

Ocorrência do vírus da leucose enzoótica dos bovinos (BLV) e de anticorpos contra herpesvírus bovino tipo-1 (BoHV-1) e vírus da diarreia viral bovina (BVDV) em búfalos no Estado do Pará

Bovine Leukosis Virus and Antibodies against Bovine Herpesvirus Type-1 and Bovine Viral Diarrhea Virus and in Buffaloes of the State of Pará, Brazil

Rinaldo Batista Viana¹, Claudia Del Fava², Bruno Moura Monteiro³,
Ana Carolina de Barros Moura⁴, Rodrigo dos Santos Albuquerque⁵, Elyzabeth da Cruz Cardoso⁶,
Cláudio Vieira de Araújo⁷, & Edviges Maristela Pituco⁸

ABSTRACT

Background: Viral diseases affecting reproduction cause economic losses in cattle, as reproductive failure interrupts the production cycle, thus reducing herd productivity. Buffaloes are susceptible to most of the diseases that affect cattle. Some of the viral diseases of reproductive importance are infectious bovine rhinotracheitis (IBR), bovine viral diarrhoea (BVD), and bovine leukosis (BL). The objective of this study was to determine the seroprevalence of IBR virus (bovine herpes virus-1, BoHV-1), BVD virus (BVDV), and BL virus (BLV) in female buffaloes living in wetland areas or plains in the state of Pará, as well as the seroprevalence of BoHV-1, BVDV, and BLV in females of different age groups.

Materials, Methods & Results: It were used 225 crossbred buffaloes from 4 buffalo exclusive farms. The buffaloes reared on farms A (n = 50) and B (n = 89) were kept in wetland areas on Marajó Island (n = 139), Pará. On farms C (n = 30) and D (n = 56) buffaloes were kept in plains (n = 86) in a northeastern mesoregion of Para. Animals were categorized into age groups: I: 0-3 years (n = 34), II: 3-6 years (n = 58), III: 7-9 years (n = 55), and IV: over 9 years (n = 78). Blood samples were collected and sera were sent for processing at the Bovine Virus Laboratory, Biological Institute of São Paulo, Brazil. The presence of IBRV and BVDV was determined by neutralization and BLV antibodies by immunodiffusion in agar gel. Statistical analysis was performed using the χ^2 test at a significance level of 5%. Among the seroprevalences of IBRV, BVDV and BLV antibodies, the difference in prevalence for BVD [$P < 0.01$] was observed between wetland areas and plains of Para, varying from 12.4% to 96.0% and 0.0% to 13.3%, respectively. While levels of IBRV remained high on farms A (79.6%), B (86.5%), C (83.3%) and D (89.1%) [$P = 0.60$] and BLV was negative in all the animals. BVDV was similar for all the age groups [$P = 0.60$], while IBRV was more prevalent in animals over 6 years of age with group I: (76.5%), II (74.5%), III (92.3%) and IV (91.3%) [$P = 0.01$]. It was not possible to verify the influence of age in prevalence for BL.

Discussion: The prevalence obtained for the BoHV-1 on farms was high, with little variation between 79.6% and 89.1%. The high prevalence of BoHV-1 suggests the free circulation of the virus in the state of Para. Notably, the animals in this study had not been vaccinated, so the determined viral antibody titers were independent of vaccination. BVDV results showed high variation between 0.0% and 96.0%. The highest prevalence in wetland areas may be related to the breeding environment, because of a possible horizontal contamination. The lack of BLV antibodies prevalence can be attributed to the fact that all the evaluated animals were kept in an extensive breeding system where they had little direct contact. The prevalence of IBR was higher in the older animals. Variation in prevalence with age was not observed for BVD. It was concluded that the prevalence for IBR and BVD were high indicating that the etiological agents are circulating in Para, with IBR having a higher prevalence in older animals. Breeding buffalo in wetland areas may favor horizontal transmission of BVDV because facilitate contact of healthy animals with water contaminated by virus carriers animal secretion and the absence of seropositive animals at the BLV does not necessarily indicate that buffaloes are resistant to the virus.

