

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA, PATOLÓGICA E MOLECULAR DA
INFECÇÃO PELO VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA TIPO 2 NÃO
CITOPÁTICO EM PROPRIEDADE DO RIO GRANDE DO SUL**

ADRIANA DA SILVA SANTOS

PORTO ALEGRE

2010

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA, PATOLÓGICA E MOLECULAR DA
INFECÇÃO PELO VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA TIPO 2 NÃO
CITOPÁTICO EM PROPRIEDADE DO RIO GRANDE DO SUL**

ADRIANA DA SILVA SANTOS

**Dissertação apresentada como
requisito para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Veterinárias
na área de concentração em
Cirurgia, Morfologia e Patologia
Animal, da Universidade Federal
do Rio Grande do Sul
Orientador: David Driemeier**

**PORTO ALEGRE
2010**

S237c Santos, Adriana da Silva

Caracterização clínica, patológica e molecular da infecção pelo vírus da diarreia viral bovina tipo 2 não citopático em propriedade do Rio Grande do Sul / Adriana da Silva Santos - Porto Alegre: UFRGS, 2010.

82f.; il. – Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2010. David Driemeier, Orient.

1. Bovinos : BVDV-2 ncp 2. Pododermatite
3. Infecções Virais 4. Catarata congênita 5. Patologia veterinária : bovinos I. Driemeier, David, Orient. II. Título

CDD 619.6026

Catálogo na fonte preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Veterinária da UFRGS

ADRIANA DA SILVA SANTOS

**CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA, PATOLÓGICA E MOLECULAR DA
INFEÇÃO PELO VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA TIPO 2 NÃO
CITOPÁTICO EM PROPRIEDADE DO RIO GRANDE DO SUL**

Aprovada em 8 de fevereiro de 2010.

APROVADA POR:

Prof. Dr. David Driemeier
Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Aldo Gava
Membro da Comissão

Prof. Dra. Ana Lucia Schild
Membro da Comissão

Prof. Dr. Cláudio Estevão Farias da Cruz
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

A Deus por me conceder esta oportunidade de finalizar mais uma etapa e poder agradecer a tantas pessoas especiais.

À toda minha família pela força e compreensão. Em especial aos meus pais, Hernani e Esmeraldina, pelo amor incondicional e por serem o que tenho de mais precioso nesta vida.

Ao meu orientador, professor David Driemeier por me receber de portas abertas no SPV. Sou grata pelo conhecimento compartilhado, pela confiança e pela preocupação constante com o bem-estar dos “estrangeiros” do setor.

Ao professor e amigo, Marcos de Almeida Souza, por me apresentar à Patologia, pelos conselhos oportunos e pela amizade.

Às funcionárias, Ângela e Marília, pela ajuda e carinho. E à Bárbara pela ajuda neste último ano.

Ao Setor de Virologia da FAVET pela ajuda neste trabalho, em especial à Laura pela amizade e por compartilhar comigo seu conhecimento e ideias sobre BVDV.

Aos amigos, Carol, Bezerra, Lú, Uruguaio, Danilo, Paulinho, Pri, Dé, Juliano, Mauro, Hugo, Dudes e Pedroso, pela amizade e oportunidade de aprender e conviver com vocês.

Aos estagiários, tão essenciais ao laboratório, obrigada pela ajuda e amizade.

Às minhas irmãzinhas do Centro-Oeste, Nadia e Fabi, pela força, amizade e longas conversas.

Ao Saulo e à Debi, minha família em Porto Alegre, pela amizade e convívio nestes três anos.

Ao DJ e à Ki por me adotarem nos fins de semana e feriados. Muito obrigada pela amizade.

Ao Daniel pela presença nos bons e maus momentos, pela amizade e compreensão.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	8
LISTA DE FIGURAS	9
RESUMO	11
1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1 Agente etiológico	15
2.2 Epidemiologia	17
2.3 Patogenia e características clínico-patológicas	21
2.3.1 Infecção aguda (transitória) de animais não-prenhes.....	21
2.3.2 Imunossupressão	24
2.3.3 Infecção transplacental/intrauterina	25
2.3.3.1. Infecção durante o período concepção até o estágio embrionário	25
2.3.3.2 Infecção fetal.....	26
2.3.3 Infecção persistente.....	28
2.3.4 Doença das mucosas	30
2.5 Diagnóstico	32
2.5.1 Isolamento Viral.....	32
2.5.2 Imuno-histoquímica (IHQ)	33
2.5.3 Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR).....	34
2.5.4 Ensaio imunoenzimático (ELISA) de captura de antígeno (ACE)	35
2.5.5 Sorologia	36
2.6 Diagnóstico diferencial	37
2.8 Vacinação.....	37
2.9 Controle.....	39
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	41
3.1 Procedimentos gerais	41
3.2 Coleta de amostras de orelhas	41
3.3 Necropsia e análises histológicas	42
3.4 Imuno-histoquímica (IHQ).....	42
3.4 Sorologia	43
3.5 Isolamento viral.....	43
3.5.1 Extração do RNA	44
3.5.2 RT-PCR.....	44
3.5.3 Sequenciamento de isolados virais e análise filogenética.....	45
4. RESULTADOS.....	46
4.1 Dados epidemiológicos	46
4.2 Coleta de amostras na propriedade	46

4.3 Avaliação dos animais PI levados à Faculdade de Veterinária da UFRGS	50
4.3 Avaliação histológica dos olhos dos animais com catarata	53
4.4 Avaliação imuno-histoquímica	54
4.4 Sorologia pelo ELISA	60
4.5-Sequenciamento e análise filogenética	61
4.6 Medidas adotadas após o diagnóstico de infecção pelo BVDV-2	62
5. DISCUSSÃO	63
6. CONCLUSÕES	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Descrição dos dados referentes às amostras enviadas no dia 07 de março de 2008 ao SPV-UFRGS, com os respectivos resultados obtidos pelos exames de imunohistoquímica (IHQ) e isolamento viral (VI).....	48
Tabela 2- Relação das datas de coletas, número de animais coletados, número de animais positivos nos testes diagnósticos para triagem de animais PI pelo BVDV no período de 2008 a 2009, e resultado do sequenciamento viral.	49
Tabela 3- Distribuição e quantificação da marcação imuno-histoquímica em órgãos coletados de 5 animais PI diagnosticados em propriedade do Município de Viamão, RS, no período de novembro de 2007 a maio de 2009.	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Bovino, macho, Angus, N 1093/07. A. Secreção ocular mucopurulenta associada a crostas próximas a comissura inferior do olho. B. Dermatite crostosa afetando a pele digital ventral e espaço interdigital.	47
Figura 2- Bovino, N 1093/07, plano nasal. Proliferação acantomatosa do epitélio, áreas de necrose do estrato córneo associado a infiltrado inflamatório de neutrófilos. Edema e infiltrado mononuclear multifocal moderado na junção derme-epiderme. HE, obj. 20.	47
Figura 3- Bovino, macho, Angus. A. Opacidade unilateral do cristalino observada durante coletas para triagem de animais PI. B. Detalhe do olho demonstrando a opacidade quase total do cristalino.	50
Figura 4- Bovino, macho, Angus. Foto sequência (sentido anti-horário) demonstrando o andar em círculo de um bovino com catarata unilateral, após estresse por movimentação forçada.	50
Figura 5- Bovinos, Angus, PI. A. Animais PI, subdesenvolvidos, à esquerda animal N 407/08 e à direita, o N 531/08. Nota-se ao fundo mancha de diarreia líquida na parede da baía. B. Animal N 979/09 apresentando secreção nasal mucosa bilateral.	51
Figura 6- Bovino, N 979/09, jejuno. Placas de Peyer evidentes na mucosa do intestino delgado, área focal de ulceração delimitada por halo hiperêmico (seta).	52
Figura 7- Bovino, N 979/09, rim. Múltiplos pontos brancos medindo de 0,1 a 0,5 cm na superfície cortical do rim.	52
Figura 8- Bovino, N 979/09, jejuno. A. Infiltrado mononuclear difuso moderado na lâmina própria e dilatação dos vasos lacteais (asteriscos). HE, obj. 10. B. Placa de Peyer (Figura 6) com moderado infiltrado de histiócitos e necrose do epitélio das vilosidades. HE, obj.20.	53
Figura 9- Bovino, N 163/08, cristalino. Vacuolizações multifocais e tumefação (seta) de fibras da camada cortical. HE, obj. 20.	54
Figura 10- Bovino, N 407/08, tálamo, IHQ anti-BVDV. A. Marcação positiva de coloração vermelha difusa acentuada do citoplasma de neurônios. Obj. 20. B. Marcação vermelha acentuada no citoplasma de neurônios, com marcação ocasional de astrócitos e células endoteliais. Obj. 40.	57
Figura 11- Bovino, N 979/09, retina, IHQ anti-BVDV, obj. 40. A. De cima para baixo, marcação positiva de coloração vermelha na membrana limitante, em células da camada nuclear interna e em células ganglionares. B. Controle negativo.	58
Figura 12- Bovino, N 979/09, IHQ anti-BVDV, obj. 40. A. Esclera apresentando marcação positiva de coloração vermelha em fibras nervosas da <i>lamina cribrosa</i> . B. Marcação positiva também em fibras do nervo óptico.	58
Figura 13- Bovino, N 407/08, linfonodo mesentérico. A. Rarefação linfoide no centro folicular e infiltrado de histiócitos. HE, obj. 40. B. Marcação positiva vermelha no citoplasma predominantemente de histiócitos do centro linfoide e em linfócitos do espaço interfolicular. IHQ anti-BVDV, obj. 40.	59
Figura 14- Bovino, N 979/09, IHQ anti-BVDV, brônquio, obj. 40. A. Marcação positiva avermelhada no epitélio e em células descamadas na luz do brônquio. B. Marcação positiva avermelhada em histiócitos no tecido linfoide agregado.	59
Figura 15- Bovino, N 407/09 orelha, IHQ, obj. 20. Marcação positiva avermelhada difusa em queratinócitos da epiderme, folículos pilosos e em células dendríticas da derme.	60

Figura 16- Anticorpos contra vírus da diarreia viral bovina (BVDV) em amostras individuais de bezerros com idade de 2-3 meses dos anos de 2008 e 2009, medidos em ELISA BVDV (IDEXX, Suíça). 61

Figura 17- Análise filogenética de fragmento de 233 nucleotídeos da região 5' não traduzida (5'UTR) de isolados de BVDV Itapuã RS 3, 4 e 5. Os números indicam a porcentagem de 1000 replicatas de *bootstrap* que suportam cada ramo filogenético. A árvore foi preparada usando programa ClustalW e baseada no método *Neighbor-joining* parâmetro Kimura dois. O alinhamento múltiplo foi realizado em programa MEGA V.4. As sequências consultadas no GenBank possuem os seguintes números de acesso: BVDV1Coreia2006 (DQ973180), BVDV1b Osloss (AY279528), BVDV1a NADL ref (AF039181), BVDV1a Singer (L32875), BVDV2 Giessen (AY379547), CSFV Índia 2006 (EF026755). A identidade das sequências de amplicon do RT-PCR foi verificada com sequências depositadas no banco de dados GenBank usando programa BLAST... 62

RESUMO

O vírus da diarreia viral bovina (BVDV) é responsável por diferentes síndromes que afetam principalmente bovinos em todo o mundo, causando grandes perdas econômicas. A principal medida de controle desta infecção é a detecção e retirada dos animais persistentemente infectados (PI) do rebanho. O presente trabalho analisou a infecção persistente por este vírus em um rebanho bovino de gado de corte, vacinado com vacina inativada contra BVDV tipo 1 e localizado no Município de Viamão, Rio Grande do Sul, de novembro de 2007 a maio de 2009. Para a triagem de animais PI, amostras de soro, sangue com EDTA e fragmentos de orelhas foram coletadas principalmente de animais com idade entre 2-3 meses. Os testes utilizados compreenderam o isolamento viral, a transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), a imuno-histoquímica (IHQ) e a sorologia pelo ensaio imunoenzimático (ELISA). De 1300 animais da propriedade, coletou-se 179 amostras e em 6 se identificou a infecção persistente pelo BVDV tipo 2 não citopático (ncp). Os principais sinais clínicos verificados na propriedade englobavam nascimento de bezerros fracos, grande número de animais com retardo no crescimento e catarata congênita uni e bilateral. As principais lesões observadas em 5 animais necropsiados consistiam de aumento dos linfonodos mesentéricos, evidenciação das placas de Peyer e em um animal verificou-se pododermatite com lesões crostosas no plano nasal e na região periocular. Os achados microscópicos caracterizavam-se principalmente por infiltrado mononuclear na lâmina própria do intestino delgado e rarefação linfoide com infiltrado histiocitário nos centrofoliculares de linfonodos e nas placas de Peyer. A demonstração do antígeno viral nos 5 animais avaliados ocorreu principalmente em: queratinócitos da epiderme, no epitélio de folículos pilosos e células dendríticas da derme de orelhas e pele; histiócitos e em linfócitos dos linfonodos; células foliculares da tireoide; no citoplasma de neurônios e em menor escala, em células da micróglia no córtex cerebral e no hipocampo. A análise de *pools* de soro de animais suspeitos pelo RT-PCR em conjunto com a avaliação imuno-histoquímica de biópsia de orelhas mostraram bons resultados e podem ser úteis como método de triagem de infecções persistentes em rebanhos, inclusive em animais menores de 6 meses de idade por não sofrerem interferência de anticorpos maternos. A retirada e eliminação dos animais PI surtiram efeitos positivos na propriedade, entretanto novas coletas devem ser realizadas em 2010.

Palavras-chave: BVDV-2 ncp, animais persistentemente infectados, pododermatite, catarata congênita.

ABSTRACT

Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) is responsible for different syndromes that affect mainly cattle worldwide, causing important economic losses. The main control measure for this infection is the detection and removal of all persistently infected (PI) animals from the herd. This study examined the persistent infection for this virus in a beef cattle herd, vaccinated with killed vaccine against BVDV type 1, located in the county of Viamão, Rio Grande do Sul, southern Brazil, from november 2007 to may 2009. For the screening of PI animals, serum, blood with EDTA and fragments of ears were collected mainly from animals aged between 2-3 months. Tests used were viral isolation, reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), immunohistochemistry (IHC) and serology by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). From 1300 animals, 179 samples were collected and 6 were identified as persistent infected for BVDV type 2 non-cytopathic (ncp). The most important clinical signs observed on the farm were birth of weak calves, many animals with growth retardation and unilateral or bilateral cataract. The main gross lesions observed at the necropsy of 5 animals were enlargement of mesenteric lymph nodes and Peyer's patches, and in one case, pododermatitis with crusted lesions on nasal planum and periocular region. The microscopic findings were characterized mostly by mononuclear infiltrate in the lamina propria primarily in small intestine and lymphoid depletion with histiocytic infiltrate in follicular centers of lymph nodes and Peyer's patches. In 5 animals evaluated the viral antigen was more frequently demonstrated in epidermal keratinocytes, epithelium of hair follicles and dendritic cells of the dermis of the ears and skin, histiocytes and lymphocytes in lymph nodes, thyroid follicular cells, in the cytoplasm of neurons and to a lesser extent, in glial cells in the cerebral cortex and hippocampus. The analysis of pools of serum from animals suspected by RT-PCR together with immunohistochemical analysis of ears biopsy showed good results and can be useful as screening method for persistent infections in cattle, including animals under 6 months age, because they not suffer interference from maternal antibodies. The removal and elimination of PI animals had positive effects on the property, however new collection should be carried out in 2010.

Keywords: *BVDV-2 ncp, persistently infected animals, pododermatitis, congenital cataracts.*

1. INTRODUÇÃO

O vírus da diarreia viral bovina (BVDV) é um membro do gênero *Pestivirus* pertencente à família *Flaviviridae* (RIDPATH, 2005). Dentro deste gênero destacam-se ainda, o vírus da peste suína clássica e vírus da doença da fronteira (POTIGIETER, 2004; RIDPATH; FLORES, 2007). O BVDV pode ser classificado em citopatogênico ou não citopatogênico de acordo com sua habilidade ou não de produzir efeitos em culturas celulares (POTIGIETER, 2004; FLORES; RIDPATH, 2007). Antigenicamente podem ser divididos em dois grupos: BVDV tipo 1 e BVDV tipo 2 (RIDPATH; BOLIN; DUBOVI, 1994). Dentro destes, são reconhecidos 11 subgenótipos do BVDV tipo 1 e dois subgenótipos do BVDV tipo 2.

O genótipo tipo 2 é mais predominante na América do Norte, com relatos ocasionais na Europa e no Brasil (FULTON *et al.*, 2000; FLORES *et al.*, 2005; FULTON *et al.*, 2005; TAJIMA; DUBOVI, 2005; FULTON *et al.*, 2009b).

O BVDV apresenta distribuição mundial, de forma endêmica em muitos países e geralmente, ocasiona importantes perdas econômicas à bovinocultura (GOENS, 2002). A prevalência e disseminação do vírus entre rebanhos e dentro de rebanhos estão relacionadas à presença de animais com infecção aguda e, principalmente, aos animais persistentemente infectados (HOUE, 1999). Estes são responsáveis pela manutenção do vírus no ambiente, pois excretam grande número de partículas virais em secreções e excreções (POTIGIETER, 2004; THURMOND, 2005).

A infecção pelo BVDV tem sido associada a uma ampla variedade de manifestações clínicas. Dentre as principais consequências da infecção por este vírus estão enfermidades gastroentérica aguda ou crônica, doença respiratória em bezerros, síndrome hemorrágica com trombocitopenia, abortos, malformações e imunossupressão. Entretanto, a maioria das infecções em animais imunocompetentes parece cursar de forma subclínica (POTIGIETER, 2004; RIDPATH; FLORES, 2007).

O diagnóstico presuntivo da infecção pelo BVDV pode ser realizado a partir do histórico do rebanho, sinais clínicos e achados pós-mortais (GOYAL, 2005). Contudo, o diagnóstico definitivo requer isolamento ou detecção de antígenos virais e/ou demonstração sorológica de resposta imune ao vírus, levando-se em consideração dados epidemiológicos, o caráter da infecção (aguda ou persistente) e o manejo vacinal (GOENS, 2002; RADOSTITS *et al.*, 2007).

Atualmente, os Estados Unidos e muitos países da Europa concentram-se na implementação de programas, oficiais ou voluntários, de controle e erradicação da doença em seus rebanhos (SYNGE *et al.*, 1999; HOUE; LINDENBERG; MOENNIG, 2005; HEFFERNAN *et al.*, 2009; PRESI; HEIM, 2009; ROSSMANITH, 2009; VAN CAMPEN, 2009). A detecção do animal persistentemente infectado e a remoção deste do rebanho é a peça-chave para o sucesso destes programas (HOUE, 1999), que envolvem a escolha de testes diagnósticos, medidas de biossegurança e programas de vacinação que se enquadrem melhor à realidade de cada país (GREISER-WILKE; GRUMMER; MOENNIG, 2003; HEFFERNAN *et al.*, 2009).

No Brasil, o conhecimento sobre a infecção pelo BVDV vem crescendo consideravelmente à medida que aumenta o número de laboratórios envolvidos em diagnóstico e pesquisa. E medidas de combate à infecção têm sido adotadas por iniciativa voluntária, sem a interferência oficial (FLORES *et al.*, 2005).

Este trabalho tem por finalidade a caracterização clínico-patológica e molecular da infecção pelo BVDV tipo 2 não citopático em uma propriedade do Estado do Rio Grande do Sul. Dando ênfase à detecção de animais persistentemente infectados, aos métodos diagnósticos utilizados e à distribuição do vírus nos tecidos, pelo teste imunohistoquímico.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Agente etiológico

O vírus da diarreia viral bovina (BVDV) é um membro do gênero *Pestivirus* pertencente à família *Flaviviridae*, e sendo assim, apresenta muitas características comuns a esta família. Como os flavivírus, eles possuem um envelope lipídico derivado das membranas da célula hospedeira que o torna suscetível à ação de solventes e detergentes (RIDPATH, 2005).

Características filogenéticas dividem os pestivírus em BVDV tipo 1 (BVDV-1), BVDV tipo 2 (BVDV-2), vírus da peste suína clássica, vírus da doença da fronteira, e em espécies provisórias como vírus Giraffe, vírus HoBi e o vírus Pronghorn (VILCEK *et al.*, 2005; RIDPATH; FLORES, 2007; STAHL *et al.*, 2007). Em um estudo recente, Liu *et al.* (2009) acrescenta a esta classificação o BVDV-3 (um pestivírus atípico de bovinos); o vírus Tunisian dos ovinos e o Bungowannah dos suínos.

Os pestivírus possuem vírions esféricos de 40 a 60 nm de diâmetro, seu genoma consiste de uma fita simples de RNA com polaridade positiva com 9 a 12,3 kb. (HAMMERS, 2001; POTGIETER, 2004; RIDPATH; FLORES, 2007). Os vírus de RNA possuem uma ampla heterogeneidade, que ocorre devido às altas taxas de mutação e recombinação gênica comuns nestes vírus (GOENS, 2002). Esta característica ajuda o BVDV, e outros pestivírus, na adaptação e evasão do sistema imune do hospedeiro (RIDPATH, 2003).

Segundo a habilidade ou não de produzir efeitos citopáticos em culturas celulares, o BVDV pode ser classificado em citopatogênico (cp) ou não citopatogênico (ncp) (POTGIETER, 2004; RIDPATH; FLORES, 2007). Estes dois biotipos não são distinguíveis sorologicamente. Entretanto, a nível molecular, identificou-se em células infectadas por BVDV cp uma proteína adicional não observada em células infectadas com vírus ncp (DEREGET; LOEWEN, 1995). Esta proteína conhecida como NS3 origina-se de mutações, recombinações, deleções ou rearranjos genéticos da proteína viral não estrutural NS2-3, presente nos vírus ncp. Embora o papel da NS3 ainda não esteja esclarecido, essa proteína é considerada o marcador molecular dos BVDV cp (RIDPATH; FLORES, 2007).

Os isolados ncp são responsáveis pela maioria das infecções naturais e pelas infecções fetais persistentes. Os isolados cp se constituem em uma minoria; não são capazes de produzir infecções persistentes e são isolados quase que exclusivamente de animais com a doença das mucosas (DM) (FLORES; SCHUCH, 2007; RIDPATH; FLORES, 2007).

