

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 13/12/2019.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP CÂMPUS DE
JABOTICABAL**

**ATUAÇÃO DO VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA NA VIA
REPRODUTIVA DE MACHOS SUÍNOS**

Gabriel Yuri Storino

Médico Veterinário

2018

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP CÂMPUS DE
JABOTICABAL**

**ATUAÇÃO DO VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA NA VIA
REPRODUTIVA DE MACHOS SUÍNOS**

Gabriel Yuri Storino

Orientador: Prof. Dr. Luís Guilherme de Oliveira

Coorientadora: Profa. Dra. Maria Emilia Franco Oliveira

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp,
Câmpus de Jaboticabal, como parte das
exigências para a obtenção do título de Mestre
em Medicina Veterinária, área: Clínica Médica
Veterinária

2018

S884a	Storino, Gabriel Yuri Atuação do vírus da diarreia viral bovina na via reprodutiva de machos suínos / Gabriel Yuri Storino. -- Jaboticabal, 2018 40 p. : il., tabs. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal Orientador: Luis Guilherme de Oliveira Coorientadora: Maria Emília Franco Oliveira 1. Inseminação artificial. 2. Pestivirus. 3. Qualidade seminal. 4. Sêmen. I. Título.
-------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: ATUAÇÃO DO VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA NA VIA REPRODUTIVA DE MACHOS SUÍNOS

AUTOR: GABRIEL YURI STORINO

ORIENTADOR: LUIS GUILHERME DE OLIVEIRA

COORDINADORA: MARIA EMILIA FRANCO OLIVEIRA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em MEDICINA VETERINÁRIA, área: Clínica Médica Veterinária pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. MARIA EMILIA FRANCO OLIVEIRA
Depto de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Prof. Dr. ANDRÉ FURUGEN CÉSAR DE ANDRADE
Departamento de Reprodução Animal-FMVZ/USP / Pirassununga/SP


Prof. Dr. RUBEN PABLO SCHOCKEN ITURRINO
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 13 de dezembro de 2018

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

GABRIEL YURI STORINO – Nascido em 22 de Fevereiro de 1994, na cidade de Porto Ferreira, Estado de São Paulo, é Médico Veterinário formado pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal – em 2016. Foi bolsista PROPe de Iniciação Científica (2014-2015) no Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária – FCAV – UNESP, Câmpus Jaboticabal, sob orientação do Prof. Dr. Luís Guilherme de Oliveira. Em 2017, ingressou no programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de Clínica Médica Veterinária, pela UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como bolsista FAPESP, com o número de processo 2017/00950-0, sob orientação do Prof. Dr. Luís Guilherme de Oliveira. O projeto obteve auxílio FAPESP, com o número de processo 2016/21421-2.

“Entregue o seu caminho ao
Senhor; confie nele, e ele agirá.”

Salmos 37:5

À Deus, por todas as graças recebidas. À minha namorada e à minha família, por todo apoio para que essa conquista fosse possível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por agir de forma sobrenatural para que tudo acontecesse e fosse possível chegar até aqui e por preparar grandes coisas na minha trajetória de vida.

Aos meus Pais, Flávio e Carla por toda minha estrutura moral e pessoal, pelo apoio incondicional para todas as horas e pela ajuda em todos os momentos durante toda a minha vida. Agradeço a minha namorada Maria Alice, por sempre ter estado ao meu lado, pelo apoio de todas as horas e por ser sempre solícita e amável me ajudando a enfrentar as diversas dificuldades ao longo do trajeto percorrido durante o mestrado.

Ao Prof. Dr. Luís Guilherme de Oliveira que sempre desempenhou de forma impar seu papel como orientador. Agradeço pelo apoio e amizade que começaram na iniciação científica, que tem sido de grande importância para meu desenvolvimento profissional durante o mestrado.

À Profa. Dra Maria Emília pela orientação, ensinamentos e auxílios prestados para que se tornasse possível a realização desse trabalho.