Keywords: buffalo, viral diseases, IBR, BVD, leukosis.

Received: 24 September 2015

Accepted: 4 May 2016

Published: 16 May 2016

¹Instituto da Saúde e Produção Animal (ISPA), Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), Belém, PA, Brazil. ²Laboratório de Anatomia Patológica (LAP), Instituto Biológico (IB), São Paulo, SP. ³Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brazil. ⁴Diagro - Agência Defesa e Inspeção Agropecuária do Amapá, Macapá, AP. ⁵Faculdade de Ciência Agrárias e Veterinárias (FCAV), Universidad, e Estadual Paulista (UNESP), Jaboticabal, SP. ⁶Universidade Federal Fluminense (UFF), Niterói, RJ. ⁷Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT), Sinop, MT, Brazil. ⁸Laboratório de Vírus de Bovídeos (LVB), Instituto Biológico (IB), São Paulo, SP, Brazil. CORRESPONDENCE: R.B. Viana [rinaldovianna@hotmail.com - Tel.: +55 (91) 3210-5244]. ISPA - UFRA. Av. Tancredo Neves, 2501, Montese. CEP 66077-830 Belém, PA, Brazil.

INTRODUÇÃO

A ocorrência de doenças virais que afetam a reprodução está entre as causas de prejuízos econômicos na bubalinocultura, visto que a falha reprodutiva interrompe o ciclo de produção, reduzindo a produtividade dos rebanhos [16]. Embora a rusticidade dos búfalos seja uma peculiaridade valiosa para a espécie, esses animais são conhecidos por apresentarem susceptibilidade as mais variadas doenças parasitárias, bacterianas e virais que acometem os bovinos [31]. Dentre as viroses de importância reprodutiva são descritas principalmente a rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), diarréia viral bovina (BVD) e a leucose enzoótica dos bovinos (LEB) [4,12].

O herpesvírus bovino tipo-1 (BoHV-1) causador da IBR está relacionado com infertilidade, reabsorção embrionária e abortamentos [22]. O vírus da BVD, que é considerado um dos mais importantes patógenos em bovinos [14], pode causar mortalidade embrionária, abortamentos e o nascimentos de bezerras fracas, persistentemente infectados, teratogênicos ou natimortos [10]. Por fim, a LEB impacta em perdas nas exportações, condenação de carcaças em frigoríficos e no descarte prematuro de animais, particularmente aqueles com alto mérito genético ainda no início da vida reprodutiva [29].

Levando-se em consideração o impacto econômico desses agentes na bubalinocultura e o importante papel do Estado do Pará no cenário da pecuária nacional, objetivou-se com esta pesquisa realizar a soroprevalência para os vírus BoHV-1, BVDV e BLV em fêmeas bubalinas, de diferentes grupos etários, criadas em áreas de várzea ou terra firme.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Foram utilizadas 225 búfalas das raças Murrah e Mediterrâneo em quatro fazendas com criação exclusiva de bubalinos. As fêmeas das fazendas A (n = 50) e B (n = 89) eram criadas em áreas de várzea na Ilha de Marajó (n = 139), Estado do Pará. Nas fazendas C (n = 30) e D (n = 56) as búfalas eram mantidas em áreas de terra firme (n = 86) na Mesorregião do Nordeste do Estado do Pará. Os animais também foram alocados em grupos de idade: I - 0 a 3 anos (n = 34); II - 3 a 6 anos (n = 58); III - 7 a 9 anos (n = 55); e IV - mais de 9 anos (n = 78).

