

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
DISCIPLINA DE ESTÁGIO CURRICULAR**

**ESTUDO CLÍNICO-PATOLÓGICO E IMUNO-HISTOQUÍMICO EM DOIS
BOVINOS PERSISTENTEMENTE INFECTADOS PELO VÍRUS DA
DIARREIA VIRAL BOVINA**

ANA PAULA GOBBI DE BITENCOURT

**Porto Alegre
Junho/2011**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
DISCIPLINA DE ESTÁGIO CURRICULAR

Estudo clínico-patológico e imuno-histoquímico em dois bovinos persistentemente infectados pelo vírus da Diarreia Viral Bovina

Aluna: Ana Paula Gobbi de Bitencourt

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado à Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do grau de Médico Veterinário.

Orientador: Angelica Terezinha
Barth Wouters

Co-orientador: Fabiana Marques
Boabaid

Porto Alegre
2011/1

RESUMO

As consequências mais importantes da infecção pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV) parecem estar relacionadas com perdas reprodutivas. O do BVDV é responsável por síndromes que incluem abortos, anormalidades congênitas e bovinos persistentemente infectados (PI). Ele está presente em grande parte dos rebanhos bovinos comerciais de vários países. Com base no efeito da replicação viral em cultivo celular, os isolados de BVDV podem ser divididos em citopáticos (CP) e não-citopáticos (NCP). Os isolados NCP se constituem nos BVDV “verdadeiros” e são responsáveis pela maioria das infecções naturais e pelas infecções fetais persistentes. Os isolados CP são uma minoria e não são capazes de produzir infecções persistentes, são isolados quase que exclusivamente de animais com doença das mucosas (DM). O vírus CP é gerado nos animais PI a partir do vírus NCP original, através de mutações, recombinações, deleções ou rearranjos genéticos. Os animais PI excretam vírus continuamente em altos níveis em suas secreções (nasais, saliva, sêmen e leite) e excreções (urina e fezes). Animais PI são considerados a fonte mais importante do BVDV em rebanhos. Portanto, em termos de controle e erradicação, o diagnóstico de BVD deve ser focado na detecção dos animais PI. Neste trabalho dois animais foram identificados como persistentemente infectados por este vírus através da realização do exame de RT-PCR com soro sanguíneo. Posteriormente, foram coletados fragmentos de orelha para realização do exame de imuno-histoquímica (IHQ), no qual ambos os animais obtiveram resultado positivo, demonstrado pela marcação da IHQ de pele. Os dois animais foram eutanasiados e necropsiados. As principais alterações macroscópicas foram o aumento dos linfonodos mesentéricos e a evidência das Placas de Peyer e da polpa branca do baço. Na microscopia foi observada rarefação linfóide centrofolicular multifocal e infiltrado linfo-histiocitário nos linfonodos mesentéricos, dilatação dos vasos linfáticos no jejuno e infiltrado inflamatório mononuclear discreto na mucosa do intestino delgado. No teste de IHQ as principais células marcadas foram linfócitos e histiócitos em órgãos linfóides e em órgãos do sistema digestório, citoplasma de corpos neuronais e células da glia no encéfalo e na pele em queratinócitos da epiderme, células mononucleares da derme e epitélio de folículos pilosos, marcação esta que caracteriza bovinos persistentemente infectados pelo BVDV.

Palavras - chave: *Pestivirus*, bovinos persistentemente infectados, doença dos bovinos.