À República In-dependência e a todos os amigos que fiz lá, por todo o apoio, parceria e amizade nesses anos de convívio.

A Eduarda Xavier e ao Artur Simonatto pela ajuda na condução deste trabalho em conjunto, pela colaboração e auxílio em todas as etapas; à Marina, pela amizade e por auxiliar sempre de forma bastante solícita, por ajudar e acompanhar as diversas etapas do meu trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Pesquisa em Suínos, pela amizade e apoio, aos demais estagiários que eventualmente me auxiliaram no dia-a-dia com os animais. Muito obrigado!

Ao Laboratório de Víruses da Reprodução, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, ao Igor e à Andrea, pelo auxílio prestado para a execução dos testes de virusneutralização.

Ao Laboratório de Epidemiologia Molecular, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva pelo espaço cedido para a realização das análises

moleculares. Ao Laboratório de Patologia Veterinária da FCAV, por me ceder espaço para a confecção dos blocos e lâminas histológicas.

Ao Dr. Paulo Alécio Canola e aos Médicos Veterinários residentes em Cirurgia Cirúrgica de Grandes Animais: Ana Luiza, Carolina, Gabriel, Lucas, Mayara e Pedro Henrique pelos auxílios prestados com os procedimentos de orquiectomia dos machos suínos.

Ao Instituto Biológico de São Paulo, em especial a Dra. Edviges Maristela Pituco por nos ceder o inóculo utilizado neste experimento e auxiliar com diversos diagnósticos moleculares e sorológicos.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal e ao Arildo “Baiano”, que me ajudou com carregamento de ração e transporte de animais.

À Gisele Mouro e ao Prof. André Andrade pelo espaço e tempo cedidos para o treinamento com cachorros reprodutores na USP, campus de Pirassununga.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de estudos processo número 2017/00950-0, e auxílio à pesquisa (2016/21421-2) que possibilitaram o desenvolvimento do projeto de pesquisa finalizado nessa dissertação.

4 RESULTADOS.....	22
4.1 Sinais clínicos.....	22
4.2 Parâmetros seminais.....	22
4.3 Antomopatologia testicular	23
4.4 Análises hematológicas.....	23
4.5 Virusneutralização.....	24
4.6 RT-PCR.....	24
5 DISCUSSÃO.....	25
6 CONCLUSÃO.....	28
7 AGRADECIMENTOS.....	28
8 FINANCIAMENTO.....	28
9 CONFLITO DE INTERESSES.....	29
10 DECLARAÇÃO DE INTERESSE.....	29
11 REFERÊNCIAS.....	29
APÊNDICES.....	35

CERTIFICADO COMISSÃO DE ÉTICA PARA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "**Atuação do vírus da Diarréia Viral Bovina na via reprodutiva de machos suínos**", protocolo nº 19.242/16, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Luis Guilherme de Oliveira, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de junho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 14 de dezembro de 2016.

Vigência do Projeto	02/03/2017 a 28/02/2019
Espécie / Linhagem	Suínos
Nº de animais	16
Peso / Idade	120 kg
Sexo	Macho e fêmea
Origem	Granjas Comerciais dos estados de São Paulo e Minas Gerais

Jaboticabal, 14 de dezembro de 2016.