Colheita das amostras biológicas e exames laboratoriais

As amostras de sangue foram colhidas em tubos de vidro siliconados de 10 mL sem anti-coagulantes por punção da veia jugular externa, utilizando-se agulhas para múltiplas colheitas 25 x 8 mm (21 G1) (sistema BD Vacutainer®)¹. No laboratório, as amostras foram centrifugadas 1500 g, durante 15 min; a seguir, o soro foi armazenado em microtubos a -20°C até a realização das provas. O soro foi encaminhado para processamento no Laboratório de Viroses de Bovídeos, Instituto Biológico de São Paulo, Brasil. Nenhum animal utilizado neste experimento fora vacinado contra nenhuma das doenças pesquisadas. A presença de anticorpos específicos das doenças pesquisadas neste estudo foi diagnosticada utilizando-se as seguintes técnicas:

o IBR: 214 amostras foram analisadas por soroneutralização (SN) em microplacas para pesquisa de anticorpos contra o BoHV-1.

o BVD: 175 amostras foram submetidas à soroneutralização em microplacas para pesquisa de anticorpos contra o BVDV (cepa Los Angeles).

o LEB: 218 amostras foram examinadas pela técnica de imunodifusão em ágar gel (IDAG; TECPAR).

Cada amostra foi testada na diluição 1:4, distribuindo-se 50 µL desta diluição em quatro cavidades da microplaca. Desta forma, em cada placa foram testadas 22 amostras de soro. A seguir foram adicionados 50 µL da suspensão viral e incubados em estufa a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂ por 1 h. Após este período foi adicionada 50 µL da suspensão de células de rim fetal bovino contendo 300.000 células/mL em cada cavidade e incubadas nas mesmas condições anteriores por 72 h. A leitura foi realizada em microscópio invertido para visualização do efeito citopático. Foram consideradas positivas as amostras que neutralizaram 50% das cavidades. Os testes diagnósticos foram realizados de acordo com as normas exigidas pela OIE- Organização Internacional de Epizootias [28].

A análise estatística foi realizada, utilizando-se o teste do Qui-quadrado (χ^2) com nível de significância de 5%. Os resultados foram descritos de acordo com a prevalência geral e separados por fazenda e idade.

RESULTADOS

Na pesquisa de BLV e de anticorpos contra o BoHV-1, BVDV as fazendas (Tabela 1) mostraram

diferenças somente para o BVDV ($P < 0,01$). A sorologia pra BoHV-1 se manteve alta em todas as fazendas ($P = 0,60$), enquanto que para BLV foi negativa em todos os animais. No que tange às diferentes nos grupos

etários (Tabela 2), o BVDV se mostrou semelhante em todas as faixas etárias ($P = 0,60$), enquanto o BoHV-1 se mostrou mais prevalente em animais acima de 6 anos de idade ($P = 0,01$).

Tabela 1. Ocorrência do Vírus da Leucose Enzoótica dos Bovinos (BLV; IDAG) e de Anticorpos Contra Herpesvírus Bovino Tipo-1 (BoHV-1; SN), Vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV; SN) em búfalos de quatro fazendas (A, B, C e D) localizadas no Estado do Pará

Fazenda	Animais sororreagentes		
	IBR	BVD	LEU
A Várzea	79,6% (39/49)	96,0% (48/50) ^a	0,0% (0/50)
B Várzea	86,5% (77/89)	12,4% (11/89) ^b	0,0% (0/89)
C Terra firme	83,3% (25/30)	13,3% (4/30) ^b	0,0% (0/30)
D Terra firme	89,1% (41/46)	0,0% (0/6) ^c	0,0% (0/49)
Total	85,0% (182/214)	36,0% (63/175)	0,0% (0/218)
Qui-quadrado	$P = 0,60$	$P < 0,01$.

IDAG – imunodifusão em ágar. SN – soroneutralização. Letras minúsculas distintas na mesma coluna indicam diferença significativa entre si. $P < 0,01$ pelo teste do Qui-quadrado (χ^2).