De acordo com as características genéticas e antigênicas, os isolados de BVDV podem ser divididos em dois grupos: BVDV-1 e BVDV-2 (RIDPATH; BOLIN; DUBOVI, 1994; POTGIETER, 2004; RIDPATH; FLORES, 2007). Dentro destes, são reconhecidos 11 subgenótipos do BVDV-1 e dois subgenótipos do BVDV-2. Recentes pesquisas filogenéticas sugerem que exista diferença geográfica na distribuição dos genótipos e subgenótipos virais. Esta distribuição reflete o histórico de movimentação de gado naquela região, as vacinas utilizadas durante um determinado período e o isolamento geográfico das populações de bovinos. Desta forma, esses diferentes genótipos e subgenótipos são resultantes de diferentes pressões de seleção e das práticas de manejo adotadas (BOLIN; GROOMS, 2004).

Algumas similaridades podem ser observadas entre o BVDV-1 e o BVDV-2. A maioria das infecções em animais adultos por ambos os genótipos resultam em doença leve ou subclínica e isolados dos dois genótipos podem ser cp ou ncp. Além disso, isolados ncp do BVDV-1 e BVDV-2 podem estabelecer infecção persistente (RIDPATH, 2003).

Dentre as diferenças existentes entre estes dois genótipos destacam-se as relacionadas à resposta sorológica induzida no hospedeiro. Ridpath; Bolin; Dubovi (1994) demonstraram que ocorrem falhas na maioria dos anticorpos monoclonais contra o polipeptídeo gp53, de alguns BVDV-1, em se ligar ao BVDV-2, sugerindo que estes genótipos sejam antigenicamente distintos. Neste trabalho constatou-se ainda, que alguns BVDV-2 foram isolados de animais persistentemente infectados (PI) nascidos de fêmeas vacinadas com vacinas contendo amostras de BVDV-1. Concluindo-se que há falhas nos anticorpos anti-BVDV-1 em proteger contra a infecção do BVDV-2.

As amostras do tipo 1 são as mais frequentemente usadas na produção de vacina, testes e pesquisas diagnósticas. Os isolados tipo 2 são provenientes principalmente do soro fetal de bovino, dos animais PI nascidos de mães vacinadas contra BVDV-1 e dos bovinos que morreram da forma aguda da doença causada por um BVDV-2 ncp, denominada síndrome hemorrágica (RIDIPATH, 2003; RADOSTITS *et al.*, 2007).

2.2 Epidemiologia

O BVDV apresenta distribuição mundial, com caráter endêmico em muitos países onde geralmente, ocasiona importantes perdas econômicas à bovinocultura (GOENS, 2002). A infecção natural e suas formas clínicas ocorrem não somente em bovinos, mas também em ovinos, suínos, caprinos e em uma grande variedade de ruminantes de vida livre ou de cativeiro. Estudos sorológicos têm confirmado infecções em membros das famílias *Camelidae*, *Cervidae*, *Antilocapridae* e *Bovidae* (BELKNAP *et al.*, 2000; POTIGIETER, 2004; EVERMANN, 2006; VILCEK; NETTLETON, 2006; PASSLER; WALZ, 2009). Há relatos de infecção persistente pelo BVDV em algumas espécies de cervídeos e alpacas, porém estes relatos são ocasionais e pouco se sabe sobre a patogênese da doença nestes animais. Entretanto, o exato papel das espécies silvestres na epidemiologia da infecção por este vírus ainda deve ser esclarecido (BELKNAP *et al.*, 2000; CARMAN *et al.*, 2005; VILCEK; NETTLETON, 2006; DUNCAN, 2008; BYERS *et al.*, 2009, PASSLER; WALZ, 2009; VAN CAMPEN, 2009).

A infecção pelos pestivírus, em geral, podem resultar tanto em infecções agudas em animais suscetíveis, ou seja, nunca expostos ao BVDV, como em infecções persistentes (RIDPATH; FLORES, 2007). Esta última é resultante da habilidade do vírus ncp de atravessar a placenta e estabelecer infecção entre os 40 e 120 dias de gestação, período em que o sistema imune está se desenvolvendo (GROOMS, 2004). A infecção transplacentária, seguida da formação de animais PI pode ocorrer nas infecções por qualquer pestivírus. No entanto, os animais PI pelo BVDV parecem desempenhar um papel mais importante na epidemiologia da infecção e são considerados responsáveis pela manutenção desse vírus na natureza (RIDPATH; FLORES, 2007).

A prevalência e disseminação do BVDV entre rebanhos e dentro de rebanhos estão relacionadas à presença de animais com infecção aguda e, principalmente, à existência de animais PI (HOUE, 1999). Na infecção aguda, o vírus é excretado em pequenas quantidades e por poucos dias durante a infecção (3 a 10 dias) (HOUE, 1999). Entretanto, a infecção persistente possibilita a excreção contínua e duradoura de altos títulos virais em secreções (secreção vaginal, nasal, saliva, sangue, sêmen e leite) e em menor proporção em excreções (urina e fezes) de animais PI (POTGIETER, 2004; THURMOND, 2005; RADOSTITS *et al.*, 2007; RIDPATH, FLORES, 2007). Apesar das diversas maneiras pelo qual o BVDV pode infectar animais suscetíveis, o contato

direto com o PI é o método mais eficaz de transmissão do vírus (HOUE, 1999; ARENHART *et al.*, 2009).

Diferentes estudos demonstram considerável variação na prevalência de animais PI (0,1 a 4%) como também nas prevalências de animais sorologicamente positivos ao BVDV (18 a 84%) (LONERAGAN *et al.*, 2005; RIDPATH; FLORES, 2007; FULTON *et al.*, 2009b). Estas variações podem ser decorrentes do tipo de criação e práticas de manejo adotadas nas propriedades, que podem influenciar diretamente na transmissão do vírus (HOUE, 1999; VIET; FOURICHON; SEEGERS, 2007; EZANNO; FOURICHON; SEEGERS, 2008; VAN CAMPEN, 2009). Houe (1999) cita que em confinamentos, um animal PI pode infectar mais de 90% do rebanho antes de alcançar 3-4 meses de idade. Entretanto, um atraso nesta transmissão é visto em propriedades onde os animais são mantidos em grupos separados.

Os biotipos ncp são os mais prevalentes em diferentes países, entretanto há grande diferença nas prevalências dos genótipos (RIDPATH, 2005). Em estudos realizados nos Estados Unidos, verificou-se maior prevalência na população de bovinos de isolados ncp do BVDV-1a, BVDV-1b e BVDV-2a (FULTON *et al.*, 2000; FULTON *et al.*, 2005; TAJIMA; DUBOVI, 2005; FULTON *et al.*, 2009b). Diferentemente, na Europa a prevalência do BVDV-2 é baixa e há uma expressiva diversidade genética entre os subtipos de BVDV-1 (RIDPATH, 2005). Na China, em um estudo realizado com amostras isoladas entre os anos de 2005 e 2008, verificou-se a prevalência dos genótipos BVDV-1, sendo mais prevalente o subgenótipo BVDV-1m (XUE *et al.*, 2009a). No Brasil, Flores *et al.* (2005), demonstraram que a maioria dos isolados caracterizados pertencem ao genótipo BVDV-1 ncp, embora isolados de BVDV-2 e alguns BVDV cp já tenham sido identificados. Posteriormente, em um estudo complementar, Cortez *et al.* (2006) verificaram que a maior parte desses isolados brasileiros se classificava como BVDV-1a, enquanto a maioria das amostras BVDV-2 foram agrupadas como BVDV-2b.

Os fatores de risco da disseminação do BVDV dentro do rebanho são vários e geralmente estão associados a uma alta probabilidade de existência da infecção ativa (aguda e/ou persistente) (VIET; FOURICHON; SEEGERS, 2007). Em rebanhos leiteiros do norte da Itália, Luzzago *et al.* (2008) constataram que os principais fatores de riscos associados a altas prevalências do vírus envolviam novilhas prenhes. Dentre estes fatores destacou-se: a presença destas novilhas em pastagens comuns aos diferentes categorias de bovinos e/ou a outros animais como ovinos e ruminantes selvagens, cuja

prevalência de BVDV ou doença da fronteira era desconhecida; e a alta frequência de contato direto entre estas novilhas e bezerros com idade inferior a 15 meses. Outro estudo realizado com rebanhos de gado de corte em Yucatan, no México, verificou uma associação significativa entre o tamanho do rebanho e a compra de novilhas de reposição. Em categorias com número igual ou inferior a 100 animais e cujas novilhas eram compradas, o risco de soropositividade foi superior ao de rebanhos com o mesmo número de animais e cujas novilhas nasceram na propriedade (SOLIS-CALDERON; SEGURA-CORREA; SEGURA-CORREA, 2005). Diferentemente, Talafha *et al.*(2009), em estudo de soroprevalência do BVDV em rebanhos leiteiros da Jordânia, verificaram que esta era significativamente maior nos grandes e médios rebanhos quando comparados a rebanhos de menor tamanho.

A aquisição de animais sem testes prévios tem sido uma das principais causas de introdução de BVDV em rebanhos suscetíveis, principalmente em áreas com alta prevalência para o vírus, devido ao risco de se adquirir um animal PI ou animais na fase aguda da infecção, ou ainda, de introduzir novilhas prenhes que possam estar gestando bezerros PI (RIDPATH; FLORES, 2007; VIET; FOURICHON; SEEGERS, 2007, FULTON *et al.*, 2009b; VAN CAMPEN, 2009).

Geralmente, os animais jovens são mais suscetíveis, entretanto, bovinos adultos podem desenvolver doença severa se a infecção ocorrer com genótipos altamente virulentos. Animais não vacinados, vacinados inadequadamente ou com baixo *status* imunológico são os mais suscetíveis à infecção e ao desenvolvimento da doença clínica. Porém animais vacinados podem ser suscetíveis se os isolados de campo forem diferentes das cepas vacinais (RADOSTITS *et al.*, 2007; FULTON *et al.*, 2009b).

Técnicas reprodutivas como a inseminação artificial e transferência de embriões também podem ser responsáveis pela transmissão do BVDV (HOUE, 1999; GIVENS; WALDROP, 2004; THURMOND, 2005; GARD; GIVENS; STRINGFELLOW, 2007). A utilização de sêmen oriundo de animais PI e com infecção aguda pode induzir infecção transitória em vacas e infecção aguda ou persistente nas progênes (GIVENS; WALDROP, 2004; GARD; GIVENS; STRINGFELLOW, 2007). Além disso, redução nas taxas de concepção já foi observada em vacas soronegativas inseminadas com sêmen infectado pelo BVDV (GARD; GIVENS; STRINGFELLOW; 2007). Recentemente, tem-se relatado a capacidade do BVDV em causar infecção testicular prolongada em touros imunocompetentes após infecção aguda, porém o potencial para transmissão viral a partir destes animais parece ser baixo (GIVENS *et al.*, 2009). Touro

PI ou com infecção aguda pode não ser detectado em exames clínicos por apresentar-se saudável. Sendo assim, os touros devem ser testados e apenas os animais negativos podem ser introduzidos em centrais de inseminação artificial (HOUE, 1999).

A transmissão via transferência de embrião é possível, mas pode ser evitada pela correta execução dos procedimentos de lavagens padronizados para esta técnica (HOUE, 1999; GIVENS; WALDROP, 2004). Apesar disso, Gard; Givens; Stringfellow (2007) discutem que em alguns embriões artificialmente expostos a certos isolados de BVDV, o vírus infectante se manteve em pequena quantidade após lavagem apropriada ou tratamento com tripsina. Mas, a capacidade destas partículas virais remanescentes em infectar uma receptora é desconhecida. A passagem do vírus para o feto pode ocorrer se a doadora ou a receptora apresentarem infecção aguda ou persistente, ou se o vírus estiver presente no soro fetal bovino usado para lavar o embrião (THURMOND, 2005). Atualmente, há poucos relatos de infecção pela transferência de embriões, e nestes o soro fetal bovino foi mencionado como possível fonte de contaminação (GARD; GIVENS; STRINGFELLOW, 2007). Tal fato chama atenção para a necessidade de se monitorar os materiais de origem animal usados na coleta e transferência de embriões, assim como a saúde da doadora, dos embriões e da receptora, para a produção de progênes livres de BVDV (GARD; GIVENS; STRINGFELLOW, 2007).

Outra forma de transmissão observada compreende o contato de animais suscetíveis com secreções/excreções, feto abortado e placenta contaminada (RIDPATH; FLORES, 2007). Lindbert *et al.* (2004) demonstraram que a transmissão indireta do vírus pelo contato com fluidos fetais durante o nascimento de um animal PI é um importante fator de risco para infecção de novilhas prenhes do mesmo lote. E que a viabilidade do vírus nas descargas uterinas declina após 24-48 pós-parto.

O BVDV pode sobreviver no ambiente por alguns dias a semanas. Consequentemente, animais suscetíveis podem ser infectados quando expostos a alimentos ou equipamentos (agulhas ou material cirúrgico contaminado, luvas de palpção, tatuadores e aplicadores de brinco, etc.) previamente usado por animais PI ou com infecção aguda (THURMOND, 2005). Sob determinadas condições ambientais e em propriedades com alta densidade de animais, há maior probabilidade de transmissão de partículas virais através de aerossóis, principalmente em casos de bezerros infectados pelo BVDV-1 apresentando a forma respiratória da doença (BAULE *et al.*, 2001).

A transmissão mecânica por moscas hematófagas é possível. O BVDV já foi isolado de moscas da espécie *Musca autumnali* e a transmissão reproduzida experimentalmente, utilizando-se as espécies *Stomoxys calcitrans*, *Haematopota pluvialis* e *Hydrotaea irritans*, após repasto forçado por 10-15 minutos em um animal PI (TARRY; BERNAL; EDWARDS, 1991; THURMOND, 2005).

Transmissão iatrogênica do BVDV em fetos pode ocorrer quando fêmeas prenhes suscetíveis são vacinadas com vacina viva modificada (THURMOND, 2005). E, além disso, alguns estudos demonstram que animais vacinados com este tipo de vacina, são capazes de eliminar transitoriamente cepas vacinais, podendo assim atuar como uma fonte de infecção a animais prenhes suscetíveis (KLEIBOEKER *et al.*, 2003).

2.3 Patogenia e características clínico-patológicas

As consequências e a severidade da infecção pelo BVDV dependem de uma série de fatores que abrangem o genótipo, biotipo, virulência individual das cepas virais, o *status* imune do hospedeiro, o *status* reprodutivo e a ocorrência de infecções secundárias (RIDPATH; FLORES, 2007). Devido ao grande número de variáveis relacionadas à interação vírus/hospedeiro, vemos na infecção pelo BVDV uma ampla variedade de sinais clínicos e lesões (LIEBLER-TENORIO, 2005). Abaixo serão descritas as principais formas da infecção pelo BVDV.

2.3.1 Infecção aguda (transitória) de animais não-prenhes

A principal via de infecção pelo BVDV é a oro-nasal (RIDPATH; FLORES, 2007). O desenvolvimento dos sinais clínicos, a distribuição e disseminação do vírus no hospedeiro e em lesões teciduais são descritos em casos a campo e em reproduções experimentais da infecção (MARSHALL; MOXLEY; KELLING, 1996; WALZ *et al.*, 1999a; ARCHAMBAULT *et al.*, 2000; STOFFREGEN *et al.*, 2000; HAMMERS *et al.*, 2001; LIEBLER-TENORIO; RIDPATH; NEIL, 2002; LIEBLER-TENORIO; RIDPATH; NEIL, 2003; LIEBLER-TENORIO; RIDPATH; NEIL, 2004; FLORES *et al.*, 2005; RIDPATH *et al.*, 2006; BOOKER *et al.*, 2008; LUNARDI *et al.*, 2008; MONTGOMERY *et al.*, 2008; DIEGUEZ *et al.*, 2009).

A forma aguda da infecção pelo BVDV em animais não-prenhes pode resultar em diferentes manifestações clínicas, dependendo da virulência viral e do *status* imune do animal. Entretanto, estudos demonstram que 70 – 90% das infecções pelo BVDV são subclínicas (HAMMERS *et al.*, 2001). Geralmente são causadas por cepas virais de baixa virulência, afetando principalmente animais de 6 a 12 meses de idade. Na maioria dos casos são autolimitantes e apresentam alta morbidade com mortalidade baixa ou inexistente (HAMMERS *et al.*, 2001; FLORES; SCHUCH, 2007).

A replicação viral inicia-se pela mucosa nasal e posteriormente alcança altos títulos nas tonsilas (POTGIETER, 2004). Em cepas de baixa virulência os antígenos virais estão presentes predominantemente em folículos linfoides e na região cortical do timo, onde estão associados a linfócitos e células do estroma. A infecção multifocal do vírus na mucosa intestinal já foi demonstrada, entretanto não há relação entre a presença do vírus e lesões teciduais (LIEBLER-TENORIO; RIDPATH; NEIL, 2003). Altos títulos virais podem ser encontrados no sexto dia após a infecção, seguindo-se rápida neutralização do vírus que não pode ser mais detectado nos órgãos antes afetados. Esta última fase coincide com a morte de linfócitos infectados, levando à marcada depleção dos folículos linfoides e dos linfócitos da região cortical do timo. Em seguida, há repopulação dos focos de lesão com aumento dos linfócitos circulantes (LIEBLER-TENORIO; RIDPATH; NEIL, 2004).

Principalmente na América do Norte, houve um aumento, nos últimos anos, da prevalência de casos naturais da forma aguda da infecção pelo BVDV em bovinos, cursando com sinais clínicos severos e alta taxa de mortalidade em diferentes grupos etários (HAMMERS *et al.*, 2001; RIDPATH *et al.*, 2006). Estes surtos têm sido associados a cepas altamente virulentas do genótipo BVDV-2, embora isolados de amostras com alta virulência do BVDV-1 já tenham sido reconhecidas (HAMMERS *et al.*, 2001; POTGIETER, 2004; RIDPATH *et al.*, 2006; FLORES; SCHUCH, 2007; LUNARDI *et al.*, 2008).

Os sinais clínicos associados à infecção por cepas altamente virulentas de BVDV são severos, mas geralmente inespecíficos, destacando-se hipertermia, anorexia, depressão e frequentemente diarreia (BOLIN; RIDPATH, 1992; ARCHAMBAULT *et al.*, 2000; LUNARDI *et al.*, 2008). Na infecção por cepa de alta virulência do BVDV-2, as lesões macroscópicas e histológicas são semelhantes, porém mais severas, às encontradas em animais com a DM, e se caracterizam principalmente por erosões e ulcerações no trato digestivo superior (STOFFRENGEN *et al.*, 2005). Alguns animais

podem apresentar ainda hemorragias extensas e trombocitopenia, caracterizando a Síndrome Hemorrágica (WALZ *et al.*, 1999a; LIEBLER-TENORIO *et al.*, 2005).

A replicação e disseminação inicial das cepas altamente virulentas são similares ao que ocorre nas de baixa virulência. Entretanto, a infecção não se restringe aos órgãos linfoides e à quantidade de antígenos no tecido excede rapidamente a encontrada na infecção com cepas de baixa virulência (LIEBLER-TENORIO, 2005). O vírus pode infectar células mieloides e megacariócitos da medula óssea (WALZ *et al.*, 1999a; WALZ *et al.*, 1999b), mas geralmente são detectados em linfonodos, mucosa do trato digestivo superior e inferior, trato respiratório e no sistema endócrino. Antígenos também podem estar presentes na parede de vasos sanguíneos (ARCHAMBAULT *et al.*, 2000; LIEBLER-TENORIO *et al.*, 2005).

Apesar da ampla distribuição viral pelo organismo do hospedeiro as lesões são restritas. Geralmente, observa-se marcada depleção dos folículos linfoides. Ao longo do trato digestivo pode se notar necrose epitelial e lesões erosivas a ulcerativas das criptas intestinais (ARCHAMBAULT *et al.*, 2000). As lesões em linfonodos são tardias e não correspondem à quantidade de vírus no tecido. No timo, a lesão é inicialmente multifocal, porém células infectadas se distribuem difusamente pelo órgão (LIEBLER-TENORIO *et al.*, 2005).

Em relação à Síndrome Hemorrágica, estudos experimentais com o genótipo BVDV-2, demonstraram que os animais infectados desenvolveram pirexia e diarreia com sangue. Decréscimo na contagem de plaquetas foi observado nos dias 7-12 após infecção em todos os animais. O exame histológico e imuno-histoquímico anti-BVDV em fragmentos da medula óssea desses animais revelaram necrose e hiperplasia de megacariócitos com marcação positiva dessas células (WALZ *et al.*, 1999a). Em outro estudo complementar sobre o efeito deste mesmo genótipo na função plaquetária, Walz *et al.* (1999b) sugerem que durante a infecção dois mecanismos contribuem no desenvolvimento da trombocitopenia. O primeiro envolve uma redução no número de plaquetas e o segundo, alguma alteração na função das plaquetas produzidas.

Uma diminuição na quantidade de linfócitos B e T na circulação é um achado consistente da infecção aguda pelo BVDV. A severidade desta linfopenia ajuda na distinção entre as infecções por cepas com baixa ou alta virulência. Entretanto, mesmo em infecções subclínicas, vírus de baixa virulência são capazes de induzir marcada, porém transitória imunossupressão (RIDPATH; NEIL; LANDGRAF, 2000).

2.3.2 Imunossupressão

Decréscimos na população linfoide da circulação periférica, assim como alterações na função dessas células na circulação ou nos tecidos, são as bases para a imunossupressão induzida pelo BVDV. E apesar de que ambas possam ser detectadas na infecção aguda, apenas a última foi observada em animais PI (KAPIL *et al.*, 2005). Diferentemente do que foi descrito para animais com infecção aguda, os animais PI apresentam valores leucocitários normais, contudo a proporção das subpopulações de linfócitos pode mudar com o decorrer do tempo (POTIGIETER, 2004). Na infecção aguda, ocorre predominantemente uma leucopenia transitória, descrita por Olafson; Macculum; Fox (1946) em animais infectados naturalmente e experimentalmente.