Profª Drª Lizandra Amoroso
Coordenadora – CEUA

ATUAÇÃO DO VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA NA VIA REPRODUTIVA DE MACHOS SUÍNOS

RESUMO – Infecções causadas pelo Vírus da Diarreia Viral Bovina em suínos podem resultar em leucopenia transiente, gastroenterite crônica, septicemia, e lesões hemorrágicas. Tanto o vírus da Peste Suína Clássica (PSC) quanto do Peste Vírus Atípico (APPV) são excretados no sêmen de cachaços infectados. Por compartilharem de regiões conservadas e apresentarem similaridade antigênica, é possível que não sejam as únicas espécies pertencentes ao gênero Pestivirus que possam ser excretadas no sêmen de suínos infectados. Em um primeiro momento, foram selecionados seis machos treinados para colheita de sêmen em manequim, dos quais foram colhidas amostras de sangue, sêmen e suabe prepucial a cada quatro dias até o 52º dia pós-inoculação com BVDV-2. Posteriormente, oito fêmeas foram adquiridas e alocadas em dois grupos: o grupo controle (n=2) e o grupo inseminado com sêmen contaminado com BVDV-2 (n=6) em laboratório, com o objetivo de mimetizar a transmissão do BVDV-2 via inseminação artificial. As amostras de sangue dos machos e das fêmeas, sêmen e suabe prepucial colhidos, foram testadas para a detecção do RNA viral pela técnica de RT-PCR. Uma alíquota de sangue total dos cachaços foi utilizada para realização de análises hematológicas, as quais mostraram redução significativa na contagem de monócitos e aumento significativo na contagem de linfócitos quando comparados os períodos pré e pós-inoculação com BVDV-2. Os títulos de anticorpos neutralizantes foram determinados por vírusneutralização. Nenhum dos animais apresentou sinais clínicos e não foi observada excreção do BVDV-2 na via reprodutiva ou piora nos parâmetros seminais avaliados. A transmissão de BVDV-2 via inseminação artificial sob condições experimentais não foi observada.

Palavras – Chave: Inseminação artificial, Pestivirus, qualidade seminal, sêmen

THE ROLE OF BOVINE VIRAL DIARRHEA IN THE REPRODUCTIVE TRACT OF BOARS

ABSTRACT – The Bovine Viral Diarrhea Virus infection in pigs can result in transient leukopenia, chronic gastroenteritis, septicemia, and hemorrhagic lesions. Both the Classical Swine Fever Virus (CSF) and the Atypical Porcine Pestivirus (APPV) are shedding in semen of infected boars. Because they share conserved regions and present antigenic similarity, they may not be the only species belonging to the genus Pestivirus that can be shed in the semen of infected boars. At first, six trained males were selected for semen collection on a dummy. From those animals were collected blood, semen and preputial swab every four days until the 52nd day after inoculation with BVDV-2. Posteriorly, eight females were acquired and allocated to two groups: the control group (n = 2) and the inseminated group with BVDV-2 contaminated semen (n = 6), aiming to mimic BVDV-2 transmission by artificial insemination. Blood samples from males and females, semen and preputial swab collected, were tested for viral RNA detection by the RT-PCR technique. An aliquot of whole blood from the boars was used to perform hematological analyzes, which showed a significant reduction in monocyte counts and a significant increase in lymphocyte count when comparing periods before and after inoculation with BVDV-2. Neutralizing antibody titers were determined by virus neutralization. None of the animals presented clinical signs and no BVDV-2 shed was observed in the reproductive route nor worsening in the seminal parameters evaluated. Transmission of BVDV-2 via artificial insemination under experimental conditions was not observed.

Key words: Artificial insemination, Pestivirus, seminal quality, semen

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Valores das variáveis seminais nos períodos, pré e pós – inoculação, de cachacos submetidos à inoculação experimental com o BVDV- 2 (estirpe LVB 16557/15) no Dia 0 do Experimento I (Mediana $\pm$ erro padrão da mediana). Jaboticabal, SP, 2017 – 2018.....	36
Tabela 2. Valores dos parâmetros hematológicos nos períodos pré e pós – inoculação de cachacos submetidos à inoculação experimental do BVDV- 2 (estirpe LVB 16557/15) no Dia 0 do Experimento I (Mediana $\pm$ erro padrão da mediana).....	37
Tabela 3. Títulos de anticorpos neutralizantes detectados, pela técnica de virusneutralização, no soro sanguíneo dos cachacos inoculados experimentalmente com o BVDV- 2 (estirpe LVB 16557/15) ao longo do período do Experimento I, de D-16 a D44. Jaboticabal, SP, 2017 -2018.....	38