Tabela 2. Ocorrência do Vírus da Leucose Enzoótica dos Bovinos (BLV; IDAG) e de Anticorpos Contra Herpesvírus Bovino Tipo-1 (BoHV-1; SN), Vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV; SN) em soros de búfalos de diferentes idades (0-3, 3-6, 6-9 e >9 anos), criados no Estado do Pará

Idade (anos)	Animais sororreagentes		
	IBR	BVD	LEU
I (0 a 3)	76,5% (26/34) ^b	41,2% (14/34)	0,0% (0/34)
II (3 a 6)	74,5% (41/55) ^b	35,3% (12/34)	0,0% (0/56)
III (6 a 9)	92,3% (48/52) ^a	38,1% (16/42)	0,0% (0/54)
IV (>9)	91,3% (63/69) ^a	38,2% (21/55)	0,0% (0/70)
Total	85,0% (178/210)	36,0% (63/175)	0,0% (0/214)
Qui-quadrado	$P = 0,01$	$P = 0,60$.

IDAG – imunodifusão em ágar. SN – soroneutralização. Letras minúsculas distintas na mesma coluna indicam diferença significativa entre si. $P < 0,01$ pelo teste do Qui-quadrado (χ^2).

DISCUSSÃO

Embora a SN não apresente uma alta sensibilidade e não permita uma diferenciação precisa entre os animais infectados com BoHV-1 e BoHV-5 [34], e exista a possibilidade de reação cruzada entre os dois herpesvírus, é possível avaliar a diferença de títulos de anticorpos, que para a espécie alvo, o título é maior. Além disso, apesar da grande similaridade, o BoHV-1 e o BoHV-5 podem ser diferenciados por análise de restrição enzimática do genoma, pelo perfil de polipeptídeos virais produzidos em células de cultivo, pela distinta reatividade com alguns anticorpos monoclonais (AcMs) e por testes de neutralização cruzada *in vitro* [11,32].

A prevalência obtida para o BoHV-1 nas fazendas foi alta e com pouca variação. Estes resultados são similares àqueles descritos em estudos realizados por Ferreira *et al.* [15] que verificaram soropositividade de 82,4% (155/188) para o BoHV-1 em búfalos no Estado do Amapá, utilizando soroneutralização. A alta prevalência para o BoHV-1 tanto no presente estudo quanto naquele também realizado no Norte do Brasil sugerem a livre circulação do vírus. Ademais, vale ressaltar que os animais do presente estudo não foram vacinados, portanto, não existe reação vacinal nos búfalos examinados.

Todavia, esses resultados são discordantes daqueles obtidos por Roncoroni *et al.* [31] que obtiveram soroprevalência para o BoHV-1 de 25,0% (116/465) em búfalos na Itália. A diferença entre os estudos pode estar relacionada à utilização de um ELISA glicoproteína gE, que por sua vez é capaz de diferenciar um animal vacinado de outro infectado naturalmente por meio da detecção de anticorpos contra a proteína ausente no vírus vacinal (gE) e presente no vírus a campo [8], assim como em relação às diferentes prevalências da doença nos dois países. Em outro estudo realizado na Turquia, também utilizando a mesma técnica adotada no presente estudo (virusneutralização) a prevalência também foi menor (198/452; 43,8%) [19].

Os resultados encontrados para o BVDV apresentaram alta disparidade, variando de 96,0% (fazenda A) a nenhum animal sororreagente (fazenda D). Estudos epidemiológicos de prevalência são influenciados por vários fatores dentre eles: o número de animais amostrados, idade dos animais, tempo de amostragem, condições de manejo e criação, além da diferença individual de cada animal [2]. Na presente pesquisa, os animais alocados nas várzeas da Ilha do

Marajó (fazendas A e B) apresentaram maior número de amostras sororreagentes do que aqueles animais residentes em área de terra firme no Nordeste paraense (fazendas C e D). Estas maiores prevalências poderiam estar relacionadas ao ambiente criatório, visto que áreas alagadiças podem favorecer a contaminação horizontal, que acontece por meio das secreções dos animais contaminados pelo BVDV [17]. No entanto, a principal forma de prevenção é a detecção e eliminação precoce de animais persistentemente infectados, que são o grande entrave no combate a profilaxia da doença [17, 18].