O grau de leucopenia e a sua duração parecem estar associados à virulência viral. Estudos revelam que há uma correlação entre virulência e a depleção linfoide. Em uma infecção experimental, Liebler-Tenorio; Ridpath; Neil (2003) constataram que para cepas de BVDV-2 altamente virulentas a quantidade de linfócitos diminuía em 80% da quantidade existente no período pré-inoculação. Em cepas menos virulentas esta porcentagem era inferior a 50%.

Também se observou diferenças em relação ao tipo de leucócito afetado. Neutropenia tem sido relatada como principal anormalidade hematológica de alguns isolados de BVDV (ARCHAMBAULT *et al.*, 2000), em outros isolados a linfopenia era predominante e em alguns estudos, tanto o número de neutrófilos como de linfócitos encontram-se reduzidos (KAPIL *et al.*, 2005).

O mecanismo pelo qual o vírus induz a leucopenia ainda é desconhecido. Muitas possibilidades existem, incluindo remoção de células infectadas pelo sistema imune, destruição de células do sistema imune pelo BVDV e aumento da migração de células da corrente sanguínea para os tecidos de eleição de replicação viral (KAPIL *et al.*, 2005).

O BVDV infecta diferentes células essenciais ao controle da resposta imune inata e adquirida. Estas células incluem os granulócitos, macrófagos, células mieloides apresentadoras de antígenos, linfócitos B, linfócitos T CD4+ e CD8+ (CHASE; ELMOWALID; YOUSIF; 2004). Experimentos *in vitro* mostram que o vírus pode alterar a função dessas células, levando a um déficit nos mecanismos de defesa do hospedeiro com conseqüente disseminação viral (RADOSTITS *et al.*, 2007). Lee *et al.* (2009) demonstram em um estudo com BVDV cp, que após a infecção as proteínas e

outras moléculas envolvidas na resposta imune, principalmente as relacionadas à apresentação antigênica, têm suas funções comprometidas. Este trabalho sugere ainda que durante a infecção, o vírus promove a ativação e diferenciação de monócitos, entretanto inibe a apresentação de antígenos para os linfócitos T, resultando em inflamação não controlada mediada por macrófagos ativados.

Existem evidências significativas de que em infecções por múltiplos patógenos, o BVDV tenha potencial para exacerbar a patogenicidade de outros microrganismos (POTIGIETER, 2004, DIEGUEZ *et al.*, 2009). Efeitos sinérgicos da infecção pelo BVDV tem sido descrita em animais com infecção concomitante por *Mannheimia haemolytica*, herpesvírus bovino tipo 1 e vírus sincicial respiratório bovino. O BVDV também tem sido associado a infecções simultâneas com *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, vírus da estomatite papular bovina, rotavírus e coronavírus (POTIGIETER, 2004; RADOSTITS *et al.*, 2007).

2.3.3 Infecção transplacentar/intrauterina

O principal impacto econômico da infecção pelo BVDV é causado por infecções intrauterinas resultante em desordens reprodutivas (GROOMS, 2004; BROCK, GROOMS; GIVENS, 2005; GROOMS *et al.*, 2006). A infecção de fêmeas prenhes soronegativas é frequentemente seguida de transmissão transplacentária do vírus para o embrião ou feto. As consequências da infecção do concepto dependem do estágio de gestação em que ocorre a infecção, do biotipo (cp/ncp) e da cepa viral (FLORES; SCHUCH, 2007; RIDPATH; FLORES, 2007).

3.3.1. Infecção durante o período concepção até o estágio embrionário

Estudos epidemiológicos têm apontado o BVDV como importante agente associado a baixas taxas de concepção em rebanhos bovinos (GROOMS, 2006; GARD; GIVENS; STRINGFELLOW, 2007). Apesar de não ter sido estabelecido o mecanismo pela qual ocorre essa redução na fertilidade, alguns estudos sugerem que sejam decorrentes de falhas na fertilização, morte embrionária precoce e disfunção ovariana (GROOMS, 2004; LIEBLER-TENORIO, 2005). Problemas de fertilidade no rebanho

também podem estar associados com um sêmen de baixa qualidade oriundo de touros PI (POTGIETER, 2004; RADOSTITS, 2007).

Disfunção ovariana tem sido correlacionada a infiltrado inflamatório linfocítico no período de 8 a 60 dias após infecções experimentais de animais suscetíveis. No ovário, antígenos virais foram detectados por longos períodos em células do estroma e do sistema imune (GROOMS; BROCK; WARD, 1998). A modulação da secreção hormonal pelos ovários também tem sido descrita em infecções agudas e pode contribuir na patogênese da infertilidade induzida pelo BVDV (LIEBLER-TENORIO, 2005).

Exposição a oócitos em desenvolvimento pode resultar em redução da viabilidade tanto por lesões diretas na célula como pela possibilidade de se criar um meio impróprio ao desenvolvimento do embrião (GROOMS, 2004). Alguns estudos relatam que alterações histológicas em úteros e ovidutos foram evidentes entre o 6º e 12º dia após infecção com infusão intrauterina de BVDVcp (ARCHBALD *et al.*, 1973). Kubovikova *et al.* (2008) demonstraram através de microinjeções contendo amostras cp e ncp de BVDV em embriões, que o BVDV cp tem efeito inibitório no desenvolvimento da mórula e blastócito durante a produção *in vitro*, resultando em degeneração embrionária devido a efeitos citopáticos. Mas ambos os biotipos foram capazes de se replicar em células embrionárias *in vitro*.

Estudos sugerem ainda, que a zona pelúcida protege o embrião em desenvolvimento dos efeitos diretos do BVDV. Entretanto, após a remoção da zona pelúcida, BVDV cp pode ter efeitos deletérios sobre a sobrevivência do blastocisto (LIEBLER-TENORIO, 2005). Infecções com amostras de BVDV ncp parecem não surtir esse mesmo efeito. Entretanto, antígenos virais podem ser detectados em embriões inoculados com BVDV ncp no dia 14 após incubação. Indicando que em contraste ao biótipo cp, é possível que o efeito de exposição dos embriões ao vírus ncp ocorre tardiamente (GROOMS, 2004).

2.3.3.2 Infecção fetal

Após a implantação, a infecção transplacentária é possível e, como citado anteriormente, as características dessa infecção dependem estritamente do período gestacional, do desenvolvimento da imunocompetência fetal, do biotipo envolvido e da

virulência viral (GROOMS, 2006; RIDPATH; FLORES, 2007). A infecção fetal é responsável pelos maiores impactos econômicos causados pelo BVDV (FLORES; SCHUCH, 2007).

Apesar de não estar claro o mecanismo pelo qual o vírus ultrapassa a barreira placentária, sugere-se que lesões vasculares causadas pelo vírus no lado materno da placenta permitam o acesso à circulação fetal (FREDRIKSEN *et al.*, 1999). O desenvolvimento da placenta com formação dos placentomas, trofoblastos e tecidos fetais parece determinar a eficiência da infecção, visto que as infecções a partir dos 30 dias de gestação têm eficiência superior às ocorridas no concepto (LIEBLER-TENORIO, 2005).

A infecção entre 40 e 125 dias de gestação pode resultar em alta incidência de morte fetal, abortos, mumificações, nascimento de animais PI e em menor escala anomalias fetais (EVERMANN; BARRINGTON, 2005). Em vários relatos o índice de abortos em rebanhos imunes é baixo, mas pode aumentar drasticamente em rebanhos não imunes. Além disso, surtos de doença aguda severa associada ao BVDV-2 têm sido associados à alta incidência de abortos (EVERMANN; RIDPATH, 2002).

A morte fetal induzida pelo BVDV em fêmea suscetíveis pode ocorrer em qualquer período da gestação, todavia são mais comuns durante o primeiro trimestre (GROOMS, 2004). Contudo, a expulsão do feto pode ocorrer em alguns dias ou até meses após a infecção (FLORES; SCHUCH, 2007). Devido ao tempo decorrido entre a expulsão fetal e o subsequente diagnóstico de aborto, as lesões fetais e placentárias podem ser mascaradas pela autólise e o isolamento viral pode não ser possível nesses casos (GROOMS, 2004; POTIGIETER, 2004).

A ocorrência de malformações fetais é um achado comum em rebanhos infectados e geralmente acontece quando a infecção ocorre entre os 100 e 150 dias de gestação (RIDPATH; FLORES, 2007). Neste período, o feto apresenta-se na fase final da organogênese e do desenvolvimento do sistema imune. O mecanismo de lesão celular induzido pelo vírus parece incluir uma inibição do crescimento e diferenciação celular, ou lise direta das células (EVERMANN; BARRINGTON, 2005). Embora não seja claro, a combinação da destruição celular direta pelo vírus e a resposta inflamatória ao vírus tem sido proposta como mecanismo patogênico nestes casos (GROOMS, 2004). Alguns defeitos congênitos usualmente observados incluem defeitos no sistema nervoso central (SNC) (hipoplasia cerebelar, hidrocefalia e hipomielinogênese), defeitos oculares (atrofia e displasia de retina, catarata, microftalmia), hipoplasia tímica, retardo

no crescimento, hipoplasia pulmonar, alopecia, hipotricose, bragnatismo, artrogripose e outras anormalidades esqueléticas (BROWN *et al.*, 1973; SCOTT *et al.*, 1973; EVERMANN; BARRINGTON, 2005).

Fetos que sobrevivem à infecção fetal por amostras ncp entre os 40 e 120 dias gestacionais invariavelmente desenvolvem imunotolerância ao vírus e subsequentemente tornam-se PI. Estes animais consistem no mecanismo pelo qual o vírus persiste e se dissemina nos rebanhos (GROOMS, 2004). Esta infecção será discutida com mais detalhes no item 2.3.3.

A infecção intrauterina em fetos imunocompetentes, ou seja, nos estágios finais da prenhez (128 a 285 dias de gestação), resultam em infecção transitória no feto, comparável a que ocorre nas infecções pós-natais (POTIGIETER, 2004). Apesar de abortos e nascimento de bezerros fracos serem usualmente atribuídos a infecção pelo BVDV, neste estágio, fetos infectados são capazes de montar uma resposta imune efetiva ao vírus e debelar a infecção (LIEBLER-TENORIO, 2005). Estes animais nascem geralmente saudáveis e possuem anticorpos pré-colostrais contra o BVDV. No entanto, bezerros congenitamente infectados com o vírus podem ter mais risco de desenvolverem sérios problemas de saúde no período pós-natal (GROOMS, 2004).

2.3.3 Infecção persistente

Animais PI pelo BVDV são fontes primárias de disseminação do vírus dentro e entre rebanhos (GROOMS, 2004). Estes animais são resultantes da infecção fetal pelo vírus ncp, tanto pelo BVDV-1 quanto pelo BVDV-2, entre 40 e 120 dias de gestação (MCCLURKIN *et al.*, 1984; LIEBLER-TENORIO, 2005; RIDPATH; FLORES, 2007). Porém, a infecção persistente já foi relatada em infecções anteriores ao 18º dia gestacional e posteriores ao 125º dia de gestação (GROOMS, 2006).

Charleston *et al.* (2001) sugerem que a capacidade do BVDV ncp em estabelecer infecção persistente em fetos infectados no primeiro trimestre de gestação está correlacionada à habilidade deste vírus em inibir a produção de interferon tipo I. O desafio ao BVDV cp em fetos nesta fase gestacional resultou na produção de interferon, o que não foi constatado na infecção pelo BVDV ncp.

Durante os 90 aos 129 dias gestacionais, ocorre o desenvolvimento do sistema imune fetal, e a presença de BVDV ncp circulante nessa fase faz com que os antígenos

virais sejam reconhecidos como próprios, havendo subsequente seleção negativa de linfócitos B e T específicos ao BVDV infectante durante a ontogênese (GROOMS, 2006). Estes animais se tornam imunotolerantes ao vírus infectante, ou seja, seu organismo não consegue produzir anticorpos que neutralizem o vírus e debelem a infecção. Assim, animais PI tornam-se portadores permanentes e excretam o vírus continuamente em secreções e excreções (RIDPATH; FLORES, 2007).

A imunotolerância é específica ao vírus infectante, ou seja, animais PI são capazes de produzir anticorpos contra outros patógenos ou mesmo contra cepas heterólogas ao BVDV virêmico (MCCLURKIN *et al.*, 1984; LIEBLER-TENORIO *et al.*, 1991).

Animais com infecção persistente podem apresentar malformações não letais como consequência de infecção uterina. Todavia, muitos animais PI podem nascer saudáveis e não apresentar lesões macroscópicas (LIEBLER-TENORIO, 2005). Crescimento lento pode muitas vezes ser observado nesses animais, e tal fato tem sido associado à deficiência de hormônios da tireoide (POTIGIETER, 2004).

No exame histopatológico desses animais, Potigieter (2004) relata que algumas alterações podem ser encontradas: nefrite intersticial mononuclear focal com espessamento da membrana basal glomerular, marcada encefalite mononuclear, hepatite caracterizada por infiltrado mononuclear leve no espaço porta, hiperplasia peribronquiolar focal e necrose epitelial focal do esôfago e língua, podendo haver infiltrado mononuclear. Os ovários de vacas PI podem apresentar diminuição no número de folículos e alterações do corpo lúteo.

A maioria dos animais PI morre nos primeiros meses de vida por infecções secundárias ou pela DM (RIDPATH; FLORES, 2007). Em análise de alguns rebanhos nos EUA, Loneragan *et al.* (2005) detectou que 2-5% dos animais com doença respiratória crônica seguida de morte foram detectados como PI, e que, em rebanhos expostos ao PI a incidência de doença respiratória foi 43% maior que em outros rebanhos. Entretanto, existem vários relatos de que estes animais possam sobreviver até a idade adulta. Estes podem se tornar reprodutores e transmitir o vírus para a progênie (fêmeas) ou pelo sêmen (machos). Fêmeas PI que atingem a idade adulta e ficam prenhes geralmente produzem bezerros PI (RIDPATH; FLORES, 2007).

2.3.4 Doença das mucosas

A doença das mucosas é uma condição severa, de baixa morbidade e geralmente fatal, podendo alcançar 100% de mortalidade. É uma consequência tardia da infecção pelo BVDV *in utero*, e ocorre quando animais PI são superinfectados com um BVDV cp antigenicamente homólogo ao BVDV ncp residente (POTIGIETER, 2004). Geralmente, o BVDV cp que determina a DM origina-se do próprio animal PI por mutações, deleções e rearranjos genéticos. Estes mecanismos resultam na expressão da proteína NS3, como dito anteriormente no item 2.1 (RIDPATH; FLORES, 2007). Entretanto, estas recombinações genéticas e o subsequente desenvolvimento da DM, podem se originar de fontes externas. Ridpath; Bolin (1995) relataram um surto de DM após a utilização de vacinas vivas modificadas com BVDV cp e a possibilidade de recombinações entre BVDV-1 e BVDV-2 determinarem a doença.

Sob condições experimentais, dois padrões de desenvolvimento da DM podem ser observados (POTIGIETER, 2004). O primeiro, conhecida como DM de início precoce, ocorre entre 2-3 semanas após exposição ao BVDV cp e após o desenvolvimento da doença o isolado é idêntico ao que animal foi exposto. O segundo, a DM tardia, ocorre meses ou anos após a exposição e o BVDV cp isolado no animal afetado é uma recombinação entre o BVDV ncp persistente e o BVDV cp original (LIEBLER-TENORIO *et al.*, 2000). Esta distinção é possível apenas em casos experimentais, pois na maioria dos isolados de campo não é possível determinar a identidade do BVDV cp original (LIEBLER-TENORIO, 2005). Ambos os padrões cursam com diarreia severa e enfraquecimento rápido na fase final, não podendo ser distinguíveis clinicamente (LIEBLER-TENORIO *et al.*, 2000).

Quanto ao curso, a DM pode ser classificada em aguda e crônica. Fatores que influenciem o curso da doença ainda são desconhecidos e não se estabeleceu nenhuma relação entre os padrões DM precoce e DM tardia e a duração dos sinais clínicos (POTIGIETER, 2004).

A DM aguda é caracterizada por rápido (2-21 dias) aparecimento dos sinais clínicos em animais PI de 6-24 meses de idade. Animais afetados geralmente apresentam febre (40-41°C), anorexia, taquicardia, polipneia e ausência de movimentos ruminais. Geralmente ocorre uma diarreia líquida e profusa de 2-4 dias após o aparecimento dos sinais clínicos, podendo ter odor fétido e conter muco e/ou variáveis quantidades de sangue e fibrina (RADOSTITS *et al.*, 2007). Erosões, ulcerações e

extensas áreas de necrose da mucosa dos lábios, gengiva, língua, palato, comissuras labiais e esôfago são comuns. Lesões similares também podem se desenvolver no focinho, cavidade nasal, vulva e pele dos tetos (POTIGIETER, 2004). As lesões do intestino delgado são usualmente restritas às placas de Peyer, que se apresentam hiperêmicas e frequentemente cobertas por exsudato fibrinoso. Tais lesões são similares em agregados linfoides do ceco, cólon e reto. Alterações no reto são mais leves do que no cólon, mas hemorragias focalmente extensas podem ser mais frequentes no primeiro (LIEBLER-TENORIO *et al.*, 1991). A histologia revela necrose extensiva dos folículos linfoides, incluindo placas de Peyer, centros germinativos do baço e linfonodos (RIDPATH; FLORES, 2007). Lesões intestinais incluem criptas dilatadas e revestidas por epitélio cuboidal, podendo conter restos celulares no interior. Pode ser observada ainda, dilatação dos vasos lacteais e infiltrado mononuclear na lamina própria (LIEBLER-TENORIO *et al.*, 1991).

Na DM crônica os sinais clínicos são similares aos encontrados na DM aguda, porém menos severos e de curso prolongado (superior a 18 meses) (POTIGIETER, 2004). A doença se caracteriza por diarreia intermitente ou contínua. Adicionalmente, pode ocorrer inapetência, emagrecimento progressivo e erosões interdigitais. Algumas vezes podem-se constatar descarga nasal e ocular persistentes. Áreas alopecias e de hiperqueratose podem se desenvolver, especialmente na cabeça e pescoço. É comum a observação de lesões erosivas crônicas na mucosa oral e na pele. Laminite, necrose interdigital, deformação no casco também são achados característicos. Esses animais podem sobreviver por muitos meses e, geralmente, morrem após debilidade progressiva (EVERMANN; BARRINGTON, 2005; RIDPATH; FLORES, 2007).

Em casos naturais da DM, antígenos do BVDV podem ser demonstrados por marcação imuno-histoquímica em numerosos órgãos e tecidos (BIELEFELDT-OHMANN, 1983). Liebler-Tenorio *et al.* (1991) comprovaram, em estudo experimental, que era possível diferenciar a distribuição antigênica entre os BVDV cp e ncp, nos diferentes tecidos. O exame de animais com a DM revelou que o BVDV cp era predominantemente detectado em áreas onde se observava lesões tissulares. Estas lesões incluem: depleção de folículos linfoides da tonsila, linfonodo, baço, e linfoides associados a mucosas intestinais; alterações no córtex do timo; alterações na mucosa do trato digestivo superior, e no epitélio de criptas dos intestinos delgado e grosso. Tais observações sugerem que o BVDV cp é importante tanto na patogênese da DM, como na manifestação da doença na superfície mucosa e órgãos linfoides.

2.5 Diagnóstico

O diagnóstico presuntivo da infecção pelo BVDV pode ser fundamentado no histórico do rebanho, sinais clínicos e achados pós-mortais (GOYAL, 2005). Entretanto, o diagnóstico definitivo requer isolamento ou detecção de antígenos virais e/ou demonstração sorológica de resposta imune ao vírus, levando-se em consideração dados epidemiológicos, o caráter da infecção (aguda ou persistente) e o manejo vacinal (GOENS, 2002; RADOSTITS *et al.*, 2007). Para isto, existe atualmente grande número de testes disponíveis, sendo que cada um possui suas vantagens, desvantagens e aplicabilidade.

2.5.1 Isolamento Viral

Apesar de recentes avanços na ciência diagnóstica para o BVDV, o teste padrão é o isolamento viral em cultivos celulares, seguido de realização da imunofluorescência indireta e imunoperoxidase para identificação do isolado viral (SALIKI; DUBOVI, 2004; RIDPATH; FLORES, 2007).

O BVDV pode se replicar em diferentes cultivos celulares, entretanto os mais sensíveis são as células MDBK (*Madin-Darby Bovine Kidney Cells*), BT (*Bovine Turbinate*) e Btest (*Bovine Testicle*) (SANDVIK, 1999; SALIK; DUBOVI, 2004).

No animal vivo, o melhor material para isolamento viral é o sangue total, do qual leucócitos são extraídos e utilizados como inóculo (SALIK; DUBOVI, 2004). Outras amostras como soro, fezes, sêmen e suabes naso-faríngeos e orais, também podem ser testadas (RADOSTITS *et al.*, 2007). As melhores amostras de necropsia ou fetos abortados são órgãos linfoides como baço, placas de Peyer, linfonodos mesentéricos e timo (SALIK; DUBOVI, 2004).

Algumas desvantagens são apontadas em relação ao método de isolamento viral. Primeiramente, trata-se de um método demorado, laborioso e às vezes são necessárias múltiplas passagens em cultivo celular (CORNISH *et al.*, 2005; HILBE *et al.*, 2007). Adicionalmente, exige avaliação individual de todos os animais do rebanho, o que eleva seu custo. Em estudo comparando o isolamento viral e a detecção do RNA viral pela

técnica de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), verificou-se que 19% de 16 animais PI não foram identificados pelo isolamento (DEREGT *et al.*, 2002). Entretanto, Cornish *et al.* (2005) avaliaram que este método obteve melhores resultados na detecção de animais infectados pelo BVDV, quando confrontado à técnica de imuno-histoquímica (IHQ) em biópsia de orelha e ao teste imunoenzimático de captura de antígeno (ACE) também a partir de biópsias de orelha. Adicionalmente, como demonstrado por Driskell; Ridpath (2006) e Edmondson *et al.* (2007), existem diferentes protocolos para a realização do isolamento viral, o que pode levar a resultados diferentes quando laboratórios de diagnóstico são comparados.