LISTA DE GRÁFICOS E FIGURAS

	Página
Figura 1. Representação esquemática da metodologia experimental adotada no Experimento I, com destaque ao momento (Dia 0) da inoculação experimental do BVDV- 2 não-citopático (estirpe LVB 16557/15) em cachacos, pelas vias oral, nasal, intramuscular e intravenosa, e momentos de colheitas de amostras seminais, de sangue e suabe prepucial.....	37
Gráfico 1. Porcentagens (mediana $\pm$ erro padrão da mediana) de defeitos totais das células espermáticas de cachacos submetidos à inoculação experimental com o BVDV- 2 (estirpe LVB 16557/15) no Dia 0, ao longo do período do Experimento I (Dias -16 a 52). Letras diferem entre si pelo teste de Friedman ($p < 0,05$). Jaboticabal, SP, 2017 – 2018.....	39
Gráfico 2. Valores (mediana $\pm$ erro padrão da mediana) de contagens linfócitos por μL de sangue de cachacos submetidos à inoculação experimental com o BVDV- 2 (estirpe LVB 16557/15) no Dia 0, ao longo do período do Experimento I (Dias -16 a 52). Letras diferem entre si pelo teste de Friedman ($p < 0,05$). Jaboticabal, SP, 2017 – 2018.....	39
Gráfico 3. Valores (mediana $\pm$ erro padrão da mediana) de contagem de monócitos por μL de sangue de cachacos submetidos a inoculação experimental com o BVDV- 2 (estirpe LVB 16557/15) no Dia 0, ao longo do período do Experimento I (Dias -16 a 52). Letras diferem entre si pelo teste de Friedman ($p < 0,05$).....	40

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1. Introdução

A detecção de diferentes espécies de vírus no sêmen de suínos tem sido evidenciada por diversos pesquisadores e alertam para a possibilidade de transmissão de agentes de grande importância e que causam impacto na produção animal no mundo todo. São exemplos desses agentes: os vírus causadores da doença de Aujeszky (Medveczky et al., 1981), da Síndrome Reprodutiva e Respiratória dos Suínos (Shin et al., 1997; Christopher-Hennings et al., 1995), do Circovirus tipo-II (Madson et al., 2009; Kim et al., 2001; Hamel et al., 2000). Colocando em evidência a importância de monitorar tais patógenos e muitos outros, que possam utilizar deste meio para sua disseminação.

A Peste Suína Clássica (PSC), pertencente ao gênero Pestivirus foi detectada sêmen de cachaaos infectados e teve sua transmissão confirmada por meio da inseminação artificial (De Smit et al., 1999). O macho infectado por peste suína clássica, em condições experimentais, excreta o vírus no sêmen por um período superior a 50 dias, após a inoculação (Choi et al., 2003)

Recentemente, outra espécie pertencente ao gênero Pestivirus, o Pestivirus Atípico Suíno (APPV) foi identificado no sêmen e fluídos prepucais de machos suínos infectados de forma natural, provenientes de uma unidade comercial de produção de sêmen (Gatto, 2017). O APPV tem se mostrado importante do ponto de vista reprodutivo, pois vem sendo associado ao nascimento de leitões com tremor congênito em episódio de ocorrência a campo e também em condições e experimentais após inoculação do agente em fêmeas e em fetos (Arruda, 2016).

Atualmente existem poucos relatos a respeito da ação de outras espécies de Pestivirus em suínos, principalmente do ponto de vista da reprodução e dos efeitos da infecção na potencial reprodutivo dos machos. Não existem estudos avaliando a excreção nem a transmissão via sêmen do BVDV em suíno, assim como é relatado para a espécie Bovina. (Kirkland et al. 1991).

6. Conclusão

A infecção experimental com BVDV-2 estirpe LVB16557/15 em cachacos resultou em quadros de linfocitose e monocitopenia. Não foi observada a excreção do agente nem piora nos parâmetros seminais de avaliação de rotina. Também não foi detectada a viremia nem anticorpos neutralizantes nas fêmeas desafiadas com BVDV pela via reprodutiva.