Existe uma grande variação de resultados realizados no mundo para detecção da diarreia viral em búfalos. Achados descritos na Itália revelaram soropositividade para BVD em 22,0% dos animais (102/465) [31]. Da mesma forma na Turquia, por meio do teste de microneutralização foi observada uma soropositividade de 56,8% (257/452) nas amostras de soro bubalino pesquisadas [19]. No Irã também foram detectados 33,9% (105/310) reagentes positivos para o BVD pelo teste de soroneutralização [20].

Na presente pesquisa, nenhum dos soros analisados foi considerado reagente para BLV. Constatação semelhante aos autores [1,23,30] que não encontraram búfalos positivos pela IDGA para anticorpos contra o HTLV-BLV, mesmo os búfalos sendo criados juntamente com os bovinos. No Paquistão foi relatada uma pequena soroprevalência da doença, na qual apresentou 0,8% (3/370) de búfalos soropositivos para BLV [24].

No Brasil, mais precisamente no Estado do Maranhão, foram encontrados 4,2% (10/232) de búfalos soropositivos para o BLV [9]. Aproximadamente 568 amostras de búfalos criados do Estado do Pará apresentaram soropositividade após a inoculação com sangue bovino, com prevalência que variaram de 24,6% (IDGA) a 42,2% (ELISA -2; Kit ELISA Leucose modificado com Imunoglobulina G anti-bovina) [27].

Duas fêmeas bubalinas foram inoculadas com o BLV e uma das búfalas, após seis meses da inoculação, apresentou soroconversão, demonstrando uma fraca reação positiva à IDAG, sendo que não ocorreu linfocitose persistente e linfossarcoma nas búfalas avaliadas [13].

A inexistência de infecção pelo BLV nessa pesquisa pode ser atribuída ao fato de que todos os animais avaliados eram mantidos sob sistema de criação extensivo onde os animais são pouco manejados, o

que dificulta a transmissão horizontal do vírus. Porém, a ocorrência de soropositividade depende não somente de fatores relacionados ao manejo, mas também do fluxo de animais nas propriedades, da gênese da doença e da dinâmica clínico-epidemiológica das enfermidades, como no caso da coabitação de búfalos e bovinos na mesma propriedade, bem como do grau de mestiçagem dos rebanhos e da introdução de animais importados de outros Estados e países [26].

A prevalência da BoHV apresentou variação de 76,5% (3 a 6 anos) a 92,3% (6 a 9 anos). Isso mostra claramente que a ocorrência do vírus é maior nos animais mais idosos ($P = 0,01$). Do mesmo modo, foi observado nas pesquisas de outros autores [3,5,33] uma prevalência maior da doença nos animais mais velhos, enquanto que nos bezerros e animais jovens os resultados foram semelhantes. O motivo disto pode ser explicado pela maior probabilidade que os animais de maior idade possuem em relação ao contato com o vírus, além do que o manejo intensivo desses animais ocasionam estresse, e este por sua vez torna-se capaz de liberar o vírus latente, o que coloca em risco a sanidade de outros animais suscetíveis por conta da excreção do vírus para o meio ambiente [3].

Em contrapartida, Mahmoud *et al.* [21] observaram que os búfalos que tinham idade entre 6 e 13 meses apresentaram menor prevalência (33%) para o BoHV-1 do que os animais de 3 a 6 meses de idade com 40%, porém a diferença de idade é pequena quando comparada à do presente estudo.

A frequência obtida para o BVDV variou de 35,3% (3 a 6 anos) a 41,2% (0 a 3 anos). Deste modo, não se observou uma variação da soroprevalência em função da idade ($P = 0,60$). Esses resultados corroboram com outra pesquisa realizada no Estado de Goiás, onde anticorpos contra o BVDV foram detectados em 62,2% (1922/3090) de animais com a faixa etária de 2 a 8 anos e 76,5% (339/443) naqueles com idade entre 9 a 17 anos [7]. Todavia são discordantes de outros resultados [3,20] que detectaram diferença significativa

entre as faixas etárias, com a maior prevalência nos animais mais velhos.