2.5.2 Imuno-histoquímica (IHQ)

Nos últimos anos, a detecção de antígenos do BVDV em tecidos fixados em formol e embebidos em parafina pelo método de IHQ tem sido amplamente utilizada no diagnóstico de infecção aguda, persistente e em casos de abortos ou animais que morreram nos primeiros dias de vida (BRODERSEN, 2004; LIEBLER-TENORIO; RIDPATH; NEIL, 2004; SALIKI; DUBOVI, 2004). Através do reconhecimento do antígeno no citoplasma de células infectadas, esta técnica possibilita um diagnóstico mais específico do que técnicas que necessitam da extração do antígeno de soluções (SANDVIK, 1999). Além disso, pode ser utilizada em animais jovens, pois não sofre a interferência de anticorpos maternos, como ocorre nos exames sorológicos (GROOMS; KEILEN, 2002)

O anticorpo monoclonal 15C5, que reage com a proteína E0 (gp48), possui a capacidade de detectar a maioria dos isolados do BVDV e tem sido usado com aplicações diagnósticas e de pesquisa (RADOSTITS *et al.*, 2007).

Mais recentemente, a IHQ de biópsias de orelha tem ganhado aplicação importante na investigação da existência de animais PI em rebanhos bovinos (NJAA *et al.*, 2000; GROOMS; KEILEN, 2002; RIDPATH *et al.*, 2002; BRODERSEN, 2004). Por esta técnica, é possível identificar de maneira eficaz os animais PI. Cornish *et al.* (2005) encontraram marcação imuno-histoquímica na pele da orelha de 100% dos animais PI, também positivos na RT-PCR e no isolamento viral. Porcentagem semelhante (90%) foi obtida em outro estudo recente, onde se comparou a IHQ, o ACE, o isolamento viral e a RT-PCR (EDMONDSON *et al.*, 2007). Além disso, as amostras de orelha são facilmente coletadas, transportadas e apresentam boa estabilidade,

podendo ser estocadas em formal por até 30 dias e no refrigerador por mais de 10 dias antes do processamento, sem que isso ocasione resultados falsos negativos (MILLER *et al.*, 2005).

As desvantagens desta técnica incluem a existência de múltiplas etapas que podem aumentar o erro durante o processo, além da avaliação subjetiva dos resultados obtidos (CORNISH *et al.*, 2005). E apesar da marcação positiva em folículos pilosos, queratinócitos da epiderme e células mononucleares da derme, ser atribuída exclusivamente ao animal PI (BRODERSEN, 2004), algumas informações conflitantes abrangem a habilidade desta técnica em detectar também, animais com infecção aguda. Em dois estudos onde se utilizou a IHQ em biópsia de orelha, Hilbe *et al.* (2007) e Ridpath *et al.* (2002) não detectaram animais com infecção aguda. Não obstante, Cornish *et al.* (2005) identificaram 3 de 8 animais com infecção aguda e positivos na IHQ de orelha.

2.5.3 Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)

A RT-PCR pode reconhecer o RNA viral na fração leucocitária do sangue, no soro, sêmen, biópsia de orelha e tecidos conservados em blocos de parafina. Esta técnica é altamente sensível e tem sido utilizada para o diagnóstico das diferentes manifestações clínicas da infecção pelo BVDV, além da detecção de animais PI a partir de amostras biológicas individuais e em *pools* de soros sanguíneos e de tanques de leite (TAJIMA; DUBOVI, 2005; DRISKELL; RIDPATH, 2006; EDMONDSON *et al.*, 2007). Segundo Deregt *et al.* (2002), a RT-PCR é mais sensível quando comparada ao isolamento viral, detectando 96% de amostras de sangue positivas e podendo assim, ser usadas na identificação de bezerros PI em rebanhos. Em outro estudo, PILZ *et al.* (2007), concluíram que a utilização do RT PCR em *pools* de soros sanguíneos demonstrou ser uma estratégia rápida de diagnóstico etiológico e de baixo custo tanto para a detecção de infecção aguda quanto de animais PI.

Esta técnica possibilita também, a determinação dos genótipos de BVDV, apesar de anticorpos genótipo-específicos serem disponíveis para uso no isolamento viral. Vale ressaltar que a genotipagem é bastante útil em programas de vacinação e controle do BVDV (GOENS 2002).

Entretanto, também é um método laborioso e caro, de múltiplos passos, o que pode aumentar o risco de contaminação, e os *primers* devem ser cuidadosamente escolhidos para a detecção do BVDV circulante nos diferentes tecidos (SANDVIK, 1999). A repetição da RT-PCR, ou a utilização de uma técnica mais específica, no animal positivo é necessária para diferenciar um animal PI de um com infecção transitória (RIDPATH *et al.*, 2002).

2.5.4 Ensaio imunoenzimático (ELISA) de captura de antígeno (ACE)

Diversos ACE têm sido descritos e atualmente, pelo menos dois kits estão comercialmente disponíveis. Estes testes são úteis para identificação de animais PI no rebanho, porém não são confiáveis para o diagnóstico de infecção aguda (SALIKI; DUBOVI, 2004). Pode ser realizado em amostras de soro ou extratos de amostra de orelha em solução de tampão fosfato-salina (PBS). Um dos benefícios é que os resultados podem ser fornecidos em poucas horas (DRISKELL; RIDPATH, 2006). Os fragmentos de orelha são fáceis de coletar, e estudos preliminares mostram que tais amostras são estáveis não havendo redução na detecção viral via ACE e RT PCR nas temperaturas de -20°C, 4°C e 25°C por 7 dias (DRISKELL; RIDPATH, 2006).

Cornish *et al.* (2005) apontam a eficiência deste método ao identificar 100% de animais PI detectados pelo isolamento viral e pelo RT-PCR para as mesmas amostras. Em um estudo comparativo entre resultados de amostras de mesma origem, submetidas a diferentes laboratórios dos Estados Unidos, Edmondson *et al.* (2007) corroboraram a eficácia da técnica de ACE em biópsia de orelha, que mostrou-se hábil na identificação de animais positivos para BVDV e obteve perfeito nível de concordância entre os laboratórios. A análise de soro, a partir do mesmo método, foi eficaz em 91% dos animais positivos testados. Recentemente, Ridpath *et al.* (2009) averiguou que ao se utilizar fragmentos de orelha de fetos bovinos abortados e natimortos, o ACE provou ser um método prático na vigilância das doenças reprodutivas induzidas pelo BVDV.

Entretanto, outro estudo mostra que o número de animais positivos diminuiu drasticamente quando submetidos a um novo teste, mostrando a necessidade de se repetir os animais positivos para determinar o *status* de PI (DRISKELL; RIDPATH, 2006).

2.5.5 Sorologia

O diagnóstico sorológico de animais expostos a um agente infeccioso por infecções naturais ou por meio de protocolos de imunização, ainda são procedimentos utilizados. Para o BVDV, estes testes incluem o ELISA e a soroneutralização (SN) (SALIKI; DUBOVI, 2004; RIDPATH; FLORES, 2007). Infelizmente, a diferenciação entre anticorpos produzidos por resposta à infecção aguda, anticorpos vacinais e anticorpos colostrais, geralmente é difícil de ser realizada (GOYAL, 2005). Raue; Harmeyer; Nanjiani (2010), em estudo com o objetivo de comparar quatro kits comerciais de ELISA, quanto a sua eficácia em diferenciar animais expostos à infecção natural pelo BVDV de animais vacinados com vacina inativada, concluiu que nenhum dos testes se mostrou eficaz para tal propósito.

Os bezerros geralmente nascem sem anticorpos e soroconvertem após receberem o colostro. Estes anticorpos passivos declinam após 3 a 8 meses de idade. (GOENS, 2002). Por isso, a presença de anticorpos em animais privados do colostro pode ocorrer apenas devido a infecção ativa ou à vacinação (GOYAL, 2005).

Na infecção aguda de animais imunocompetentes, anticorpos contra o vírus podem ser detectados de 10 a 14 dias após a infecção (SANDVIK, 1999; RIDPATH; FLORES, 2007). Animais PI são geralmente soronegativos, exceto quando apresentam anticorpos colostrais nas primeiras semanas após o nascimento ou quando respondem imunologicamente à exposição a vírus heterólogo ao vírus infectante (GOENS, 2002).

A titulação de anticorpos em tanques de leite pode indicar a prevalência de animais soropositivos no rebanho (DIEGUEZ *et al.*, 2009). Entretanto, após a remoção dos animais PI ou ao fim da infecção aguda, as vacas geralmente se mantêm positivas pelo resto da vida e os níveis de anticorpos no leite declinam à medida que vacas soronegativas são introduzidas no rebanho (HOUE, 1999).

Alguns cuidados na interpretação de resultados, na ausência de um histórico adequado do rebanho (exposições prévias, protocolo de imunização, programa de biossegurança, etc.), devem ser considerados (SALIKI; DUBOVI, 2004). Quando devidamente aplicados, os exames sorológicos podem ser usados para determinar eficiência de vacinas, avaliar protocolos de vacinação, monitorar o *status* imune do rebanho frente a uma exposição ao BVDV e associar o vírus aos possíveis sinais clínicos observados (SALIKI; DUBOVI, 2004). Em contrapartida, em rebanhos vacinados estes testes têm valor epidemiológico limitado e servem unicamente para

verificar o *status* sorológico e a possível circulação do vírus no rebanho (RIDPATH; FLORES, 2007).

2.6 Diagnóstico diferencial

Devido às diferentes formas clínicas possíveis numa infecção pelo BVDV, várias doenças são listadas entre os diagnósticos diferenciais. Logo, a prevalência, a epidemiologia, os achados clínicos e patológicos das doenças em diferentes regiões devem ser consideradas (RADOSTITS *et al.*, 2007). Deve-se salientar também, que muitas infecções pelo BVDV podem estar associadas à presença de outros patógenos (POTGIETER, 2004).

Nos casos de animais adultos com diarreia deve-se excluir a salmonelose, desinteira do inverno, paratuberculose, febre catarral maligna, intoxicação por arsênico, micotoxicoses e deficiência de cobre (EVERMANN; BARRINGTON, 2005)

Diagnóstico diferencial para doenças que cursam com lesões orais em bovinos incluem a febre catarral maligna, doença da língua azul, estomatite vesicular, estomatite papular e febre aftosa. O diagnóstico diferencial das doenças respiratórias em bezerros incluem infecção pelo vírus respiratório sincial bovino, *Pasteurella* spp., *Manheimia* spp., *Hemophilus* spp., *Salmonella* spp. e *Mycoplasma* spp.(EVERMANN; BARRINGTON, 2005)

O BVDV deve ser distinguido também, de etiologias que ocasionem falhas reprodutivas e malformações (POTGIETER, 2004). Para estas últimas, deve-se considerar, mesmo não tendo relatos de infecção clínica em bovinos no Brasil, a doença da língua azul, a infecção pelo vírus Akabane e pelo vírus Aino.

2.8 Vacinação

A vacinação é indicada para rebanhos com alta rotatividade de animais, rebanhos com sorologia positiva, com histórico de doença clínica ou reprodutiva, e com confirmação virológica de BVDV (RIDPATH; FLORES, 2007). O objetivo principal da vacinação deve ser prevenir a infecção aguda em animais suscetíveis, evitando a doença

clínica, e a infecção fetal aos diferentes genótipos de BVDV, impedindo a contínua geração de animais PI (KELLING, 2004; FULTON, 2005).

Vacinas inativadas são mais seguras que as vacinas atenuadas, e alguns programas de vacinação preconizam seu uso durante a gestação (FULTON, 2005). Entretanto, requerem maiores quantidades de partículas virais para preparação de uma dose vacinal, o que as tornam mais caras, e necessitam de duas doses vacinais para imunização inicial com revacinação (RADOSTITS *et al.*, 2007).

Vacinas atenuadas são mais baratas, pois necessitam de menor quantidade de partículas virais por dose de vacina. Isso se deve ao fato de possibilitarem a replicação antigênica no animal vacinado (FULTON, 2005). Geralmente, estas vacinas necessitam de apenas uma dose para imunização (KELLING, 2004). Estudos demonstram após imunização com este tipo de vacina, que os anticorpos podem ser detectados em até 18 meses (CORTESE *et al.*, 1998). Outros estudos indicam que há um declínio de anticorpos contra o BVDV após 140 dias após a vacinação inicial, e sugerem que uma revacinação seja feita neste período (FULTON; BURGE, 2000). Entretanto, existem grandes preocupações em relação à segurança deste tipo de vacina. Em estudos experimentais, animais vacinados poderiam transmitir o vírus vacinal a animais suscetíveis. Estes estudos alegam que nestes animais ocorra viremia transitória do qual vírus pode ser isolado de secreções nasais (KELLING, 2004). Givens *et al.* (2007), verificaram que touros no período pré-púbere, vacinados com vacinas atenuadas de vírus ncp, apresentaram infecção testicular prolongada, porém não se pôde determinar os riscos desta infecção na transmissão venérea e na fertilidade destes animais. Outra preocupação seria em relação à vacinação de fêmeas prenhes. Animais prenhes não devem ser vacinados com este tipo de vacina, pois pode ocorrer infecção do feto, com consequências variáveis dependendo da fase gestacional em que a fêmea foi vacinada (RADOSTITS *et al.*, 2007). Além disso, animais PI podem desenvolver a DM quando exposto há vírus vacinal cp semelhante ao ncp infectante (FULTON, 2005).

A capacidade destes dois tipos de vacinas em induzir a imunidade fetal é questionada. Alguns estudos apontam que a vacina atenuada garante proteção fetal significativa, porém incompleta, enquanto as vacinas inativas só garantem imunidade parcial (KELLING, 2004). Arenhart *et al.* (2008) e Xue *et al.* (2009b), verificaram que o uso de vacina atenuada antes da cobertura conferiu proteção fetal a 89, 4% dos animais avaliados no primeiro estudo, e diminuiu o risco de infecção fetal pelo BVDV-1 em 82% e pelo BVDV-2 em 75%, no segundo estudo.

Atualmente, há em vários países vacinas atenuadas e inativadas contra o BVDV, porém no Brasil, todas as vacinas disponíveis são inativadas e a maioria contém cepas norte-americanas do BVDV-1. Essas vacinas possuem também antígenos de outros agentes infecciosos como o herpesvírus bovino tipo-1, vírus da influenza bovina tipo-3 e o vírus sincicial respiratório bovino e algumas contêm *Pasteurella* spp. (FLORES *et al.*, 2005).

2.9 Controle

A contínua presença do BVDV em rebanhos não se deve à falta de qualidade nos testes diagnósticos, mas sim a falhas na implementação de programas de imunização, no estabelecimento de programas de monitoramento de rebanho e no desenvolvimento de programas eficazes de biossegurança e controle da biocontaminação (RADOSTITS *et al.*, 2007).

Vários programas de controle e erradicação do BVDV estão sendo implementados em diferentes países do mundo (SYNGE *et al.*, 1999; HOUE; LINDENBERG; MOENNIG, 2005; HEFFERNAN *et al.*, 2009; PRESI; HEIM, 2009; ROSSMANITH, 2009; VAN CAMPEN, 2009). Os programas consistem na identificação e eliminação de animais PI, prevenção da introdução do vírus no rebanho; adoção de programas de imunização e de controle da biocontaminação e por fim, erradicação do vírus dos rebanhos (HOUE; LINDENBERG; MOENNIG, 2005; VAN CAMPEN, 2009). Vale ressaltar que a implementação destes programas deve se adequar à realidade de cada país, tendo em vista o tipo de rebanho adotado, a epidemiologia do vírus e quais vacinas e métodos de diagnósticos encontram se disponíveis (GREISER-WILKE; GRUMMER; MOENNIG, 2003; HEFFERNAN *et al.*, 2009).

Em um programa de controle, os principais testes diagnósticos podem ser categorizados da seguinte maneira: 1) testes iniciais para classificação do *status* do rebanho; 2) testes subsequentes, em rebanhos positivos, para identificar animais infectados; 3) monitoramento contínuo para confirmar o *status* de rebanho livre da infecção (HOUE; LINDENBERG; MOENNIG, 2005; ROSSMANITH, 2009).

Dentre os testes iniciais os mais usados para diagnóstico de rebanho são aqueles que envolvem a detecção de anticorpos em amostras de tanques de leite, ou a detecção anticorpos individuais ou em *pools* de soro ou leite oriundos de vacas primíparas, e a

detecção do vírus em amostras de tanques de leite (GREISER-WILKE; GRUMMER; MOENNIG, 2003; PRESI; HEIM, 2009).

Em rebanhos categorizados como positivos, o segundo passo é a identificação e eliminação de animais PI. Tal ação é a peça-chave no controle e prevenção de infecções fetais que resultem no nascimento de outros bezerros PI que irão manter o vírus no rebanho (GREISER-WILKE; GRUMMER; MOENNIG, 2003; GROOMS 2004). Para a detecção destes animais, Laureyns; Ribbens; Kruif (2009), recomendam que sejam testados cada animal do rebanho a partir de *pools* de amostras de sangue (30 amostras) e amostras de tanque de leite, pelo RT-PCR. Se algum *pool* ou amostra de tanque de leite for positivo, cada indivíduo pertencente àquela amostra deverá ser testado para detecção antigênica.

Independentemente dos resultados, todo bezerro nascido deve ser testado do dia em que todo rebanho também foi testado, até um ano após o último animal PI for removido. Ou seja, o período de teste de bezerros é prolongado em 1 ano toda vez que um animal PI for detectado (LAUREYNS; RIBBENS; KRUIF, 2009; PRESI; HEIM, 2009).

Posteriormente, o monitoramento do rebanho consistirá na detecção de animais PI que possam ter escapado aos testes de identificação ou na detecção de reinfeção possivelmente resultante de protocolos inadequados de vacinação ou de biossegurança (LAUREYNS; RIBBENS; KRUIF, 2009). Medidas de biossegurança têm por objetivo prevenir a exposição do rebanho ao BVDV, sendo assim todos os fatores de riscos associados a cada propriedade devem ser cuidadosamente estudados (PRESI; HEIM, 2009).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Procedimentos gerais

Ao final do ano de 2007, uma necropsia realizada pelo Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV/UFRGS) detectou um animal PI pelo BVDV. As informações referentes ao histórico de rebanho e sinais clínicos prévios foram obtidas junto ao veterinário responsável e por auxiliares da fazenda. Foram realizadas coletas de biopsias de orelha, sangue com EDTA e soro em animais dessa propriedade menores de 1 ano de idade (a maioria com baixo desenvolvimento) e em vacas com problemas reprodutivos crônicos. O intuito era detectar outros animais com infecção persistente. Os animais PI diagnosticados sofreram eutanásia ou morreram de forma natural. Três destes permaneceram no SPV/UFRGS para avaliação de parâmetros clínicos e análise de hemograma realizado pelo Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias da UFRGS.

Os animais foram mantidos em baias de alvenaria com piso de concreto forrado por maravalha, recebiam feno de alfafa duas vezes ao dia e concentrado uma vez ao dia. A baia era higienizada regularmente e não havia o contato destes animais ou de suas secreções e excretas com outros animais da Faculdade de Veterinária da UFRGS.

3.2 Coleta de amostras de orelhas

A biópsia de orelha foi executada na propriedade por membros do SPV-UFRGS ou pelo veterinário responsável. Durante a coleta, a troca do material utilizado (tesoura romba reta) foi realizada para cada animal, sendo lavado e desinfetado em solução de iodo, para uso posterior. Pequenos fragmentos de aproximadamente 1 cm de comprimento e 0,5 cm de largura foram coletadas da ponta do pavilhão auricular e acondicionadas em tubos de ensaio contendo solução de formalina a 10% por 24 horas. Este material foi desidratado em soluções crescentes de álcool etílico, diafinizados em xilol e incluídos em parafina (PROPHET *et al.*, 1992). Posteriormente, foram realizados cortes de 5 μ em lâminas de poli-l-lisina, submetidas ao teste imuno-histoquímico.

3.3 Necropsia e análises histológicas

Durante a necropsia dos animais PI, os achados macroscópicos identificados foram avaliados. Para exame microscópico coletou-se olhos, fragmentos de orelha ou pele, cérebro, cerebelo, medula espinhal, gânglio trigeminal, hipófise, linfonodo submandibular, linfonodo mesentérico, tonsila, linfonodo hepático, linfonodo mediastínico, baço, timo, pulmão, traqueia, esôfago, rúmen, omaso, retículo, abomaso, intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo), intestino grosso (ceco, cólon espiral e reto), tireoide, rim, medula óssea, adrenal, coração e fígado. Estes fragmentos foram fixados em solução de formalina a 10% por 24h, e posteriormente processados segundo as técnicas de rotinas histológicas, seguida da embebição em parafina (PROPHET *et al.*, 1992). Foram confeccionadas lâminas para coloração de rotina de hematoxilina e eosina (HE) e lâminas de poli-l-lisina para exame imuno-histoquímico. Conteúdo de intestino de animais com diarreia foi encaminhado para exame bacteriológico aeróbio no Laboratório de Bacteriologia Veterinária da UFRGS e parasitológico incluindo contagem de ovos e oocistos por grama de fezes, no Laboratório de Protozoologia Veterinária da UFRGS.

3.4 Imuno-histoquímica (IHQ)

A IHQ foi realizada em cortes de olho, pele, cérebro, cerebelo, medula espinhal, gânglio trigeminal, hipófise, linfonodo submandibular, linfonodo mesentérico, tonsila, linfonodo hepático, linfonodo mediastínico, baço, timo, pulmão, traqueia, esôfago, rúmen, omaso, retículo, abomaso, intestino delgado, intestino grosso, tireoide, rim, medula óssea e adrenal, dos animais necropsiados, e em biópsias de tecido cutâneo da orelha dos animais suspeitos. Para realização da IHQ, pequenas alterações foram realizadas no protocolo previamente padronizado por Schmitz (2006). O anticorpo primário monoclonal comercial anti-BVDV 15C5 (Syaracuse, USA) foi diluído em uma solução tampão fosfato salina (PBS) na concentração de 1:500.