7. Agradecimentos

Agradecemos à Andreia Souza Ramos de Medeiros do Setor de Viroses da Reprodução da FCAV pela colaboração com as análises sorológicas ao Dr. Fernando José Zara e à Msc. Maria Alice Garcia Bento do Laboratório de Morfologia de Invertebrados (IML) da FCAV pela colaboração com análises de morfologia espermáticas, ao Laboratório de Biologia Molecular do departamento de Medicina Veterinária Preventiva da FCAV pelo espaço cedido para a realização das análises de RT-PCR, ao Dr. Paulo Alécio Canola e aos Médicos Veterinários residentes em Cirurgia Cirúrgica de Grandes Animais: Ana Luiza C. R. G. Oliveira, Carolina Isabel Soriano Oporto, Gabriel Paiva Domingues do Amaral, Lucas Ferreira Mendonça, Mayara Cardoso dos Anjos e Pedro Henrique Dias Nunes pelos auxílios prestados com os procedimentos de orquiectomia dos machos suínos.

8. Financiamento

Somos gratos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão de fundos para pesquisa (2016/02982-3) e a bolsa de Mestrado para GYS (2017/00950-0). O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Somos gratos também ao CNPq pela concessão de bolsa de produtividade para MEFO

9. Conflito de interesses

Nenhum

10. Declaração de interesse

Nenhum

11. Referências

- Almeida HMS, GattoIRH , Santos ACR, Ferraud AS, Samara, SI, Oliveira LG. A Cross-Sectional and Exploratory Geospatial Study of Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) Infections in Swines in the São Paulo State, Brazil. *Pak Vet J* 2018;37:470-474.
- Almeida FFL, Leal MC, Franca LR. Testismorphometry, duration of spermatogenesis, and spermatogenic efficiency in the wild boar (*Sus scrofa*). *BiolReprod* .2006;75:792–799.<https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.053835>.
- Baker JC. Bovine viral diarrhea virus: a review. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1987; 190:1449-1458.
- BauermannFV, Ridpath JF. HoBi-like viruses—the typical ‘atypical bovine pestivirus’. *Anim Health Res Rev*. 2015;16:64-69.<https://doi.org/10.1017/S146625231500002X>.
- Blom E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. *Nord. Vet. Med.*1973;25:383-391.
- Brodersen, BW. Bovine viral diarrhea virus infections: manifestations of infection and recent advances in understanding pathogenesis and control. *Vet Pathol*. 2014; 51(2): 453-464. <https://doi.org/10.1177/0300985813520250>.

- Chase, C. C. The impact of BVDV infection on adaptive immunity. *Biologicals*, 2013 ; 41(1) : 52-60.<https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2012.09.009>
- Choi C, Chae C. Detection of classical swine fever virus in boar semen by reverse transcription–polymerase chain reaction. *J VetDiagn Invest.* 2003;15:35-41. <https://doi.org/10.1177/104063870301500108>.
- Christopher-Hennings J, Nelson EA, Hines RJ, Nelson JK, Swenson SL, Zimmerman JJ, Christopher CL, Yaeger MJ, Benfield DA. Persistence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in serum and semen of adult boars. *J VetDiagn Invest.* 1995 ; 7(4) : 456-464.
- Colégio Brasileiro De Reprodução Animal – CBRA. Manual para exame e avaliação de sêmen animal. 3ªed., Belo Horizonte : CBRA ; 2013
- De Smit A J, Bouma A, Terpstra C, Van Oirschot, JT. Transmission of classical swine fever virus by artificial insemination. *Vet. Microbial.* 1999;67:239-249. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(99\)00045-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(99)00045-0).
- Floegel G, Wehrend A, Depner KR, Fritzemeier J, Waberski D, Moennig V. Detection of classical swine fever virus in semen of infected boars. *Vet. Microbiol.* 2000; 77:109-116. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(00\)00267-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(00)00267-4).
- Flores EF, Weiblen R, Gil LHV, Tobias FL, Lima M, Garcez DC, Botton AS. Diversidade antigênica de amostras do vírus da diarreia viral bovina isoladas no Brasil; implicações para o diagnóstico e estratégias de imunização. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 2000 ; 52(1) : 11-17.
- Gatto I R H, Arruda P H, Visek CA, Victoria J G, Patterson A R, Krull A C, Schwartz K J, Oliveira LG, Arruda BL. Detection of atypical porcine pestivirus in semen from commercial boar studs in the United States. *TransboundEmerg Dis.* 2017; 65:339-343. <https://doi.org/10.1111/tbed.12759>.
- Gethmann J, Homeier T, Holsteg M, Schirrmeier H, Saßerath M, Hoffmann B, Beer M, Conraths FJ. BVD-2 outbreak leads to high losses in cattle farms in Western Germany. *Heliyon.* 2015 ; 1(1) : e00019. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2015.e00019>
- Givens MD, Heath AM, Brock KV, Brodersen BW, Carson RL, Stringfellow DA . Detection of bovine viral diarrhea virus in semen obtained after inoculation of seronegative postpubertal bulls. *Am J Vet Res.* 2003; 64: 428-434.<https://doi.org/10.2460/ajvr.2003.64.428>