Nesta pesquisa, nenhum dos soros reagentes de búfalos foi considerado positivo para BLV. Deste modo não se pode verificar a influência da idade na soroprevalência do BLV cuja influência já descrita em bovinos no Brasil [6] com uma prevalência que variou de 1,1% (6 a 12 meses de idade) a 32,7% (em bovinos com 72 meses de idade). Em relação à leucose bovina, uma maior prevalência também foi observada em animais adultos [3,25].

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos do presente estudo, permitem concluir que a prevalência encontrada de animais soropositivos para BoHV e BVDV foram altas, indicando que os agentes etiológicos estão circulando no Estado do Pará. Em relação à faixa etária, o BoHV demonstrou ter prevalência maior nos animais mais idosos, representando alerta aos serviços de vigilância sanitária pelo risco iminente de comprometimento da saúde dos rebanhos bubalinos.

Além disso, pode-se inferir que a criação de búfalos em áreas de várzeas pode favorecer a transmissão horizontal do BVDV, por facilitar o contato de animais sadios com água contaminada pelas secreções de animais infectados pelo vírus.

Por fim, a ausência de animais sororreagentes ao BLV não indica, necessariamente, que búfalos sejam refratários ao vírus, visto que os testes utilizados para detecção do BLV são padronizados para cepas patogênicas para bovinos, possivelmente diferentes daquelas que possam acometer os bubalinos.

MANUFACTURER

¹BD - Becton, Dickinson and Company. São Paulo, SP, Brazil

Declaration of interest. The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

REFERENCES

- 1 Akça Y., Burgu Y., Gür S. & Bilge Dagalp S. 2004. A study on investigation of occurrence of some virus infection in Buffaloes in Turkey. *Revue de Médecine Vétérinaire*. 156(5): 268-271.
- 2 Albayrak H., Özcan E., Eyhan Y.E., Kurt M. & Kiliçoğlu Y.A. 2012. Serological investigation of some aetiological agents associated with abortion in domestic water buffalo (*Bubalus bubalis* Linnaeus, 1758) in Samsun Province of Northern Turkey. Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri. *Dergisi*. 7(3): 155-160.