As lâminas foram desparafinadas em xilol, hidratadas em soluções decrescentes de álcool etílico e lavadas em água destilada. A recuperação antigênica foi feita com protease XIV de *Streptomyces griseus* (Sigma, Chemical Co., St. Louis, Mo) a 0,005% em PBS por 15 minutos a 37°C e as marcações inespecíficas reduzidas a partir da

aplicação de leite desnatado a 5% por 15 minutos à temperatura ambiente. O anticorpo primário foi aplicado por 14 a 16 horas (*overnight*) a 4° C, em câmara úmida. Posteriormente, utilizou-se anticorpo secundário biotilado e solução streptavidina conjugada a uma molécula de fosfatase alcalina (LSAB + System AP, DakoCytomation) por aproximadamente 20 minutos cada, a temperatura ambiente. As lâminas eram então lavadas em água destilada e após houve preparação da solução reveladora. Esta consistia do cromógeno *Permanent Red* (DakoCytomation) no qual era realizada a maceração de 1 pastilha do cromógeno em 3ml de tampão. Eram aplicados sobre as lâminas 100µl da solução por 15 minutos. Fez-se contracoloração com hematoxilina por 20 segundos, seguida de lavagem em água e secagem em ar corrente, para posterior passagem em xilol e montagem com Entellan. Lâminas controle positivo de córtex cerebral e biópsia de orelha foram inseridas junto com as lâminas a serem testadas. Em alguns casos incluíram-se controles negativos substituindo apenas o anticorpo primário por solução de PBS.

3.4 Sorologia

No Laboratório de Virologia da UFRGS, trinta amostras de soros coletadas de animais com 2-3 meses de idade em 2008 e 30 de animais da mesma idade coletadas em 2009, foram testadas para presença de anticorpos contra BVDV em teste de ELISA comercial (*HerdChek[®] Bovine Viral Diarrhoea Virus Antibody ELISA Test Kit, IDEXX Laboratories*, Liebefeld-Bern, Suíça), conforme recomendações do fabricante. A amostra foi considerada negativa ou positiva para presença de anticorpos a partir da densidade óptica corrigida da amostra.

3.5 Isolamento viral

As amostras de sangue com anticoagulante EDTA de todos os animais foram refrigeradas e encaminhadas ao Setor de Virologia da Universidade Federal de Santa Maria para isolamento viral, sob responsabilidade do professor Eduardo Furtado Flores. Em seguida, foram encaminhados também amostra de pulmão, baço e timo dos animais necropsiados para novo isolamento viral.

Amostra de soro e pele de um animal com pododermatite foram encaminhadas ao Laboratório de Virologia da UFRGS, para isolamento e realização da transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR).

O material foi inoculado em linhagem celular MDBK (ATCC, CCL-220) mantida em meio mínimo de Earle modificado por Dulbecco, suplementado com 5% de soro fetal bovino livre de BVDV e acrescido de 200 UI/mL de penicilina e 200 µg/mL de estreptomicina e incubadas a 37°C. O monitoramento da replicação viral foi realizado através da observação de efeito citopático para as amostras citopáticas ou através do teste de imunofluorescência indireta para BVDV para as amostras não citopáticas após três passagens em células MDBK, ou pela RT-PCR.

3.5.1 Extração do RNA

A extração do RNA, realizada no Laboratório de Virologia da UFRGS, seguiu o método de TRIzol®LS (Invitrogen, Carlsbad, Estados Unidos) próprio para amostras líquidas e foi utilizado segundo as recomendações do fabricante. A solução possui fenol e isotiocianato de guanidina, o RNA permanece protegido durante a ruptura das células e liberação de componentes celulares. A adição de clorofórmio separou a suspensão em duas fases, uma aquosa e outra orgânica. O RNA permaneceu exclusivamente na fase aquosa e foi removido por precipitação com álcool isopropílico. O método permitiu isolar RNA total livre de contaminação por proteína ou DNA. Foram utilizadas amostras de sobrenadantes de cultivo celular, soros e/ou sangues dos animais suspeitos de BVDV.

3.5.2 RT-PCR

Para o teste de RT-PCR utilizou-se kit comercial Superscript®One Step RT-PCR com Taq Platinum® (Invitrogen, Estados Unidos) conforme instruções do fabricante para amplificação da região 5'UTR de pestivírus, para tanto utilizou-se os iniciadores 324 e 326 (VILCEK *et al.*, 1994). Os produtos de amplificação com tamanhos esperados de 288 pares de base foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2,0% com 0,1 µg/mL de *Blue green loading dye I* (LGC Biotecnologia) em tampão de Tris-ácido acético-EDTA (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). A

visualização foi realizada sob lâmpada ultravioleta, onde foram comparados os produtos de amplificação com padrões de peso molecular com escala de 100 pares de bases (Fermentas, Estados Unidos).

3.5.3 Sequenciamento de isolados virais e análise filogenética

Os produtos de amplificação de 288 pb referentes da região 5'UTR foram purificados através de kit *GFX DNA and Gel Band Purification* (Amersham Bioscience, Estados Unidos). Ambas as fitas foram sequenciadas utilizando-se os pares de iniciadores 324/326 (VILCEK *et al.*, 1994).

O sequenciamento das amostras foi realizado no Laboratório ACTGene (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS) utilizando o sequenciador automático *ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer* armado com capilares de 50 cm e polímero POP6 (*Applied Biosystems*).

A análise filogenética (em andamento) será realizada conforme descrito por STALDER *et al.* (2005).

4. RESULTADOS

Neste trabalho detectou-se 6 animais infectados por cepas ncp do BVDV-2 em 179 amostras coletadas de uma propriedade com 1300 animais, destinada ao cultivo de arroz e criação de gado de corte da raça Angus, localizada em Itapuã, Município de Viamão, Rio Grande do Sul, no período de novembro de 2007 a maio de 2009.

4.1 Dados epidemiológicos

A propriedade tinha divisas comuns com outras fazendas de criação de gado de corte e criações mistas. Segundo o veterinário, os animais eram mantidos a pasto e recebiam sal mineral em cochos distribuídos pelos piquetes. O manejo reprodutivo era realizado por inseminação artificial com sêmen importado, oriundo de empresas que realizam testes periódicos para detecção de BVDV em suas amostras. Na época de realização da inseminação artificial, foram compradas novilhas de reposição provenientes de Rosário do Sul, RS. Aproximadamente 400 bezerros nasciam anualmente, durante o mês de fevereiro, e eram desmamados até o final de maio. Esta categoria permanecia em piquetes separados dos animais adultos. O programa vacinal incluía aplicação de vacinas contendo amostras BVDV-1 inativadas em novilhas e vacas antes do período de cobertura e após o diagnóstico de gestação.

4.2 Coleta de amostras na propriedade

Em novembro de 2007, uma visita à propriedade foi solicitada ao SPV-UFRGS. Um animal macho, da raça Aberdeen Angus, com 2 anos de idade (N 1093/07), apresentava apatia, subdesenvolvimento e lesões crostosas acompanhada de secreção mucopurulenta na região ocular (Figura 1A). Estas lesões também eram observadas no focinho e dígitos dos membros pélvicos e torácicos (Figura 1B). Este animal estava relutante em caminhar e se apresentava levemente desidratado. De acordo com o veterinário, dos 50 animais mantidos no mesmo piquete só este havia adoecido durante o ano.

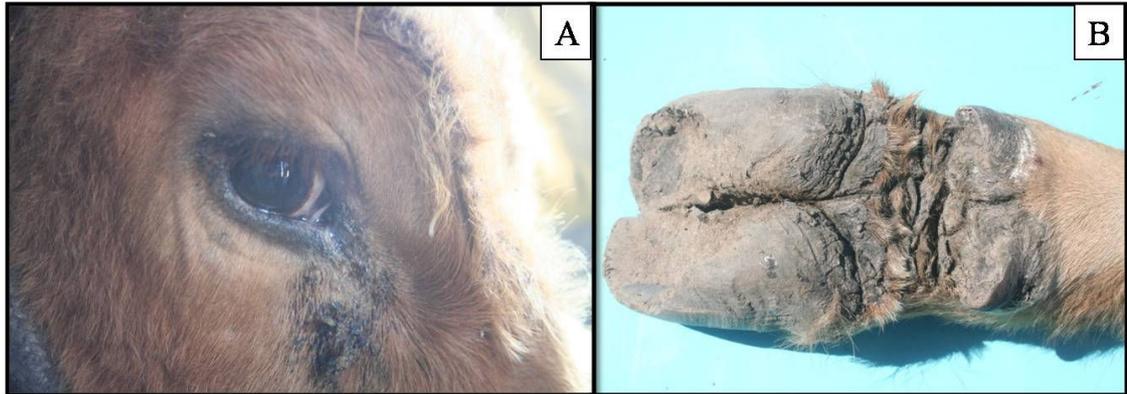


Figura 1- Bovino, macho, Angus, N 1093/07. A. Secreção ocular mucopurulenta associada a crostas próximas a comissura inferior do olho. B. Dermatite crostosa afetando a pele digital ventral e espaço interdigital.

Durante a necropsia, verificou-se além das alterações previamente descritas, pequena área de erosão (2 cm) na base da língua e evidenciação da polpa branca no baço. À microscopia, havia no plano nasal e língua, proliferação acantomatosa do epitélio difusa acentuada, necrose e degeneração multifocal acentuada do estrato córneo, muitas vezes associada a infiltrado inflamatório de neutrófilos e focos de ulceração. Na junção derme-epiderme havia edema e infiltrado mononuclear multifocal moderado (Figura 2).

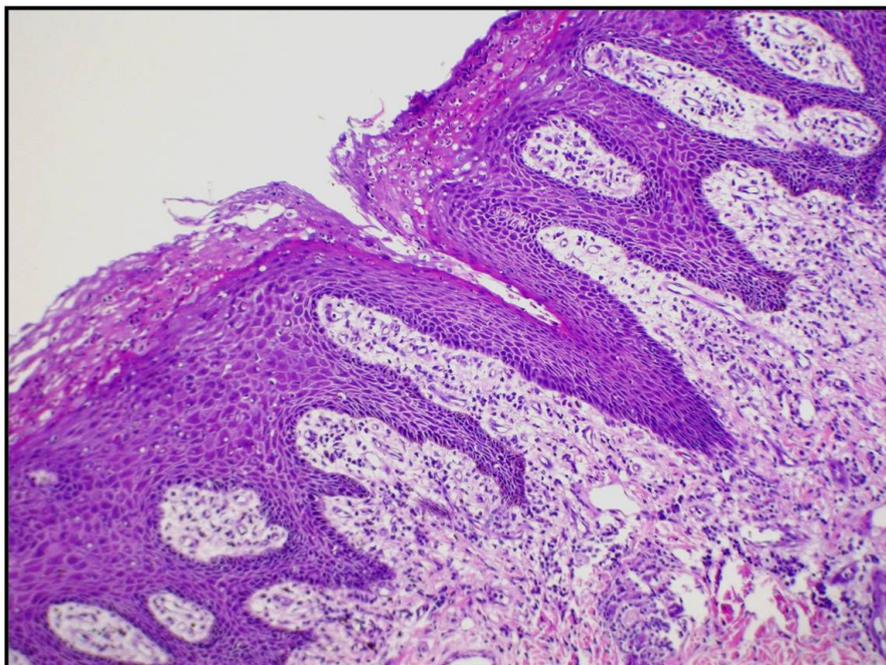


Figura 2- Bovino, N 1093/07, plano nasal. Proliferação acantomatosa do epitélio, áreas de necrose do estrato córneo associado a infiltrado inflamatório de neutrófilos. Edema e infiltrado mononuclear multifocal moderado na junção derme-epiderme. HE, obj. 20.

Linfonodos e baço apresentavam moderado infiltrado de histiócitos na região centrofolicular. As alterações em intestinos consistiam de infiltrado mononuclear em lâmina própria e dilatação de vasos lacteais. A imuno-histoquímica da pele foi positiva e a RT-PCR e sequenciamento genético possibilitaram o diagnóstico de infecção pelo BVDV-2.

Após a detecção deste animal, foram enviadas ao SPV-UFRGS, no dia 07 de março de 2008, oito amostras de sangue, soro e biópsias de orelhas. Os resultados dos exames estão citados na Tabela 1. Neste ano, ocorreram problemas reprodutivos como aborto e retorno ao cio em aproximadamente 40% dos animais inseminados. Verificou-se também, nascimento de bezerros fracos, grande número de bezerros com baixo desenvolvimento corporal e alguns com opacidade de cristalino.

Tabela 1- Descrição dos dados referentes às amostras enviadas no dia 07 de março de 2008 ao SPV-UFRGS, com os respectivos resultados obtidos pelos exames de imuno-histoquímica (IHQ) e isolamento viral (VI).

Identificação	Idade	IHQ	VI
Vaca 1	8-9 anos	Negativa	Negativa
Vaca 2	10 anos	Negativa	Negativa
Vaca 3	8 anos	Negativa	Negativa
Vaca 4	5 anos	Negativa	Negativa
Novilha 1	1 ano	Negativa	Negativa
Novilha 2	1 ano	Negativa	Negativa
N 163/08	3-4 meses	Positiva	Positiva
Bezerra 1	3-4 meses	Negativa	Negativa

As vacas 1 e 2 apresentavam problemas reprodutivos. As vacas 3 e 4 eram progenitoras das bezerras 1 e N 163/08, respectivamente. Estas bezerras apresentavam subdesenvolvimento e tinham nascido com opacidade de cristalino unilateral. A bezerra 1 possuía ainda, aumento de volume da articulação metatarso falangiana e abscessos na região do pescoço.

O animal N 163/08 sofreu eutanásia e durante o procedimento de necropsia, observou-se aumento dos linfonodos mesentéricos e coloração vermelho-cereja do córtex cerebral. Ao exame citológico, detectou-se em impressões de córtex coradas pelo Panótico Rápido, inúmeras hemácias parasitadas por *Babesia bovis* em capilares. A histologia revelou congestão difusa acentuado do córtex cerebral, infiltrado

mononuclear multifocal moderado no intestino delgado e infiltrado de histiócitos em centrofoliculares de linfonodos e placas de Peyer. O isolamento do BVDV ncp foi possível a partir do cultivo celular em amostras de pulmão, timo, e baço. Amostras também foram positivas na imuno-histoquímica e na RT-PCR. O sequenciamento identificou o BVDV-2.

Outras coletas subsequentes foram realizadas em animais com idade de 2-3 meses, que apresentavam baixo desenvolvimento corporal e em animais aparentemente normais mantidos na mesma categoria. Nas coletas realizadas em 2009, testou-se a RT-PCR utilizando-se *pool* de soros como teste de triagem de animais PI, descartando-se o isolamento viral. A data das coletas, número de animais coletados e resultados dos testes diagnósticos realizados estão contidos na Tabela 2.

Tabela 2- Relação das datas de coletas, número de animais coletados, número de animais positivos nos testes diagnósticos para triagem de animais PI pelo BVDV no período de 2008 a 2009, e resultado do sequenciamento viral.

Data	Nº de animais	IHQ	VI	RT-PCR
14/04/08	15	2	2*	2
25/05/08	40	1	1*	1
30/04/09**	17	1	1*	1
14/05/09**	91	0	0	0
Total	171	4	4	4

* Amostras BVDV ncp. **Amostras processadas pela RT-PCR a partir de *pools* de soro.

Durante estas coletas foram identificados 25 animais cegos que nasceram com opacidade parcial ou total do cristalino (catarata) (Figura 3A, B), e em dois esta opacidade era bilateral. Estes animais quando estressados caminhavam em círculos (Figura 4). Vinte e quatro destes animais foram encontrados nas duas coletas do ano de 2008, e apenas um na primeira coleta de 2009. Outros sinais clínicos observados foram: secreção nasal (5/171), secreção ocular e nasal (2/171) e diarreia líquida profusa (1/171).

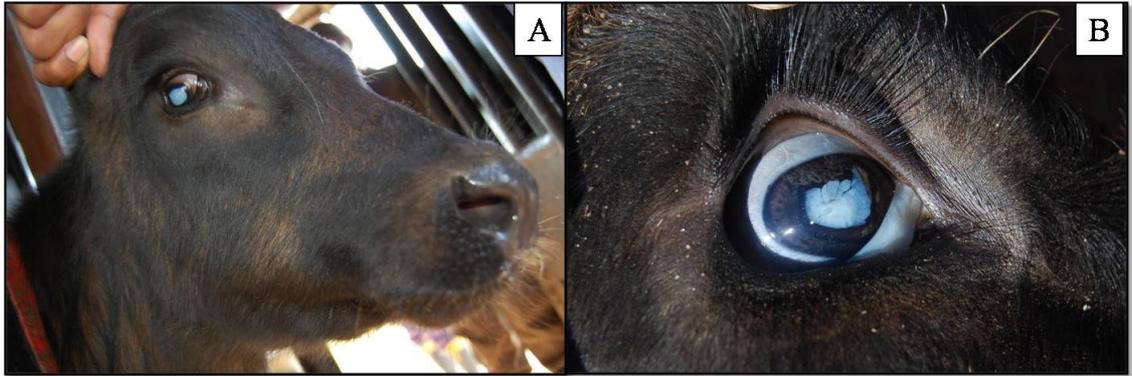


Figura 3- Bovino, macho, Angus. A. Opacidade unilateral do cristalino observada durante coletas para triagem de animais PI. B. Detalhe do olho demonstrando a opacidade quase total do cristalino.



Figura 4- Bovino, macho, Angus. Foto sequência (sentido anti-horário) demonstrando o andar em círculo de um bovino com catarata unilateral, após estresse por movimentação forçada.

4.3 Avaliação dos animais PI levados à Faculdade de Veterinária da UFRGS

Dos 4 animais positivos, dois machos castrados e uma fêmea (N 407/08, N 531/08 e N 979/09), foram transferidos ao SPV-UFRGS, o outro animal detectado no dia 30 de abril de 2009, morreu na propriedade e a necropsia não foi possível.

Durante a permanência destes animais no SPV-UFRGS, verificou-se em um animal (N 531/08) catarata bilateral, diarreia líquida profusa (Figura 5A), com duração de 22 dias, seguida de prostração e morte. O animal N 407/08 morreu após apresentar-se prostrado por um período de 4 dias. Secreção nasal bilateral (Figura 5B) aos primeiros 15 dias após sua transferência para o SPV-UFRGS foi a única alteração observada no animal N 979/09. Este animal, apesar do subdesenvolvimento, apresentava-se saudável, completando a idade de 1 ano e 9 meses, quando sofreu eutanásia. Não se constatou outras alterações clínicas ou no hemograma durante o período de avaliação destes animais.



Figura 5- Bovinos, Angus, PI. A. Animais PI, subdesenvolvidos, à esquerda animal N 407/08 e à direita, o N 531/08. Nota-se ao fundo mancha de diarreia líquida na parede da baia. B. Animal N 979/09 apresentando secreção nasal mucosa bilateral.

Dentre as alterações macroscópicas identificadas durante a necropsia dos 3 animais destacam-se: aumento moderado dos linfonodos mesentéricos (3/3), evidenciação moderada das placas de Peyer (3/3) (Figura 6), leve evidenciação dos vasos linfáticos do mesentério (2/3), ulcerações focais de aproximadamente 1 cm na base da língua (1/3), pontos brancos multifocais na superfície cortical dos rins direito e esquerdo (1/3) (Figura 7), pequenas ulcerações nas placas de Peyer e atrofia de timo (1/3).

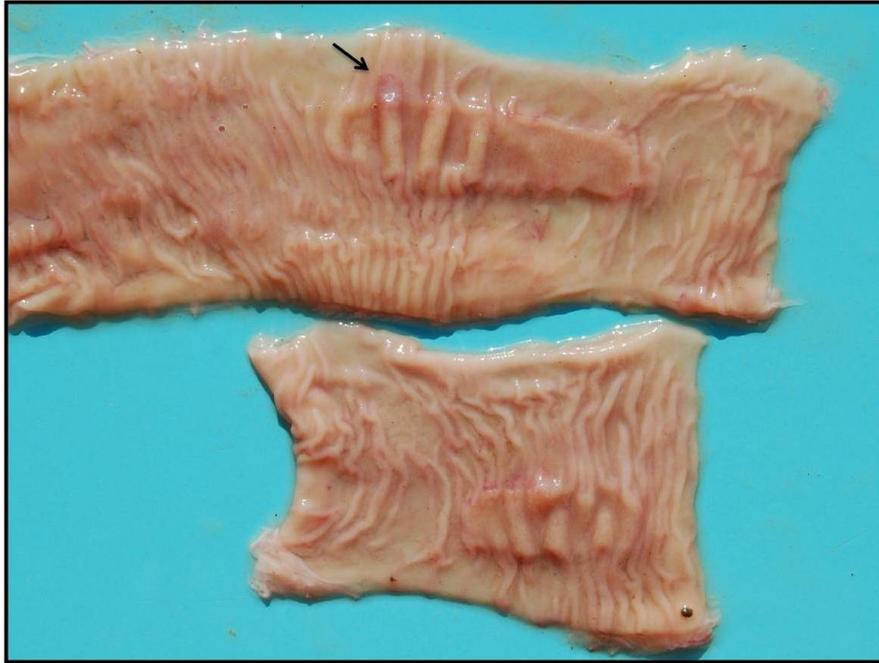


Figura 6- Bovino, N 979/09, jejuno. Placas de Peyer evidentes na mucosa do intestino delgado, área focal de ulceração delimitada por halo hiperêmico (seta).



Figura 7- Bovino, N 979/09, rim. Múltiplos pontos brancos medindo de 0,1 a 0,5 cm na superfície cortical do rim.

As alterações microscópicas consistiam de infiltrado inflamatório mononuclear leve a acentuado no intestino delgado (3/3) e dilatações de vasos lacteais (2/3) (Figura 8 A), depleção linfóide e infiltrado de histiócitos leve a moderado em linfonodos, tonsila e

placas de Peyer (3/3), necrose de do epitélio de vilosidades (1/3) (Figura 8 B), ulceração focal moderada do epitélio da língua com infiltrado de neutrófilos (1/3), infiltrado mononuclear intersticial multifocal moderado nos rins (1/3) e metaplasia leve do epitélio de brônquios (1/3)

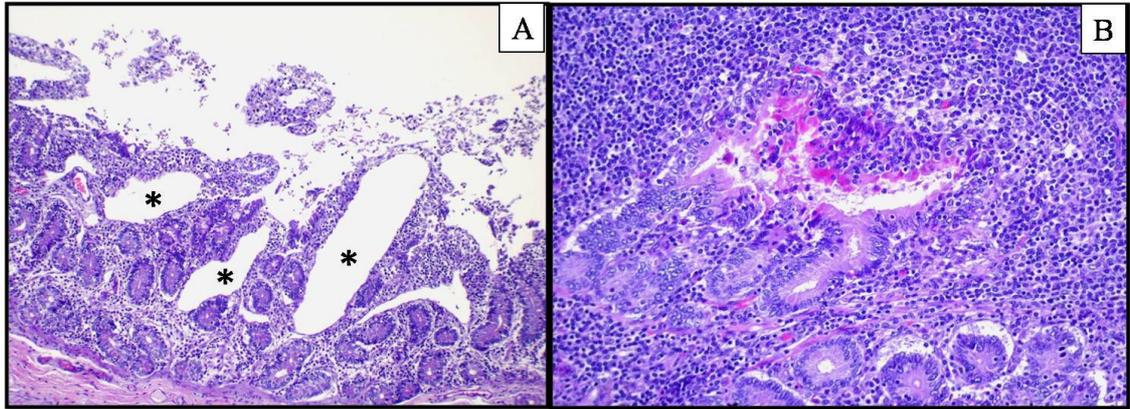


Figura 8- Bovino, N 979/09, jejuno. **A.** Infiltrado mononuclear difuso moderado na lâmina própria e dilatação dos vasos lacteais (asteriscos). HE, obj. 10. **B.** Placa de Peyer (Figura 6) com moderado infiltrado de histiócitos e necrose do epitélio das vilosidades. HE, obj.20.