- Givens MD, Riddell KP, Edmondson MA, Walz PH, Gard JA, Zhang Y, Galik PK, Brodersen BW, Carson RL, Stringfellow DA. Epidemiology of prolonged testicular infections with bovine viral diarrhea virus. *Vet Microbiol.* 2009 ; 139(1-2) : 42-51. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.04.029>
- Guerin B, Pozzi N. Viruses in boar semen: detection and clinical as well as epidemiological consequences regarding disease transmission by artificial insemination. *Therio.* 2005 ; 63(2) : 556-572
- Hamel AL, Lin LL, Sachvie C, Grudeski E, Nayar GP. PCR detection and characterization of type-2 porcine circovirus. *Can J Vet Res.* 2000 ; 64(1) : 44.
- House BM, Collin EA, Peddireddi L, Yuan F, Chen Z, Hesse RA, Anderson G. Discovery of a novel putative atypical porcine pestivirus in pigs in the USA. *J. Gen. Virol.* 2005; 96:2994–2998. doi: 10.1099/jgv.0.000251
- Houe H, Baker JC, Maes RK, Ruegg PL, Lloyd JW. Application of antibody titers against bovine viral diarrhea virus (BVDV) as a measure to detect herds with cattle persistently infected with BVDV. *J Vet Diagn Invest.* 1995; 7:327-332. <https://doi.org/10.1177/104063879500700305>.
- Iwasaki A, Medzhitov R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science.* 2010 ; 327 : 291-295. doi: 10.1126/science.1183021
- Jain NC. *Schalm's veterinary hematology.* Philadelphia: Lea &Febiger. 1986; 4.
- Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJD (1984). Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J ReprodInfertil.* 1984 ; 70 : 219-228. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0700219>.
- Kassambara A. ggpubr:“ggplot2” based publication ready plots. R package version 0.1, 6. 2017.
- Kirkland PD, Richards SG, Rothwell JT, Stanley DF. Replication of bovine viral diarrhea virus in the bovine reproductive tract and excretion of virus in semen during acute and chronic infections. *Vet. Rec.* 1991; 128:587-590. doi: 10.1136/vr.128.25.587
- Kirkland PD, Frost MJ, Finlaison DS, King KR, Ridpath JF, Gu X. Identification of a novel virus in pigs—Bungowannah virus: a possible new species of pestivirus. *Virus Res.* 2007 ; 129(1) : 26-34. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2007.05.002>