- 3 Alexandrino B., Dias F.C., Oliveira M.C., Affonso I.B., Pereira G.T. & Samara S.I. 2011. Herpesvirus bovino associado à diarreia viral bovina e à leucose enzoótica bovina. *Ars Veterinaria*. 27(3): 168-174.
- 4 Antoniassi N.A.B., Santos A.S., Oliveira E.C., Pescador C.A. & Driemeier D. 2007. Diagnóstico das causas infecciosas de aborto em bovinos. *Biológico*. 69(2): 69-72.
- 5 Barbosa A.C.V.C., Brito W.M.E.D. & Alfaia B.T. 2005. Soroprevalência e fatores de risco para a infecção pelo herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1) no Estado de Goiás, Brasil. *Ciência Rural*. 35(6): 1368-1373.
- 6 Birgel Junior E.H., Dias W.M.C., Souza R.M., Pogliani F.C., Birgel D.B. & Birgel E.H. 2006. Prevalência da infecção pelo vírus da leucose dos bovinos em animais da raça Simental, criados no Estado de São Paulo. *Ars Veterinaria*. 22(2): 122-129.
- 7 Brito W.M.E.D., Alfaia B.T., Caixeta S.P.M.B., Ribeiro A.C.C., Miranda T.M.T., Barbosa A.C.V.C., Barthasson D.L., Linhares D.C. & Faria B.O. 2010. Prevalência da infecção pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV) no Estado de Goiás, Brasil. *Revista de Patologia Tropical*. 39(1): 7-19.
- 8 Canal C.W. & Vaz C.S.L. 2008. Vacinas víricas. In: Flores, E.F. (Ed). *Virologia Veterinária*. Santa Maria: Editora UFSM, pp.329-354.
- 9 Chaves N.P., Bezerra D.C., Santos L.S., Sá J.S., Santos H.P. & Pereira H.M. 2012. Intercorrência entre leucose enzoótica e brucelose em búfalos (*Bubalus bubalis*) em sistema de produção extensivo. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 32(2): 131-134.
- 10 Craig M.I., Venzano A., König G., Morris W.E., Jiménez L., Juliá S., Capellino F., Viera J.B. & Weber E.L. 2008. Detection of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) nucleic acid and antigen in different organs of water buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Research in Veterinary Science*. 85(1): 194-196.
- 11 D'Arce R.C.F., Almeida R.S., Silva T.C., Franco A.C., Spilki F., Roehle P.M. & Arns C.W. 2002. Restriction endonuclease and monoclonal antibodies analysis of Brazilian isolates of bovine herpesvirus types 1 and 5. *Veterinary Microbiology* 88(4): 315-324.
- 12 Del Fava C., Pituco E.M. & Genovez M.É. 2007. Diagnóstico diferencial de doenças da reprodução em Bovinos: experiência do Instituto Biológico. *Biológico*. 69(2): 73-79.
- 13 Del Fava C., Samara S.I., Boer M.C.G., Medeiros A.S.R., Oliveira M.A.C., Oliveira M.A. & Garcia L.E. 1999. Alguns aspectos da infecção experimental pelo vírus da leucose enzoótica bovina (BLV) em búfalos (*Bubalus bubalis*) e ovinos (*Ovis aries*). *Ars Veterinaria*. 15(1): 33-38.
- 14 Dezen S., Otonel R.A.A., Alfieri A.F., Lunardi M. & Alfieri A.A. 2013. Perfil da infecção pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV) em um rebanho bovino leiteiro de alta produção e com programa de vacinação contra o BVDV. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 33(2): 141-147.
- 15 Ferreira R.N., Ribeiro H.F.L., Vale W.G., Rolim Filho S.T. & Barbosa E.M. 2010. Prevalence of Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR) in Buffalo Bulls in Amapá State and Marajo Island, Amazon Basin, Brazil. *Revista Veterinaria*. 21(suplemento 1): 479-481.
- 16 Fino T.C.M., Melo C.B., Ramos A.F. & Leite R.C. 2012. Infecções por herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e suas implicações na reprodução bovina. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 36(2): 122-127.
- 17 Flores E.F. 2003. Vírus da diarreia viral bovina (BVDV). *Biológico*. 65(1): 11-17.
- 18 Gohar H., Rabbani M., Ahmad A., Ahmad N., Sheikh A.A. & Muhammad K. 2013. Detection of bovine viral diarrhoea virus prevalent in dairy herds of Punjab, Pakistan. *Buffalo Bulletin*. 32(Special Issue 2): 1088-1090.
- 19 Gür S. & Akça Y. 2008. BVD seropozitif mandalarda IBR/IPV ve sığır vebasının seroepidemiolojisi. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 55: 45-50.
- 20 Haji Hajikolaei M.R., Seyfiabad Shapouri M.R. & Lofti M. 2010. Serological study of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection in water buffalo (*Bubalus bubalis*) in Ahvaz in the southwestern region of Iran. *International Journal of Veterinary Research*. 4(1): 45-48.
- 21 Mahmoud M.A., Mahmoud N.A. & Allam A.M. 2009. Investigations on Infectious Bovine Rhinotracheitis in Egyptian Cattle and Buffaloes. *Global Veterinaria*. 3(4): 335-340.
- 22 Maidana S.S., Craig J.L.K.M.I., Zabal O., Mauroy A., Thiry E., Crudeli G. & Romera S.A. 2014. First report of isolation and molecular characterization of bubaline herpesvirus 1 (BuHV1) from Argentinean water buffaloes. *Archives of Virology*. 159(11): 2917-2923.