O cultivo bacteriológico aeróbio e a pesquisa de ovos e oócitos nas fezes não apresentaram resultados significativos.

4.3 Avaliação histológica dos olhos dos animais com catarata

As lesões oculares eram restritas ao cristalino. Neste notou-se arranjo irregular das fibras do cristalino, com foco discreto de mineralização, tumefação e vacuolizações destas fibras (Figura 9), além de ocasionais glóbulos eosinofílicos, conhecidos como glóbulos de Morgagni. Estas lesões degenerativas eram localizadas predominantemente no região cortical.

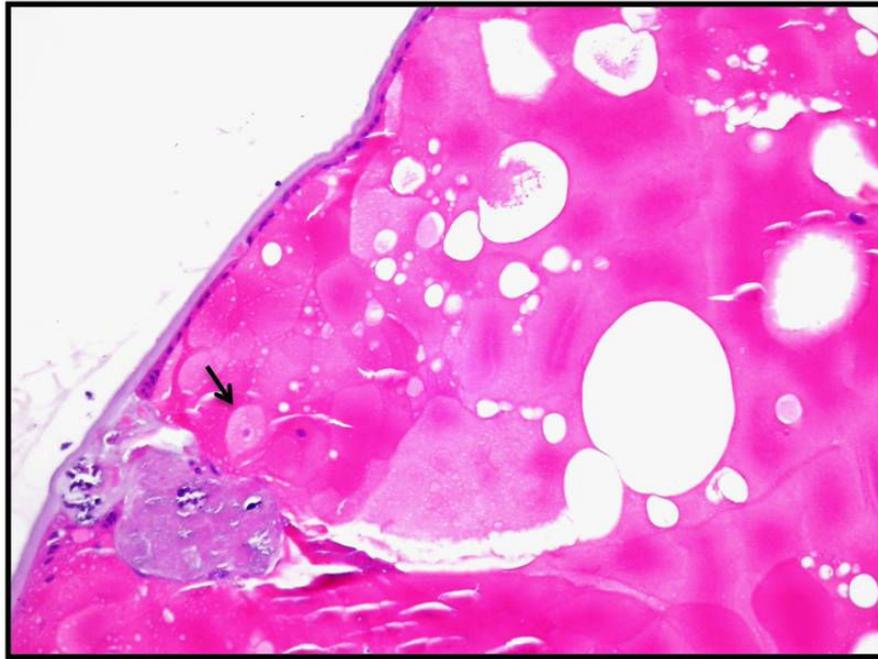


Figura 9- Bovino, N 163/08, cristalino. Vacuolizações multifocais e tumefação (seta) de fibras da camada cortical. HE, obj. 20.

4.4 Avaliação imuno-histoquímica

Na tabela 3 estão resumidas as marcações imuno-histoquímicas encontradas nos 5 animais PI analisados.

Tabela 3- Distribuição e quantificação da marcação imuno-histoquímica em órgãos coletados de 5 animais PI diagnosticados em propriedade do Município de Viamão, RS, no período de novembro de 2007 a maio de 2009.

Órgãos	N1093/07	N163/08	N531/08	N407/08	N979/09
Orelha/pele	+++	+++	+++	+++	+++
Olho	NC	+	+	+	+
C.frontal	+++	+++	+++	+++	+++
Tálamo	+++	+++	+++	+++	+++
Hipocampo	++	++	++	++	++
Cerebelo	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Óbex	-	-	-	-	-
M. cervical	NC	-	NC	-	-
M. torácica	NC	-	NC	-	-
M. lombar	NC	-	NC	-	-
Gâng. trig.	-	-	-	-	-
Tireoide	NC	+++	+++	+++	+++
Gld subm	NC	NC	NC	NC	(+)
Adrenal	NC	NC	NC	NC	(+)
Baço	++	++	+	+	++
Tonsila	NC	++	NC	++	++
LN mesent.	+++	+++	+++	+++	+++
LN mediast	NC	NC	NC	NC	+++
LN subm.	NC	NC	NC	NC	+++
LN hepát.	NC	NC	NC	NC	+++
Timo	NC	+	(+)	++	++
Traqueia	NC	NC	NC	+	+
Língua	NC	+	+	+	+
Pulmão	+	+	+	+	+

Órgãos	N1093/07	N163/08	N531/08	N407/08	N979/09
Esôfago	NC	(+)	(+)	(+)	(+)
Rúmen	+	+	+	+	+
Retículo	+	+	+	+	+
Omaso	+	+	+	+	+
Abomaso	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Duodeno	++	NC	NC	++	++
Jejuno	++	++	++	++	++
Íleo	++	++	++	++	++
Ceco	++	NC	NC	+	+
Cólon esp.	+	NC	NC	+	+
Reto	+	NC	NC	(+)	+
<i>Rete mirabile</i>	-	-	-	-	-
Rim	++	+++	++	++	+++
Ducto def.	NC	NC	NC	NC	+++
Med. Óssea	NC	NC	NC	-	-

NC (não coletado), - (ausência de marcação), (+) (marcação imuno-histoquímica discreta), + (marcação imuno-histoquímica leve), ++ (marcação imuno-histoquímica moderada), +++ (marcação imuno-histoquímica acentuada), C. frontal (córtex frontal), M. cervical (medula cervical), M. torácica (medula torácica), M. lombar (medula lombar), Gâng. trig. (gânglio trigeminal), Gld. Subm (glândula submandibular), LN mesent. (linfonodo mesentérico), LN mediast. (linfonodo mediastínico), LN subm. (linfonodo submandibular), LN hepát. (linfonodo hepático), Cólon esp. (cólon espiral), Duct. def (ducto deferente), Med. Óssea (Medula óssea).

As marcações positivas no córtex, hipocampo e tálamo foram mais evidentes no citoplasma de neurônios (Figura 10A) e em menor proporção, em células endoteliais dos capilares e em células da micróglia (Figura 10B).

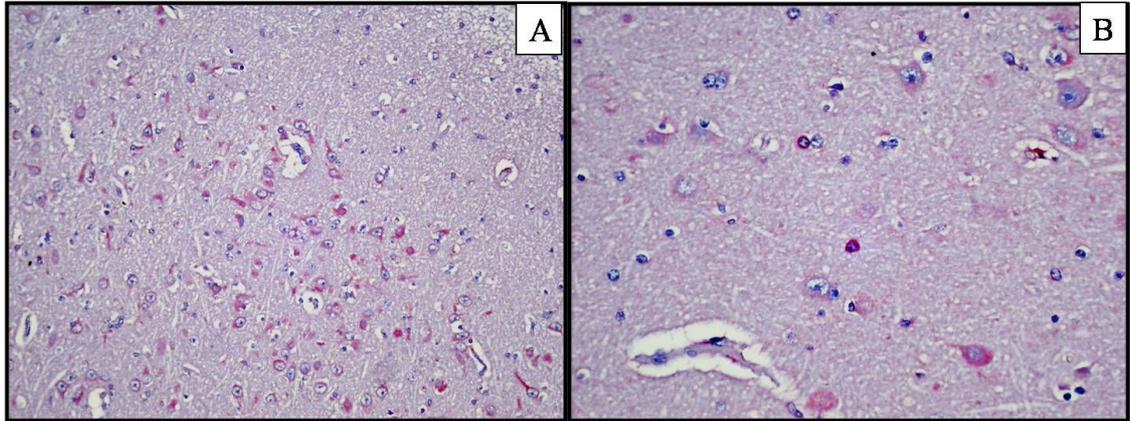


Figura 10- Bovino, N 407/08, tálamo, IHQ anti-BVDV. A. Marcação positiva de coloração vermelha difusa acentuada do citoplasma de neurônios. Obj. 20. **B.** Marcação vermelha acentuada no citoplasma de neurônios, com marcação ocasional de astrócitos e células endoteliais. Obj. 40.

No cerebelo, discreta marcação foi observada em neurônios de Golgi e em células endoteliais.

A identificação do vírus no olho ocorreu na membrana externa limitante, em células da camada nuclear interna e nas células ganglionares da retina (Figura 11A, B). No epitélio escamoso da córnea, nas fibras nervosas da *lamina cribrosa* da esclera e em fibras do nervo óptico (Figura 12A, B).

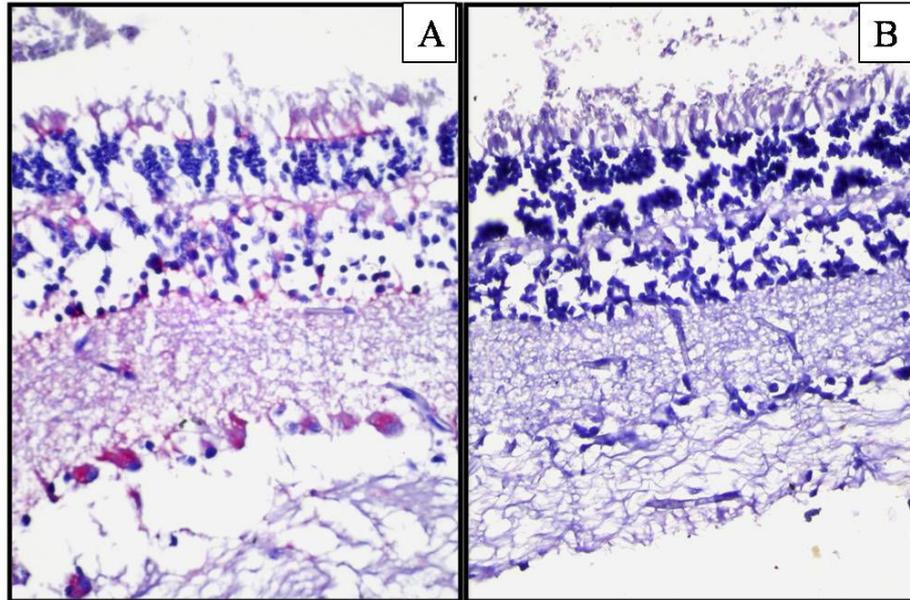


Figura 11- Bovino, N 979/09, retina, IHQ anti-BVDV, obj. 40. A. De cima para baixo, marcação positiva de coloração vermelha na membrana limitante, em células da camada nuclear interna e em células ganglionares. **B.** Controle negativo.

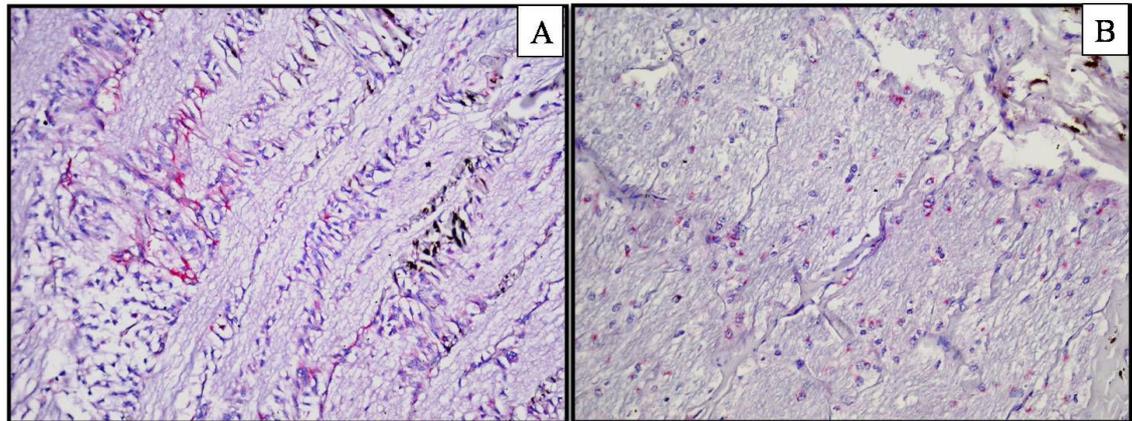


Figura 12- Bovino, N 979/09, IHQ anti-BVDV, obj. 40. A. Esclera apresentando marcação positiva de coloração vermelha em fibras nervosas da *lamina cribrosa*. **B.** Marcação positiva também em fibras do nervo óptico.

Nos órgãos linfoides a marcação era predominantemente em histiócitos, linfócitos (Figura 13 A, B) e no córtex no timo. Nos linfonodos, linfócitos e histiócitos dos cordões medulares encontravam-se fortemente marcados.

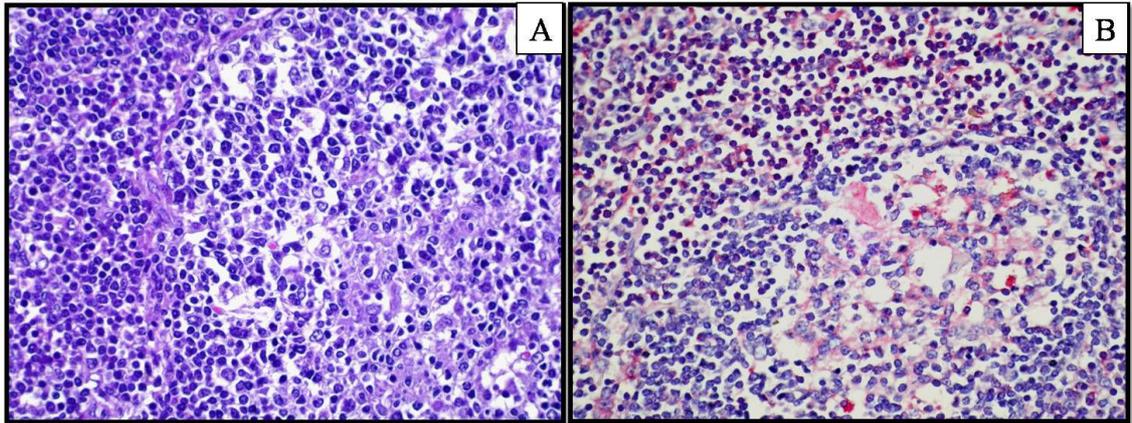


Figura 13- Bovino, N 407/08, linfonodo mesentérico. A. Rarefação linfoide no centro folicular e infiltrado de histiócitos. HE, obj. 40. **B.** Marcação positiva vermelha no citoplasma predominantemente de histiócitos do centro linfoide e em linfócitos do espaço interfollicular. IHQ anti-BVDV, obj. 40.

No aparelho digestivo as células marcadas consistiam de células basais do epitélio e em células mononucleares da submucosa da língua, esôfago, rúmen, retículo e omaso. Observou-se ainda, discreta marcação na camada basal das células parietais do abomaso. A marcação do intestino ocorreu principalmente em histiócitos dos tecidos linfoides agregados e em linfócitos da lâmina própria.

No sistema respiratório nas células do epitélio da traqueia, brônquios e bronquíolos, além de ocasionais marcações em histiócitos nos tecido linfoides agregados a brônquios e bronquíolos, e em células epiteliais descamadas (Figura 14 A, B). Marcações multifocais foram observadas em pneumócitos tipo II.

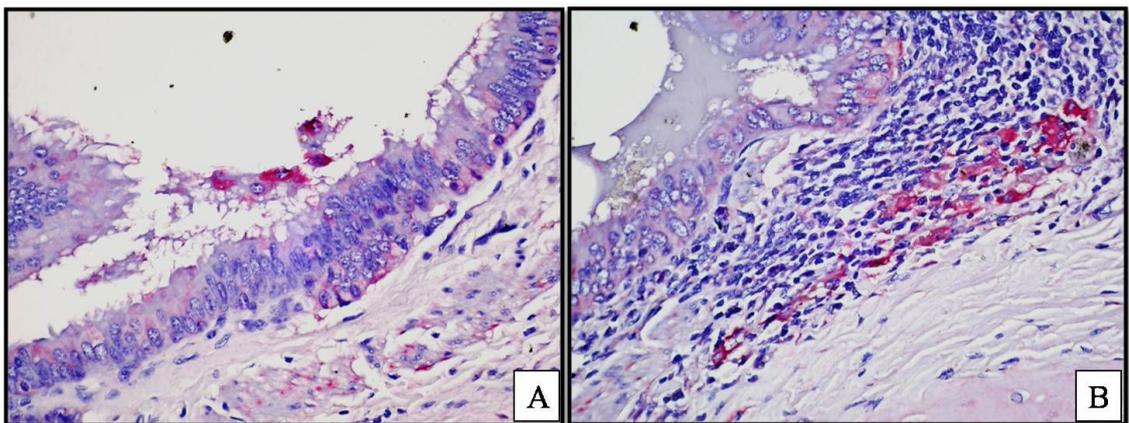


Figura 14- Bovino, N 979/09, IHQ anti-BVDV, brônquio, obj. 40. A. Marcação positiva avermelhada no epitélio e em células descamadas na luz do brônquio. **B.** Marcação positiva avermelhada em histiócitos no tecido linfoide agregado.

A marcação de orelha e pele incluía os queratinócitos da epiderme, células dendríticas da derme e o epitélio dos folículos pilosos (Figura 15).

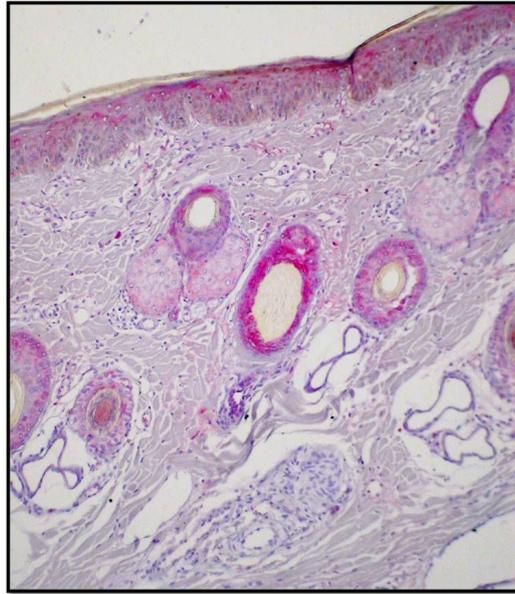


Figura 15- Bovino, N 407/09 orelha, IHQ, obj. 20. Marcação positiva avermelhada difusa em queratinócitos da epiderme, folículos pilosos e em células dendríticas da derme.

No rim identificou-se marcação multifocal em túbulos renais e difusa na pelve. No ducto deferente as células epiteliais estavam fortemente marcadas. Dos órgãos do sistema endócrino avaliados, a tireoide apresentou acentuada marcação nas células foliculares.

4.4 Sorologia pelo ELISA

Neste trabalho, o valor de S/P (relação positiva) correspondeu à relação da densidade óptica das amostras corrigidas por densidade óptica dos controles internos do teste. Portanto, o ponto de corte do teste foi 0,2 S/P, valores abaixo foram considerados negativos, valores entre 0,2 e 0,3 S/P considerados suspeitos e valores acima de 0,3 S/P considerados positivos para presença de anticorpos para BVDV.

Dos soros analisados em 2008, 16,67% (5/30) foram negativos, 10% (3/30) suspeitos e 73,33% (22/30) positivos. Das amostras de 2009, 13,33% (4/30) considerados negativos, 3,33 % (1/30) suspeitos e 83,33% (25/30) positivos. A distribuição dos níveis de anticorpos nas amostras de animais testados no ELISA em 2008 e 2009 encontra-se na Figura 16.

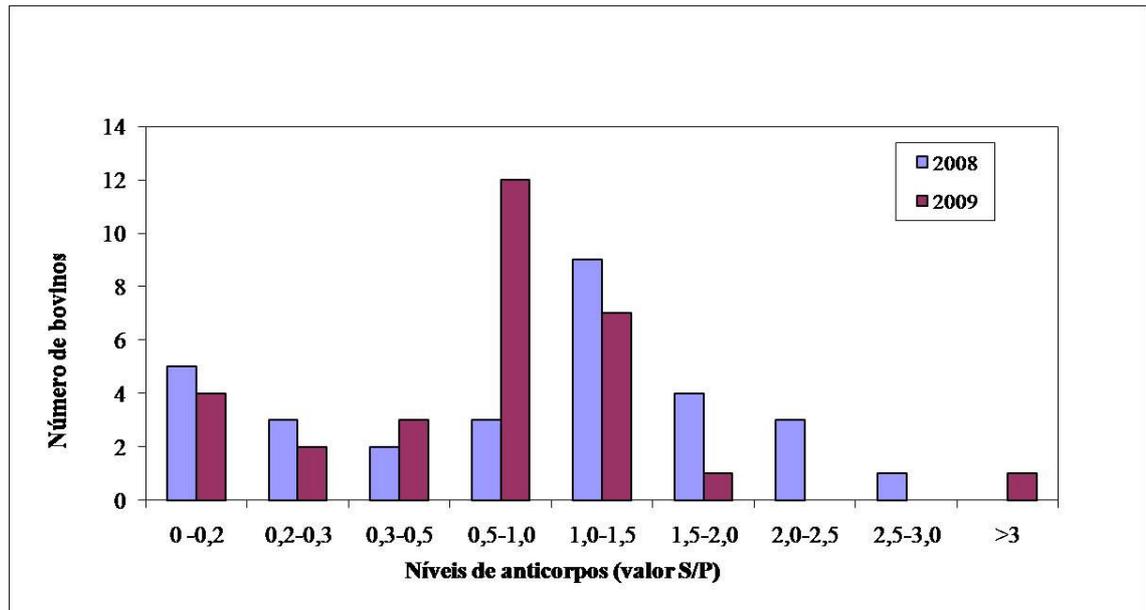


Figura 16- Anticorpos contra vírus da diarreia viral bovina (BVDV) em amostras individuais de bezerros com idade de 2-3 meses dos anos de 2008 e 2009, medidos em ELISA BVDV (IDEXX, Suíça).

