C. L. Serological status for *N. caninum*, bovine viral diarrhea virus, and infectious bovine rhinotracheitis virus at pregnancy testing and reproductive performance in beef herds USA. **Animal Reproduction Science**, v. 90, n. 3-4, p. 219-242, 2005.

WINKLER, M. T. C.; DOSTER, A.; JONES, C. Bovine herpesvirus 1 can infect CD41 T lymphocytes and induce programmed cell death during acute infection of cattle. **Journal of Virology**, v. 73, n. 10, p. 8657–8668, 1999.

YATES, W. D. G. A review of infectious bovine rhinotracheitis, shipping fever pneumonia and viral-bacterial synergism in respiratory diseases of cattle. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v.46, p.225-263, 1982.

XIA, J. Q.; YASON, C. V.; KIBENGE, F. S. B. Comparison of dot blot hibridization, polymerase Chain reaction, and virus isolation for detection of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) in artificially infected bovine semen. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 59, p. 102-109, 1995.