- 23 Meas S., Ohashi K., Tum S., Chhin M., Te K., Miura K., Sugimoto C. & Onuma M. 2000. Seroprevalence of bovine immunodeficiency virus and bovine leukemia virus in draught animals in Cambodia. *The Journal of Veterinary Medical Science*. 62(7): 779-781.
- 24 Meas S., Seto J., Sugimoto C., Bakhsh M., Riaz M., Sato T., Naeem K., Ohashi K. & Onuma M. 2000. Infection of Bovine Immunodeficiency Virus and Bovine Leukemia Virus in Water Buffalo and Cattle Populations in Pakistan. *The Journal of Veterinary Medical Science*. 62(3): 329-331.
- 25 Meirelles C., Dittrich T., Cipriano F. & Ollhoff R.D. 2009. Evolução da soroprevalência da Leucose Enzoótica Bovina em um rebanho bovino leiteiro universitário. *Ciências Agrárias*. 30(3): 671-678.
- 26 Mendes E.I., Melo L.E.H., Tenório T.G.S., Sá L.M., Souto R.J.C., Fernandes A.C.C., Sandes H.M.M. & Silva T.I.B. 2011. Intercorrência entre leucose e tuberculose em bovinos leiteiros do Estado de Pernambuco. *Arquivos do Instituto Biológico*. 78(1): 1-8.
- 27 Molnár E., Molnár L., Guedes V.T.M. & Lima E.S.C. 2000. Naturally occurring bovine leukosis virus in water buffalo (*Bubalus bubalis*) in Brazil. *Veterinary Record*. 146(24): 705-706.
- 28 Office International des Epizooties 2005. Manual of Standards for diagnostic tests and vaccines. Disponível em: <http://www.oie.int/eng/en_index.htm>. [Acessado em 10/2014.]
- 29 Pinheiro Junior J.W., Souza M.E., Porto W.J.N., Lira N.S.C. & Mota R.A. 2013. Epidemiologia da infecção pelo vírus da leucose enzoótica bovina (LEB). *Ciência Animal Brasileira*. 14(2): 258-264.
- 30 Rajão D.S., Bastianetto E., Reis J.K.P., Oliveira D.A.A., Lago L.A. & Leite R.C. 2010. Estudo da infecção pelo vírus da leucose bovina em Bubalinos (*Bubalus bubalis*) no Estado de Minas Gerais. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*. 32(1): 42-45.
- 31 Roncoroni C., Barile V.L., Allegrini S., Grifoni G., Pettrossi N. & Fagiolo A. 2007. Serological survey and reproductive performances in buffaloes under fixed time artificial insemination. *Italian Journal of Animal Science*. 6(Suppl. 2): 828-831.
- 32 Souza V.F., Melo S.V., Esteves P.A., Schmidt C.S., Gonçalves D.A., Schaefer R., Silva T.C., Almeida R.S., Vicentini F., Franco A.C., Oliveira E.A., Spilki F.R., Weiblen R., Flores E.F., Lemos R.A., Alfieri A.A., Pituco E.M. & Roehle P.M. 2002. Caracterização de herpesvírus bovinos tipos 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5) com anticorpos monoclonais. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 22:13-18.
- 33 Thompson J.A., Leite R.M.H., Gonçalves V.S.P., Leite R.C., Bandeira D.A., Herrmann G.P., Moreira E.C., Prado P.E.F., Lobato Z.I.P., Brito C.P.T. & Lage A.P. 2006. Spatial hierarchical variances and age covariances for seroprevalence to *Leptospira interrogans* serovar hardjo, BoHV-1 and BVDV for cattle in the State of Paraíba, Brazil. *Preventive Veterinary Medicine*. 76(3-4): 2900-301.
- 34 Varela A.P.M., Holz C.L., Cibulski S.P., Teixeira T.F., Antunes D.A., Franco A.C., Roehle L.R., Oliveira M.T., Campos F.S., Dezen D., Cenci A., Brito W.D. & Roehle P.M. 2010. Neutralizing antibodies to bovine herpesvirus types 1 (BoHV-1) and 5 (BoHV-5) and its subtypes. *Veterinary Microbiology*. 142 (3-4): 254-260.