4.5-Sequenciamento e análise filogenética

A análise das sequências demonstrou que os isolados eram classificados como BVDV-2. Os produtos de amplificação de fragmento da região 5'UTR do genoma viral apresentaram 100% de homologia entre si (Figura 17).

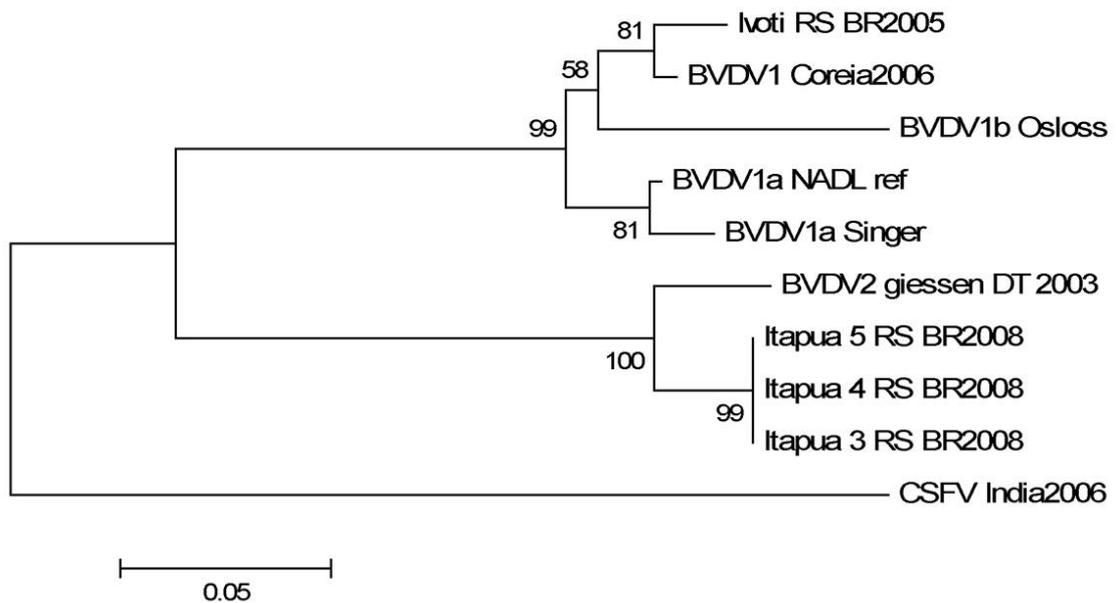


Figura 17- Análise filogenética de fragmento de 233 nucleotídeos da região 5' não traduzida (5'UTR) de isolados de BVDV Itapua RS 3, 4 e 5. Os números indicam a percentagem de 1000 replicatas de *bootstrap* que suportam cada ramo filogenético. A árvore foi preparada usando programa ClustalW e baseada no método *Neighbor-joining* parâmetro Kimura dois. O alinhamento múltiplo foi realizado em programa MEGA V.4. As sequências consultadas no GenBank possuem os seguintes números de acesso: BVDV1Coreia2006 (DQ973180), BVDV1b Osloss (AY279528), BVDV1a NADL ref (AF039181), BVDV1a Singer (L32875), BVDV2 Giessen (AY379547), CSFV Índia 2006 (EF026755). A identidade das sequências de amplicon do RT-PCR foi verificada com sequências depositadas no banco de dados GenBank usando programa BLAST.

4.6 Medidas adotadas após o diagnóstico de infecção pelo BVDV-2

Algumas medidas de controle foram efetuadas na propriedade pelo veterinário responsável. A compra de novilhas para reposição foi suspensa. As vacas e novilhas passaram a ser vacinadas com vacina inativada contendo amostras de BVDV-1 e BVDV-2, em três doses anuais. De acordo com o veterinário, após o período de 2008 houve uma melhora significativa nos índices reprodutivos do rebanho.

5. DISCUSSÃO

O diagnóstico de infecção persistente pelo BVDV-2 ncp bem como o estudo de sua distribuição no animal infectado, foram possíveis devido ao isolamento viral em cultivo celular, à RT-PCR seguida do sequenciamento do RNA amplificado e identificação do vírus pela marcação imuno-histoquímica em cortes histológicos.

De acordo com outros autores, em rebanhos categorizados como positivos, o segundo passo a ser realizado consiste na identificação e eliminação de animais PI. Sendo esta ação, a peça-chave no controle e prevenção de infecções fetais que resultem no nascimento de outros bezerros PI que irão manter o vírus no rebanho (GREISER-WILKE; GRUMMER; MOENNIG, 2003; GROOMS, 2004). Para a detecção destes animais, métodos de triagem utilizados neste trabalho corroboram com Laureyns; Ribbens; Kruif (2009), onde se preconiza o uso de testes de triagem sensíveis como a RT-PCR juntamente com testes específicos, como o isolamento viral e a imuno-histoquímica. Com realizações de novos testes após um ano da retirada de cada animal PI (PRESI; HEIM, 2009).

Segundo Houe (1999), em propriedades onde há animais PI com idade superior a 3-4 meses, geralmente mais de 90% do rebanho é soropositivo. Entretanto, as soroprevalências encontradas no seguinte trabalho, nos anos de 2008 e 2009, de 73, 33% e 83, 33% respectivamente, apesar de serem altas possuem pouco valor diagnóstico. Pois, estas amostras foram coletadas de animais com 2-3 meses de idade que ainda possuem anticorpos maternos. Estes dados refletem a resposta sorológica das mães destes bezerros à exposição viral por vacinas ou animais infectados. Deve-se considerar também que o teste sorológico pelo método de ELISA não diferencia resposta imunológica ao BVDV-1 da resposta ao BVDV-2 (SALIKI; DUBOVI, 2004).

O isolamento viral apesar de ser um teste mais laborioso, foi importante para a classificação dos vírus isolados como ncp. Este biotipo é frequentemente isolado de amostras de campo e tem a habilidade de atravessar a barreira placentária causando infecção fetal (DEREGT; LOEWEN, 1995; CHARLESTON *et al.*, 2001). Quando esta infecção ocorre entre 40 e 120 dias de gestação, o feto reconhece o vírus como próprio durante a ontogênese e tornam-se PI por toda a vida, excretando altos títulos virais no rebanho (MCCLURKIN *et al.*, 1984; LIEBLER-TENORIO, 2005; RIDPATH, FLORES, 2007).

A técnica de RT-PCR se mostrou rápida e bastante sensível, identificando todos os animais também positivos no isolamento viral em cultivo de células e na imunohistoquímica, como citado por Deregt *et al.* (2002). Adicionalmente, a utilização deste teste a partir de *pools* de soros pode ser utilizada para redução nos custos dos testes diagnósticos e como método de triagem na detecção de animais PI menores de 6 meses de idade, por não sofrer interferência de anticorpos maternos (PLIZ *et al.*, 2007). Através do sequenciamento e análise filogenética das amostras amplificadas a partir do RT-PCR identificou-se o BVDV-2 como agente etiológico dos 6 casos de infecções persistentes na propriedade.

A IHQ de biópsias de orelha tem ganhado aplicação importante na investigação de animais PI em rebanhos bovinos (NJAA *et al.*, 2000; GROOMS, KEILEN, 2002; RIDPATH *et al.*, 2002; BRODERSEN, 2004). Como também verificado por Miller *et al.* (2005), neste trabalho a coleta das amostras se mostrou rápida e fácil de ser executada. Assim como a RT-PCR, essa técnica pôde ser empregada em animais de qualquer idade, pois não sofre interferência de anticorpos colostrais (CORNISH *et al.*, 2006; HILBE *et al.*, 2007).

A prevalência de 0,46% (6/1300) de animais PI, no rebanho estudado se adequou ao intervalo de 0,1 a 84% citado na literatura (FLORES *et al.*, 2005; LONERAGAN *et al.*, 2005; VAN CAMPEN, 2009; FULTON *et al.*, 2009b). Relatos de múltiplos animais PI em rebanhos de gado de corte já foram descritos por outros autores (WITTUM *et al.*, 2001), sugere-se que a geração de animais PI não é uma manifestação clínica rara da infecção pelo BVDV. Neste estudo não foi possível realização de testes de triagem em todas as categorias animais da propriedade. A decisão de iniciar a triagem pelos animais com idade entre 2-3 meses se deve ao grande número de bezerros subdesenvolvidos e com catarata congênita observados nesta categoria no início do estudo. Assim, a existência de outros animais PI e sua permanência no rebanho não pode ser descartada.

Os principais sinais clínicos associados à infecção do BVDV-2 nesta propriedade são semelhantes aos relatados em infecções por diferentes genótipos de BVDV (GOENS, 2002; POTIGIETER, 2004; GROOMS, 2006; RIDPATH; FLORES, 2007), e incluem problemas reprodutivos, nascimento de bezerros fracos e com baixo desenvolvimento.

Outros isolados de BVDV-2 já foram descritos em propriedades com problemas reprodutivos no Brasil (FLORES *et al.*, 2005). A presença de animais PI pelo BVDV-2

na propriedade em análise, associada aos baixos índices reprodutivos mencionados pelo veterinário, demonstra que a vacina inativada contra o BVDV-1 utilizada antes no período de cobertura não se mostrou eficaz na proteção contra o isolado de campo. Isto se deve principalmente, a grande variação antigênica existente entre os vários isolados de BVDV (RIDPATH; BOLIN; DUBOVI, 1994; HAMMERS *et al.*, 2001; KELLING, 2004; KAPIL *et al.*, 2005).

A ocorrência de dermatite digital acompanhada de formações de crostas nas narinas com secreções ocular e nasal, é descrita por alguns autores como consequência da forma crônica da DM (EVERMANN; BARRINGTON, 2005; SCHMITZ, 2006; FERREIRA *et al.*, 2008). Apesar da semelhança entre as lesões macroscópicas e histológicas com estes relatos, o caso observado no presente estudo não pode ser correlacionado a DM, visto que somente o biotipo viral ncp foi isolado de cultivos celulares (POTIGIETER, 2004; RIDPATH; FLORES, 2007).

A maioria dos animais PI morre nos primeiros meses de vida por infecções secundárias ou pela DM (RIDPATH; FLORES, 2007). A babesiose cerebral diagnosticada no animal N 163/08 e as mortes naturais dos outros PI podem estar correlacionadas à imunossupressão induzida pelo BVDV nestes animais, que de acordo com Ridpath; Flores (2007), pode favorecer infecções secundárias. Entretanto, nos casos de morte natural nenhum microrganismo capaz de estabelecer coinfeção foi isolado.

Os parâmetros normais observados no leucograma realizado em 3 animais devem ser interpretados com ressalva. Kapil *et al.* (2005) constataram que em animais PI, diferentemente do que ocorre na infecção aguda, a imunossupressão é induzida principalmente por alterações nas funções de linfócitos, macrófagos e neutrófilos, mesmo que não haja diminuição na população linfóide circulante.

A opacidade de cristalino congênita em animais infectados pelo BVDV já foi descrita por outros autores (SCOTT *et al.*, 1973; EVERMANN; BARRINGTON, 2005; GROOMS, 2006), e possivelmente está associada à infecção do feto entre os 100 e 150 dias de gestação, ou seja, na fase final da organogênese (EVERMANN; BARRINGTON, 2005). A marcação pela IHQ na retina, esclera, córnea e nervo óptico indica a presença de antígenos virais nestes tecidos, mas não confirma que o vírus tenha causado alterações *in utero*. A observação de lesões degenerativas no cristalino de dois animais cegos é semelhante à descrita por Ushigusa *et al.* (2000) em um estudo patológico das desordens oculares de bovinos no Japão. Neste estudo o autor destaca

que estas alterações podem estar relacionadas à infecção congênita por vírus teratogênicos como o BVDV, Akabane e Aino, ou a genes autossômicos recessivos ou ainda a distúrbios nutricionais. Dentre as causas virais, o BVDV é a única associado com malformações no Brasil (SCHMITZ, 2006; PAVARINI *et al.*, 2008), entretanto outras possíveis causas de catarata devem ser investigadas.

Os achados de necropsia como evidenciação das placas de Peyer, aumento dos linfonodos mesentéricos e pontos brancos na superfície cortical são semelhantes aos encontrado por Liebler-Tenorio; Ridpath; Neill (2003) em estudo experimental com uma cepa de BVDV-2 ncp de baixa virulência. Úlceras na cavidade oral, como as observadas em dois animais, também são citadas como lesões macroscópicas encontrada em animais PI (SHIN; ACLAND, 2001).

No exame histopatológico e imuno-histoquímico desses animais as principais alterações e marcações encontradas também são citadas por outros autores (LIEBLER-TENORIO; RIDPATH; NEILL, 2003; POTGIETER, 2004; SCHMITZ, 2006). O vírus foi detectado, predominantemente em células linfoides e epiteliais de diversos órgãos, como descrito por Shin; Acland (2001). Como observado por Liebler-Tenorio (2005) não houve correlação entre quantidade de antígeno viral e local das lesões histológicas. A marcação em folículos pilosos, células dendríticas e em queratinócitos da epiderme encontrada na pele e orelha dos animais deste trabalho são características dos animais PIs (NJAA *et al.*, 2000; BRODERSEN, 2004; SCHMITZ, 2006).

O neurotropismo do BVDV pôde ser observado na marcação antigênica no citoplasma de neurônios do sistema nervoso central, com predileção pelo córtex cerebral e hipocampo e na marcação de neurônios de Golgi da camada granular do cerebelo, confirmando os resultados obtidos por Hewicker *et al.* (1990). Adicionalmente, neste trabalho verificou-se também marcação leve de células da glia e em células endoteliais dos capilares, semelhante ao encontrado por Schmitz (2006).

O epitélio folicular da tireoide apresentou marcação positiva acentuada nos 4 animais em que se analisou este tecido. De acordo com Larsson *et al.* (1995) a replicação viral nas células foliculares de tireoide pode interferir na síntese e secreção dos hormônios tireoidianos, causando retardo no crescimento destes animais quando comparados a animais sadios.

As marcações acentuadas predominantemente em histiócitos e em alguns linfócitos nos sinusoides e centrofolicular dos linfonodos e na cortical do timo também

foram demonstradas por Liebler-Tenorio; Ridpath; Neill (2003), confirmando a predileção do vírus por células do tecido linfoide.

As medidas de biossegurança têm por objetivo prevenir a exposição do rebanho ao BVDV, desta forma todos os fatores de riscos associados a cada propriedade devem ser cuidadosamente estudados (PRESI; HEIM, 2009). Neste caso, a detecção e eliminação do PI e a suspensão da compra de novilhas de reposição auxiliaram na redução destes fatores de risco. A alteração na vacina utilizada ajuda a diminuir o risco de novilhas que ainda não tiveram contato com o vírus de contrair a infecção durante a gestação, diminuindo principalmente o risco de nascimento de novos PI (LAUREYNS; RIBBENS; KRUIF, 2009).

Em coletas futuras poderá ser feito o *spot test* previamente ao teste de triagem. Este teste consiste na sorologia de um pequeno número de animais com idade superior a 6 meses. Segundo HOUE (1999) em rebanhos vacinados por vacina inativada o título de anticorpos será significativamente maior em rebanhos com animais PI quando comparados a rebanhos sem animais PI. Desta forma, a alta titulação de anticorpos em pelo menos 3 amostras de cada 5 coletadas de animais com idade acima de 6 meses, indica que estes animais foram expostos ao BVDV, sugerindo a presença do PI nesta categoria.

6. CONCLUSÕES

Neste trabalho identificou-se a infecção persistente pelo BVDV-2 ncp em 1 animal com 2 anos de idade e em 5 com idade entre 2-3 meses. Totalizando 0,46% (6/1300) dos animais de uma propriedade de gado de corte no Município de Viamão, RS. Porém, esta porcentagem pode estar subestimada em virtude da não realização de métodos de triagem em outras categorias animais da propriedade.

A RT-PCR em *pools* de soro se mostrou sensível no diagnóstico de animais persistentemente infectados e em conjunto com a IHQ em biópsias de orelha podem ser utilizadas como método de diagnóstico de infecções persistentes em rebanhos.

Diferentemente da sorologia, a IHQ e a RT-PCR podem ser realizadas em animais com idade inferior a 6 meses, não sofrendo interferência de anticorpos colostrais.

A vacina contra BVDV-1 não foi capaz de promover a proteção fetal durante a exposição da fêmea prenhe ao BVDV-2, ocasionando falhas reprodutivas e nascimento de animais persistentemente infectados.

Nascimento de bezerros fracos e grande número de animais com retardo no desenvolvimento foram os principais sinais clínicos encontrados na infecção pelo BVDV-2 ncp nesta propriedade.

Não se diagnosticou a etiologia da opacidade de cristalino congênita observada nesta propriedade. Entretanto, o BVDV não pode ser descartado do diagnóstico diferencial de propriedades com este problema.

Os achados de necropsia observados nos 5 animais persistentemente infectados pelo BVDV-2 foram aumento de linfonodos mesentéricos e evidência das placas de Peyer no intestino delgado.

A pododermatite verificada em um animal não estava associada à superinfecção por amostra homóloga cp, ou seja, não se tratava de um caso de doença das mucosas. E as lesões de pele encontradas neste animal podem ser consequentes da replicação viral em células epiteliais.

Infiltrado mononuclear na lâmina própria principalmente do intestino delgado e rarefação linfoide com infiltrado histiocitário nos centrofoliculares de linfonodos e nas placas de Peyer foram comuns aos cinco animais analisados.

A demonstração do antígeno viral nos 5 animais avaliados ocorreu principalmente em: queratinócitos da epiderme, no epitélio de folículos pilosos e células mononucleares da derme de orelhas e pele; histiócitos e, em menor proporção, em linfócitos dos linfonodos; células foliculares da tireoide; no citoplasma de neurônios e em menor escala, em células da glia no córtex cerebral e no hipocampo.

Novas coletas deverão ser efetuadas em animais nascidos no ano de 2010, para identificação de possíveis animais persistentemente infectados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARCHAMBAULT, D. *et al.* Clinical response and immunomodulation following experimental challenge of calves with type 2 noncytopathogenic bovine viral diarrhoea virus. **Veterinary Research**, v. 31, n. 2, p. 215-227, 2000.

ARCHBALD, L.F. *et al.* Effects of intrauterine inoculation of bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus on uterine tubes and uterus of nonpregnant cows. **American Journal of Veterinary Research**, v. 34, n. 9, p. 1133-1137, 1973.

ARENHART S. *et al.* Proteção fetal contra o vírus da diarréia viral bovina (BVDV) em vacas prenhes previamente imunizadas com uma vacina experimental atenuada. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 10, p. 461-470, 2008.

ARENHART, S. *et al.* Excreção e transmissão do vírus da diarréia viral bovina por bezerros persistentemente infectados. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 9, p. 736-74, 2009.

BAULE, C. *et al.* Pathogenesis of primary respiratory disease induced by isolates from a new genetic cluster of bovine viral diarrhoea virus type I. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 146-153, 2001.

BELKNAP, E.B. *et al.* Bovine viral diarrhoea virus in New World camelids. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 12, n. 6, p. 568-570, 2000.

BIELEFELD-OHMANN, H. Pathogenesis of bovine viral diarrhoea-mucosal disease: distribution and significance of BVDV antigen in diseased calves. **Research in Veterinary Science**, v. 34, n. 1, p. 5-10, 1983.

BOLIN, S.R.; GROOMS, D.L. Origination and consequences of bovine viral diarrhoea virus diversity. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 20, n. 1, p. 51-68. 2004.

BOLIN, S.R.; RIDPATH, J.F. Differences in virulence between two noncytopathic bovine viral diarrhoea viruses in calves. **American Journal of Veterinary Research**, v. 53, n. 11, p. 2157-2163, 1992.

BOOKER, C.W. *et al.* The effect of bovine viral diarrhoea virus infections on health and performance of feedlot cattle. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 49, n. 3, p. 253-260, 2008.

BROCK, K.V.; GROOMS, D.L.; GIVENS, M.D. Reproductive Disease and Persistent Infections. In: GOYAL, S.M.; RIDPATH, J.F. (Eds) *Bovine Viral Diarrhea Virus: Diagnosis, management and control*. Iowa: Blackwell Publishing, 2005, cap. 8, p. 145-156.

BRODERSEN, B.W. Immunohistochemistry used as a screening method for persistent bovine viral diarrhea virus infection. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 20, n. 1, p. 85-93, 2004.

BROWN, T.T. *et al.* Virus induced congenital anomalies of the bovine fetus. II. Histopathology of cerebellar degeneration (hypoplasia) induced by the virus of bovine viral diarrhea-mucosal disease. **The Veterinary Record**, v. 63, n. 4, p. 561-578, 1973.

BYERS, S.R. *et al.* Disseminated Bovine viral diarrhea virus in a persistently infected alpaca (*Vicugna pacos*) cria. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 21, n. 1, p. 145-148, 2009.

CARMAN, S. *et al.* Bovine viral diarrhea virus in alpaca: abortion and persistent infection. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 17, n. 6, p. 589-593, 2005.

CHARLESTON, M.D. *et al.* Establishment of persistent infection with non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus in cattle is associated with a failure to induce type I interferon. **Journal of General Virology**, v. 82, n. 8, p. 1893-1897, 2001.

CHASE, C.C.L.; ELMOWALID, G.; YOUSIF, A.A.A. The immune response to bovine viral diarrhea virus: a constantly changing picture. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 20, n. 1, p. 95-114, 2004.

CORNISH, T.E. *et al.* Comparison of ear notch immunohistochemistry, ear notch antigen-capture ELISA, and buffy coat virus isolation for detection of calves persistently infected with bovine viral diarrhea virus. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 17, n. 2, p. 110-117, 2005.

CORTESE, V.S. *et al.* Protection of pregnant cattle and their fetuses against infection with bovine viral diarrhea virus type 1 by use of a modified-live virus vaccine. **American Journal of Veterinary Research**, v. 59, n. 11, p. 1409-1413, 1998.