- Kopera IA, Bilinska B, Cheng CY, Mruk DD. Sertoli–germ cell junctions in the testis: a review of recent data. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2010; 365:1593-1605.doi: 10.1098/rstb.2009.0251
- Lamp B, Schwarz L, Högler S, Riedel C, Sinn L, Rebel-Bauder B, Weissenböck H, Ladinig A, Rümenapf T. Novel pestivirus species in pigs, Austria, 2015. *Emerg Infect Dis.* 2015 ; 23(7): 1176.
- Loeffen WLA, Van Beuningen A, Quak S, Elbers A.R.W. Seroprevalence and risk factors for the presence of ruminant pestiviruses in the Dutch swine population. *Vet. Microbiol.* 2009 ; 136 : 240–245. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.11.01>.
- Lucas EM, Randall JM, Meneses JF. Potential for evaporative cooling during heat stress periods in pig production in Portugal (Alentejo). *Journal of Agricultural Engineering Research.* 2000 ; 76(4), 363-371.
- Lugar DW, Ragland D, Stewart KR. Influenza outbreak causes reduction in semen quality of boars. *JSHAP.* 2017 ; 25(6) : 303-307.
- Maes D, Van Soom A, Appeltant R, Arsenakis I, Nauwynck H. Porcine sêmen as a vector for transmission of viral pathogens. *Theriogenology.* 2016 ; 85 : 27 – 38. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.09.0146>
- Madson DM, Patterson AR, Ramamoorthy S, Pal N, Meng XJ, Opriessnig T, Reproductive failure experimentally induced in sows via artificial insemination with semen spiked with porcine circovirus type 2. *Vet Pathol.* 2009 ; 46 (4) : 707-716. <https://doi.org/10.1354/vp.08-VP-0234-O-FL>
- McNitt JI, First NL. Effects of 72—hour heat stress on semen quality in boars. *InternationalJournalofBiometeorology.* 1970; 14(4) : 373-380.
- Mechler ML, dos Santos Gomes F, Nascimento KA, de Souza-Pollo A, Pires FFB, Samara, SI, et al. Congenital tremor in piglets: Is bovine viral diarrhoea virus an etiological cause?. *VetMicrobiol.* 2018 ; 220 : 107-112. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.05.009>.
- Medveczky I, Szabo I. Isolation of Aujeszky's disease virus from boar semen. *Acta Vet. Acad. Sci. Hung.* 1981 ; 29(1) : 29-35.
- Meyling A, Jensen AM. Transmission of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) by artificial insemination (AI) with semen from a persistently-infected bull. *Vet. Microbiol.* 1988; 17(2) :97-105.[https://doi.org/10.1016/0378-1135\(88\)90001-6](https://doi.org/10.1016/0378-1135(88)90001-6)

- MoennigV, Liess B. Pathogenesis of intrauterine infections with bovine viral diarrhoea virus. *Vet Clin North Am Food AnimPract.* 1995; 11:477-487. [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30462-X](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30462-X)
- Niskanen R, Alenius S, Belak K, Baule C, Belak S, Voges, H, Gustafsson H. Insemination of susceptible heifers with semen from a non-viraemic bull with persistent bovine virus diarrhoea virus infection localized in the testes. *ReprodDomest Anim.*2002;37(3):171-175.
- NWSCR. Livestock hot weather stress. Regional operations manual letter C-31-76. 1976
- OIE -World Organization For Animal Health. Bovine Viral Diarrhoea In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines of Terrestrial Animals, http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.07_BVD.pdf / ; 2015: 698-710 . [accessed 10 September 2018].
- Passler T, Walz PH. Bovine viral diarrhoea virus infections in heterologous species. *Anim Health Res Rev.* 2009 ; 11(2) : 191-205. <https://doi.org/10.1017/S1466252309990065>
- Pereira DA, Peron JB, Almeida HM, Baraldi TG, Gatto IRH, Kasmanas TC, Pituco ME, Montassier HJ, Oliveira LG. Experimental inoculation of gilts with bovine viral diarrhoea virus 2 (BVDV-2) does not induce transplacental infection. *Vet Microbiol.* 2018; 225: 25-30. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.09.003>.
- Pohlert T. The pairwise multiple comparison of mean ranks package (PMCMR). R package. 2014; 27.
- Ramirez-Mendoza H, Hernandez-Jauregui P, Reyes-Leyva J, Zenteno E, Moreno-Lopez J, KennedyS. Lesions in the reproductive tract of boars experimentally infected with porcine rubulavirus. *J CompPathol.* 1997; 117(3) : 237-252. [https://doi.org/10.1016/S0021-9975\(97\)80018-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9975(97)80018-7)
- Rivera-Benitez JF, Martínez-Bautista R, Pérez-Torres A, del Carmen García-Contreras, A, Reyes-Leyva J, Hernández J, Ramírez-Mendoza H (2013). Persistence of porcine rubulavirus in experimentally infected boars. *Vet. Microbiol.* 2013 ; 162(2-4) : 491-498. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.10.037>.
- Ridpath JF, Bauermann FV, Flores EF. Flaviviridae. In: Flores, E.F. (Ed.), *Virologia Veterinária*. 2ª ed. Santa Maria: Editora UFSM, 2012. pp. 565–589
- Santos ACR, Nascimento KA, Mechler ML, Almeida HMS, Gatto IRH, Carnielli LG, Souza-Pollo A, de Oliveira, LG. Experimental Infection and Evaluation of Airborne Transmission