CORTEZ, A. *et al.* Genetic characterization of Brazilian bovine viral diarrhoea virus isolates by partial nucleotide sequencing of 5'-UTR region. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n. 4, p. 211-216, 2006.

DEREGT, D. *et al.* A comparison of polymerase chain reaction with and without RNA extraction and virus isolation for detection of bovine viral diarrhoea virus in young cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 14, n. 5, p. 433-437, 2002.

DEREGT, D.; LOEWEN, K.G. Bovine viral diarrhoea virus: Biotypes and disease. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 36, n. 6, p. 371-378, 1995.

DIEGUEZ, F.J. *et al.* Effect of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection on dairy calf rearing. **Research in Veterinary Science**, v. 87, n. 1, p. 39-40, 2009.

DRISKELL, E.A.; RIDPATH, J.F. A survey of bovine viral diarrhoea virus testing in diagnostic laboratories in the united states from 2004 to 2005. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 18, n. 6, p. 600-605, 2006.

DUNCAN, C. *et al.* Histopathologic and immunohistochemical findings in two white-tailed deer fawns persistently infected with Bovine viral diarrhoea virus. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 20, n. 3, p. 289-296, 2008.

EDMONDSON, M.A. *et al.* Comparison of tests for detection of bovine viral diarrhoea virus in diagnostic samples. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 19, n. 4, p. 376-381, 2007.

EVERMANN, J.F. Pestiviral infection of llamas and alpacas. **Small Ruminant Research**, v. 61, n. 2-3, p. 201-206, 2006.

EVERMANN, J.F.; RIDPATH, J.F. Clinical and epidemiologic observations of bovine viral diarrhoea virus in the northwestern of United States. **Veterinary Microbiology**, v. 89, n. 2-3, p. 129-139, 2002.

EVERMANN, J.F.; BARRINGTON, G.M. Clinical Features. In: GOYAL, S.M.; RIDPATH, J.F. (Eds) **Bovine Viral Diarrhoea Virus: Diagnosis, management and control**. :Iowa: Blackwell Publishing, 2005, cap. 6, p.105-129.

EZANNO, P.; FOURICHON, C.; SEEGER, H. Influence of herd structure and type of virus introduction on the spread of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) within a dairy herd. **Veterinary Research**, v. 39, n. 5, p. 39-51, 2008.

- FERREIRA, L.C.L, *et al.* Doença das mucosas associada à dermatite generalizada em bovinos, Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 6, p. 285-292, 2008.
- FLORES, E.F. *et al.* Infecção pelo vírus da diarreia viral bovina no Brasil – histórico, situação atual e perspectivas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, n. 3, p. 125-134, 2005.
- FLORES, E.F.; SCHUCH, L.F.D. Diarréia viral bovina. In: RIET-CORREA, F. *et al.* **Doenças de ruminantes e eqüídeos**, 3th Ed, Santa Maria: Pallotti, 2007, v. 1, p. 81-93.
- FREDRIKSEN, B. *et al.* Distribution of viral antigen in uterus, placenta and foetus of cattle persistently infected with bovine virus diarrhoea virus. **Veterinary Microbiology**, v. 64, n. 2-3, p. 109-122, 1999.
- FULTON, R.W. *et al.* Bovine viral diarrhea cytopathic and noncytopathic biotypes and type 1 and 2 genotypes in diagnostic laboratory accessions: clinical and necropsy samples from cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 12, n. 1, p. 33-38, 2000.
- FULTON, R.W. *et al.* Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) subgenotypes in diagnostic in laboratory accessions: Distribution of BVDV1a, 1b, e 2a subgenotypes. **Veterinary Microbiology**, v. 111, n. 1-2, p. 35-40, 2005.
- FULTON, R.W. *et al.* Lung pathology and infectious agents in fatal feedlot pneumonias and relationship with mortality, disease onset, and treatments. **The Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 21, n. 4, p. 467-477, 2009a.
- FULTON, R.W. *et al.* Prevalence of bovine viral diarrhea virus (BVDV) in persistently infected cattle and BVDV subtypes in affected cattle in beef herds in south central United States. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 73, n. 4, p.283-291, 2009b.
- FULTON, R.W. Vaccines. In: GOYAL, S.M; RIDPATH, J.F. (Eds) **Bovine Viral Diarrhea Virus: Diagnosis, management and control**. Iowa:Blackwell Publishing, 2005, cap. 13, p. 209-222.

- FULTON, R.W.; BURGE, L.J. Bovine viral diarrhoea virus types 1 and 2 antibody response in calves receiving modified live virus or inactivated vaccines. **Vaccine**, v. 19, n. 2-3, p. 264-274, 2000.
- GARD, J.A.; GIVENS, M.D.; STRINGFELLOW, D.A. Bovine viral diarrhoea virus (BVDV): Epidemiologic concerns relative to semen and embryos. **Theriogenology**, v. 68, n. 3, p. 434-442, 2007.
- GIVENS, M.D. *et al.* A. Epidemiology of prolonged testicular infection with bovine viral diarrhoea virus. **Veterinary Microbiology**, v. 139, n. 1-2, p. 42-51, 2009.
- GIVENS, M.D. Noncytopathic bovine viral diarrhoea virus can persist in testicular tissue after vaccination of peri-pubertal bulls but prevents subsequent infection. **Vaccine**, v. 25, n. 5, p. 867-876, 2007.
- GIVENS, M.D.; WALDROP, J.G. Bovine viral diarrhoea virus in embryo and semen production systems. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 20, n. 1, p. 21-38, 2004.
- GOENS, S.D. The evolution of bovine viral diarrhoea: a review. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 43, n. 12, p. 946-954, 2002.
- GOYAL, S.M. Diagnosis. In: Goyal, S.M & Ridpath, J.F. (Eds) **Bovine Viral Diarrhoea Virus: Diagnosis, management and control**. Iowa:Blackwell Publishing, 2005, cap. 12, p. 197-208.
- GREISER-WILKE, I.; GRUMMER, B., MOENNIG, V. Bovine viral diarrhoea eradication and control programmes in Europe. **Biologicals**, v. 31, n. 2, p. 113-118, 2003.
- GROOMS, D.L. Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhoea virus. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 20, n. 1, p. 5-19, 2004.
- GROOMS, D.L. Reproductive losses caused by bovine viral diarrhoea virus and leptospirosis. **Theriogenology**, v. 66, n. 3, p. 624-628, 2006.
- GROOMS, D.L.; KEILEN, E.D. Screening of neonatal calves for persistent infection with bovine viral diarrhoea virus by immunohistochemistry on skin biopsy samples. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, n. 4, p. 898-900, 2002.

GROOMS, D.L; BROCK, K.V.; WARD, L.A. Detection of bovine viral diarrhoea virus in the ovaries of cattle acutely infected with bovine viral diarrhoea virus. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 10, n. 2, p.125–129, 1998.

HAMMERS, C. *et al.* Diversity among bovine pestiviruses. **The Veterinary Journal**, v. 161, n. 2, p. 112-122, 2001.

HEFFERNAN, C. *et al.* Analysis of Pan-European attitudes to the eradication and control of bovine viral diarrhoea. **The Veterinary Record**, v. 164, n. 6, p. 163-167, 2009.

HEWICKER, M. *et al.* Immunohistological detection of bovine viral diarrhoea virus antigen in the central nervous system of persistently infected cattle using monoclonal antibodies. **Veterinary Microbiology**, v. 23, n. 1-4, p. 203-210, 1990.

HILBE, M. *et al.* Comparison of five diagnostic methods for detecting bovine viral diarrhoea virus infection in calves. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 19, n. 1, p. 28-34, 2007.

HOUE, H. Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections. **Veterinary Microbiology**, v. 64, n. 1-3, p. 89-107, 1999.

KAPIL, S. *et al.* Immunity and immunosuppression. In: GOYAL, S.M; RIDPATH, J.F. (Eds) **Bovine Viral Diarrhoea Virus: Diagnosis, management and control**. Iowa:Blackwell Publishing, 2005, cap. 9, p. 157-170.

KELLING, C.L. Evolution of Bovine Viral Diarrhoea Virus Vaccines. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 20, n. 1, p. 115-130, 2004.

KLEIBOEKER, S.B. *et al.* Evaluation of shedding of bovine herpesvirus 1, bovine viral diarrhoea virus 1, and bovine viral diarrhoea virus 2 after vaccination of calves with a multivalent modified-live virus vaccine. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 222, n. 10, p. 1399-403, 2003.

KUBOVICOVA, E. *et al.* Alteration in ultrastructural morphology of bovine embryos following subzonal microinjection of bovine diarrhoea virus (BVDV). **Zygote**, v. 16, n.3, p. 187-193, 2008.

LARSSON, B. *et al.* Serum concentrations of thyroid hormones in calves with a transient or persistent infection with bovine viral diarrhoea virus. **Research in Veterinary Science**, v. 58, n. 2, p. 186-89, 1995.

LAUREYNS, J.; RIBBENS, S.; KRUIF, A. Control of bovine virus diarrhoea at the herd level: Reducing the risk of false negatives in the detection of persistently infected cattle. 2009. Artigo aceito para publicação em **The Veterinary Journal**. (no prelo)

LEE, S.R. *et al.* Bovine viral diarrhoea virus infection affects the expression of proteins related to professional antigen presentation in bovine monocytes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1794, n. 1, p. 14-22, 2009.

LIEBLER-TENORIO, E.M. *et al.* Comparative investigation of tissue alterations and distribution of BVD-viral antigen in cattle with early onset versus late onset mucosal disease. **Veterinary Microbiology**, v. 77, n. 1-2, p. 163-174, 2000.

LIEBLER-TENORIO, E.M. *et al.* Distribution of antigen of noncytopathogenic and cytopathogenic bovine virus diarrhoea virus biotypes in the intestinal tract of calves following experimental production of mucosal disease. **Archives of Virology**, v. 3, p. 109-124, 1991.

LIEBLER-TENORIO, E.M., RIDPATH, J.F.; NEIL, J.D. Distribution of viral antigen and development of lesions after experimental infection with highly virulent bovine viral diarrhoea virus type 2 in calves. **American Journal of Veterinary Research**, v. 63, n. 11, p. 1575-1583, 2002.

LIEBLER-TENORIO, E.M.; RIDPATH, J.F.; NEIL, J.D. Distribution of viral antigen and tissue lesions in persistent and acute infection with the homologous strain of noncytopathic bovine viral diarrhoea virus. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 16, n. 5, p. 388-396, 2004.

LIEBLER-TENORIO, E.M.; RIDPATH, J.F.; NEILL, J.D. Distribution of viral antigen and development of lesions after experimental infection of calves with a BVDV 2 strain of low virulence. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 15, n. 3, p. 221-232, 2003.

LIEBLER-TENORIO. Classification and molecular biology. In: GOYAL, S.M & RIDPATH, J.F. (Eds) **Bovine Viral Diarrhoea Virus: Diagnosis, management and control**. Iowa:Blackwell Publishing, 2005, cap. 7, p. 121-144.

LINDBERG, A. *et al.* Indirect transmission of bovine viral diarrhoea virus at calving and during the postparturient period. **The Veterinary Record**, v. 152, n. 15, p. 463-467, 2004.

LIU, L. *et al.* C. Phylogeny, classification and evolutionary insights into pestiviruses. **Virology**, v. 385, n. 2, p. 351-357, 2009.

LONERAGAN, G.H. *et al.* Prevalence, outcome, and health consequences associated with persistent infection with bovine viral diarrhoea virus in feedlot cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 226, n. 4, p. 595-601, 2005.

LUNARDI, M. *et al.* Outbreak of acute bovine viral diarrhoea in Brazilian beef cattle: Clinicopathological findings and molecular characterization of a wild-type BVDV strain subtype 1b. **Research in Veterinary Science**, v. 83, n. 3, p. 599-604, 2008.

LUZZAGO, C. *et al.* A. A scoring system for risk assessment of the introduction and spread of bovine viral diarrhoea virus in dairy herds in Northern Italy. **The Veterinary Journal**, v. 177, n. 2, p. 236-241, 2008.

MARSHALL, D.J.; MOXLEY, R.A.; KELLING, C.L. Distribution of virus and viral antigen in specific pathogen-free calves following inoculation with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus. **Veterinary Pathology**, v. 33, n. 3, 1996.

MCCLURKIN, A.W. *et al.* Production of cattle immunotolerant to bovine viral diarrhoea virus. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 48, n.2, p.156-161, 1984.

MILLER, M.A. *et al.* Effects of delayed or prolonged fixation on immunohistochemical detection of bovine viral diarrhoea virus type 1 in skin of two persistently infected calves. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 17, n. 5, p. 461-463, 2005.

MONTEGOMERY, D.L. *et al.* The fetal brain in bovine viral diarrhoea virus-infected calves: lesions, distributions, and cellular heterogeneity of viral antigen at 190 days gestation. **Veterinary Pathology**, v. 45, n. 3, p. 288-296, 2008.

HOUE, H.; LINDBERG, A.; MOENNIG, V. BVD control in Europe: current status and perspectives. **Animal Health Research Reviews**, v. 6, n. 1, p. 63-74, 2005.

NJAA, B.L. *et al.* Diagnosis of persistent bovine viral diarrhoea virus infection by immunohistochemical staining of formalin-fixed skin biopsy specimens. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 12, n. 5, p. 393-399, 2000.

OLAFSON, P. MACCULUM, A.D.; FOX, F.H. An apparently new transmissible disease of cattle. **The Cornell Veterinarian**, v. 36, n. 1, p. 205-213, 1946.

PASSLER, T.; WALZ, P.H. Bovine viral diarrhoea virus infections in heterologous species. **Animal Health Research Reviews**, v. 3, p. 1-5, 2009.

PAVARINI, S.P *et al.* Anomalias congênitas em fetos bovinos abortados no sul do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 3, p. 149-154, 2008.

PILZ, D. *et al.* RT-PCR em *pools* de soro sanguíneos para o diagnóstico da infecção aguda e de animais persistentemente infectados pelo vírus da diarréia viral bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 1, p. 1-7, 2007.

POTGIETER, L.N.D. Bovine viral diarrhoea and mucosal disease. In: Coetzer, J.A.W.; Tustin, R.C. **Infectious Diseases of Livestock**. 2nd ed. Cape Town: Oxford University, 2004, v. 2, p. 946-969.

PRESI, P.; HEIM, D. BVD eradication in Switzerland-A new approach.2009. Aceito para publicação em **Veterinary Microbiology**. (no prelo)

PROPHET E.B., MILLS B., ARRINGTON J.B. & SOBIN L.H. Laboratory Methods in Histotechnology. Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC. 279p. 1992.

RADOSTITS, O. M. *et al.* Bovine virus diarrhoea, mucosal disease, bovine pestivirus disease complex. In: **Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats**. 10th ed. Philadelphia:Saunders Elsevier, 2007, p. 1248-1276.

RAUE, R.; HAMRMEYER, S.S.; NANJIANI, I.A. Antibody responses to inactivated vaccines and natural infection in cattle using bovine viral diarrhoea virus ELISA kits: Assessment of potential to differentiate infected and vaccinated animals. 2010. Aceito para publicação em **The Veterinary Journal**. (no prelo)

RIDIPATH, J.F. Classification and molecular biology. In: GOYAL, S.M & RIDIPATH, J.F. (Eds) **Bovine Viral Diarrhoea Virus: Diagnosis, management and control**. Iowa:Blackwell Publishing, 2005, cap. 3, p. 65-80.

RIDPATH, J.F. BVDV genotypes and biotypes: practical implications for diagnosis and control. **Biologicals**, v. 31, n. 2, p. 127-131, 2003.

RIDPATH, J.F. *et al.* Evaluation of the reverse transcription-polymerase chain reaction/probe test serum samples and immunohistochemistry of skin section for detection of acute bovine viral diarrhoea infections. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 14, n. 4, p. 303-307, 2002.

RIDPATH, J.F. *et al.* Multiple outbreaks of acute BVDV in North America occurring between 1993 and 1995 linked to the same BVDV2 strain. **Veterinary Microbiology**, v. 114, n.3-4, p. 196-204, 2006.

RIDPATH, J.F. *et al.* Stability of Bovine viral diarrhoea virus antigen in ear punch samples collected from bovine fetuses. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 21, n. 3, p. 346-349, 2009.

RIDPATH, J.F.; BOLIN, S.R. Delayed onset postvaccinal mucosal disease as a result of genetic recombination between genotype 1 e genotype 2 BVDV. **Virology**, v. 212, n. 1, p. 259–262, 1995.

RIDPATH, J.F.; BOLIN, S.R.; DUBOVI, E.J. Segregation of Bovine Viral Diarrhoea Virus into Genotypes. **Virology**, v. 205, n. 1, p. 56-74, 1994.

RIDPATH, J.F.; FLORES, E.F. Flaviviridae. In: FLORES, E.F. (Org) **Virologia Veterinária**. Santa Maria: UFSM, 2007, cap. 22. p. 563-592.

RIDPATH, J.F.; NEIL, J.D.; LANDGRAF, J.G. Phylogenetic, antigenic and clinical characterization of type 2 BVDV from North America. **Veterinary Microbiology**, v. 77, n. 1-2, p. 145–155, 2000.

ROSSMANITH, W. Voluntary and compulsory eradication of bovine viral diarrhoea virus in Lower Austria. 2009. Aceito para publicação em **Veterinary Microbiology**. (no prelo)

SALIKI, J.T.; DUBOVI, E.J. Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhoea virus infections. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 20, n. 1, p. 69-83, 2004.

SAMBROOK, R.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989. 223p.

SANDVIK, T. Laboratory diagnostic investigation for bovine viral diarrhoea virus in cattle. **Veterinary Microbiology**, v. 64, n. 2-3, p. 123-134, 1999:

SCHMITZ, M. Caracterização patológica e imunoistoquímica da infecção pelo vírus da diarréia viral bovina. **Dissertação de mestrado**. Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2006. 63p.

SCOTT, F.W. *et al.* Virus induced congenital anomalies of the bovine fetus. I. Cerebellar degeneration (hypoplasia), ocular lesions and fetal mummification following experimental infection with bovine viral diarrhea-mucosal disease virus. **The Veterinary Cornell**, v. 63, n. 4, p. 536-560, 1973.

SHIN T; ACLAND H. Tissue distribution of bovine viral diarrhea virus antigens in persistently infected cattle. **Journal of Veterinary Science**, v. 2, n. 2, 2001.

SOFFREGEN, B. *et al.* Morphologic lesions in type 2 BVDV infections experimentally induced by strain BVDV2-1373 recovered from a field case. **Veterinary Microbiology**, v. 77, n. 1-2, p. 157-162, 2000.

SOLIS-CALDERON, J.J.; SEGURA-CORREA, V.M.; SEGURA-CORREA, J.C. Bovine viral diarrhoea virus in beef cattle herds of Yucatan, Mexico: Seroprevalence and risk factors. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 72, n. 2-3, p. 253-262, 2005.

STAHL, K. *et al.* Natural infection of cattle with an atypical 'HoBi'-like pestivirus - Implications for BVD control and for the safety of biological products. **Veterinary Research**, v.38, n.3, p. 517-523, 2007.

STALDER H.P. *et al.* Genetic heterogeneity of pestiviruses of ruminants in Switzerland. **Preventive Veterinary Medicine**, v.45, p.354-358, 2005.

SYNGE, B.A. *et al.* The control of bovine virus diarrhoea virus in Shetland. **Veterinary Microbiology**, v. 64, n. 2-3, p. 223-229, 1999.

TAJIMA, M.; DUBOVI, E.J. Genetic and clinical analysis of bovine viral diarrhea virus isolates from dairy operations in the United States of America. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 17, n. 1, p. 10-15, 2005.

TALAFHA, A.Q. *et al.* Prevalence and risk factors associated with bovine viral diarrhoea virus infection in dairy herds in Jordan. **Tropical Animal Health and Production**, v. 41, n. 4, p. 499-506, 2009.

TARRY, D.W.; BERNAL, L.; EDWARDS, S. Transmission of bovine virus diarrhoea virus by blood feeding flies. **The Veterinary Record**, v. 128, n. 4, p. 82-84, 1991.

THURMOND, M.C. Virus Transmission. In: GOYAL, S.M.; RIDPATH, J.F. (Eds) **Bovine Viral Diarrhoea Virus: Diagnosis, management and control**. Iowa: Blackwell Publishing, 2005, cap. 5, p. 91-104.

USHIGUSA, T. *et al.* A pathologic study on ocular disorders in calves in southern Kyushu, Japan. **Journal of Veterinary Science**, v. 62, n. 2, p. 147-152, 2000.

VAN CAMPEN, H. Epidemiology and control of BVD in the U.S. 2009. Aceito para publicação em **Veterinary Microbiology**. (no prelo)

VIET, A.F; FOURICHON, C.; SEEGER, H. Review and critical discussion of assumptions and modeling options to study the spread of the bovine viral diarrhoea virus (BVDV) within a cattle herd. **Epidemiology and Infections**, v. 135, n. 5, p. 706-721, 2007.

VILCEK, S. *et al.* Characterization of a novel pestivirus originating from a pronghorn antelope. **Virus Research**, v. 108, n. 1-2, p. 187-193, 2005.

VILCEK, S. *et al.* Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. **Archives of Virology**, v.136, p.309–323, 1994.

VILCEK, S.; NETTLETON, P.F. Pestiviruses in wild animals. **Veterinary Microbiology**, v. 116, n. 1-3, p. 1-12, 2006.

WALZ, P.H. *et al.* Effect of experimentally induced type II bovine viral diarrhoea virus infection on platelet function in calves. **American Journal of Veterinary Research**, v. 60, n. 11, p. 1396-1401, 1999b.

WALZ, P.H. *et al.* Experimental model of type II bovine viral diarrhoea virus-induced thrombocytopenia in neonatal calves. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 11, n. 6, p. 505-514, 1999a.

WITTUM, T.E. *et al.* Persistent bovine viral diarrhoea virus infection in US beef herds. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 49, n. 1-2, p. 83-94, 2001.

XUE, F. *et al.* Genotyping of bovine viral diarrhoea viruses from cattle in China between 2005 and 2008. 2009 a. Aceito para publicação em **Veterinary Microbiology**. (no prelo)

XUE, W. *et al.* Fetal protection against bovine viral diarrhoea virus type 1 and 2 after the use of a modified-live virus vaccine. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 73, n. 4, p. 292-297, 2009b.