- and Nose-To-Nose Contact of Bovine Viral Diarrhea Virus Among Weaned Piglets. *AJBAS*. 2017 ; 11 : 12-19. doi : 10.22587/ajbas.2017.11.15.3
- Simmonds P, Becher P, Bukh J, Gould EA, Meyers G, Monath T, Muerhoff S, Pletnev A, Rico-Hesse R, Smith DB, Stapleton JT. ICTV virus taxonomy profile: Flaviviridae. *J Gen Virol*. 2017 ; 98(1) : 2-3.
- Sheldon MR, Fillyaw MJ, Thompson WD. The use and interpretation of the Friedman test in the analysis of ordinal-scale data in repeated measures designs. *Physiother Res Int*. 1996 ; 1(4) : 221-228.
- Shin J, Torrison J, Choi CS, Gonzalez SM, Crabo BG, Molitor TW. Monitoring of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in boars. *Vet microbiol*, 1997 ; 55(1-4) : 337-346.
- Suriyasomboon A, Lundeheim N, Kunavongkrit A, Einarsson S. Effect of temperature and humidity on sperm morphology in Duroc boars under different housing systems in Thailand. *J Vet Med Sci*. 2005; 67(8): 777-785.
- Team RC. R. A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2018.
- Terpstra C, Wensvoort G. Natural infections of pigs with bovine viral diarrhoea virus associated with signs resembling swine fever. *Res Vet Sci*. 1988 ; 45(2):137-142.
- Terpstra C, Wensvoort G. Bovine virus diarrhea virus infections in swine. *TijdschrDiergeneeskd*. 1991 ; 116(19) : 943-948.
- Voges H, Horner GW, Rowe S, Wellenberg GJ. Persistent bovine pestivirus infection localized in the testes of an immuno-competent, non-viraemic bull. *Vet Microbiol*. 1998 ; 61(3) : 165-175. doi:10.1016/s0378-1135(98)00177-1.
- Weinstock D, Bhudevi B, Castro AE. Single-tube single-enzyme reverse transcriptase PCR assay for detection of BVDV in pooled bovine serum. *J ClinMicrobiol*. 2001; 39 : 343–346. doi: 10.1128/jcm.39.1.343-346.2001
- Weiss DJ. Schalm's Veterinary Hematology. 6^a ed. Iowa :Wiley-Blackwell; 2010. cap. 109. p. 843-851.
- Yeşilbağ K, Alpay G, Becher P. Variability and global distribution of subgenotypes of bovine viral diarrhea virus. *Viruses*. 2017 ; 9(6) : 128. doi:10.3390/v9060128