ABSTRACT

The major BVDV infection consequences seem to be related with reproductive failure. BVD virus is also responsible for abortions, congenital abnormalities, persistently infected bovine (PI). BVDV is present in most of the commercial herds of several countries. Based on cell culture replication effect, BVDV isolates can be divided into cytopathic (cp) or non cytopathic (ncp). Ncp isolates characterize the “true” BVDV and are responsible for most of the natural infections and for persistent fetal infections. There are cp isolates, that are not able to produce persistent infection, these are isolated almost exclusively from animals presenting mucosal disease (MD). Cp BVDV are generated in PI animals deriving from original ncp virus, through mutations, recombination, deletion or genetic rearrangements. PI animals excrete virus continuously in high titers through their secretions (nasal, saliva, semen and milk) and excretion (urine and feces). PI animals are believed to be the most important BVD infection cause in herds. Therefore, in terms of control and eradication, BVDV diagnosis must be focused in PI animal detection. In this study, two animals were identified as persistent infected by the virus through reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) from serum. Subsequently, ear fragments were collected for immunohistochemistry (IHC), both animal presented positive result demonstrated by skin IHC staining. The main gross lesions were enlargement of mesenteric lymphnodes. Peyer patches and white pulp of the spleen were evident. Microscopically, multifocal centrollicular lymphoid depletion and mononuclear infiltrate were observed in the mesenteric lymphnode, lymphatic vessels dilation was observed in the jejunum and discrete mononuclear infiltrate in the small gut mucosa. IHC test stained lymphocytes and histiocytes in lymphoid tissue and in digestive tract, neuronal bodies cytoplasm and glial cells in the brain, keratinocytes of the skin, mononuclear cells in the dermis and follicular epithelium, staining compatible with those present in BVDV persistently infected bovine.

Key words: Pestivirus, persistently infected bovines, bovine disease.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Marcação de imuno-histoquímica nos órgãos e tecidos coletados na necropsia dos animais N1039/09 e N399/10 e demonstração da marcação quanto à intensidade . **18**

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Bovino (N1039/09), fêmea, um ano de idade,. Apresenta subdesenvolvimento.	13
Figura 2. Rúmen do bovino (N1039/09), Ulceração no pilar do rúmen.....	14
Figura 3. Bovino (N399/10), fêmea, 1 ano e meio, com subdesenvolvimento.	15
Figura 4. Baço do bovino N399/10,. Aumento de tamanho e evidenciação da polpa branca.....	15
Figura 5. Intestino delgado do Bovino N399/10, com evidenciação de Placa de Peyer.	16
Figura 6. Linfonodo mesentérico do Bovino N1039/09. Rarefação linfoide centrofolicular multifocal e infiltrado linfo-histiocitário. HE, obj. 40.....	16
Figura 7. Rúmen do Bovino N1039/09. Ulceração focal com necrose das células do estrato basal e moderado infiltrado inflamatório no pilar ruminal. HE, obj. 20.....	17
Figura 8. Cérebro, bovino N1039/09,. Marcação no citoplasma dos corpos neuronais. IHQ anti-BVDV, obj. 20.	19
Figura 9. Cérebro, Bovino N1039/09. Aproximação da Figura 8, evidenciando a marcação do citoplasma dos corpos neuronais. IHQ anti- BVDV, obj. 40.....	20
Figura 10. Cólon espiral, Bovino N399/10,. Marcação de histiócitos na camada mucosa. HE, obj. 40.	20
Figura 11. Pele (fragmento de orelha, Bovino N1039/09,). Marcação nos queratinócitos da epiderme, células mononucleares da derme e no epitélio de folículos pilosos. IHQ anti-BVDV, obj. 20.	21

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	6
2. MATERIAL E MÉTODOS	10
2.1 <i>Procedimentos gerais</i>	<i>10</i>
2.2 <i>Coleta de fragmentos de orelha.....</i>	<i>10</i>
2.3 <i>Necropsia e análises histológicas.....</i>	<i>11</i>
2.4 <i>Exame Imuno-histoquímico (IHQ)</i>	<i>11</i>
3. RESULTADOS	13
3.1 <i>Avaliação clínico-patológica dos bovinos PI pelo BVDV.....</i>	<i>13</i>
3.2 <i>Avaliação imuno-histoquímica</i>	<i>17</i>
4. DISCUSSÃO	22
REFERÊNCIAS	24

1. INTRODUÇÃO

Uma grande variedade de manifestações clínicas estão associadas à infecção pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV). Essas manifestações podem ser agrupadas em quatro formas principais: doença aguda leve (gastroentérica e respiratória), doença aguda severa (gastroentérica, respiratória e hemorrágica), doença das mucosas (DM), e diarreia viral bovina (BVD) crônica (recentemente reconhecida como uma forma da DM) (Flores et al., 2005). As maiores consequências da infecção pelo BVDV parecem estar relacionadas com perdas reprodutivas. O BVDV é responsável por síndromes que incluem abortos, anormalidades congênitas e bovinos persistentemente infectados (PI). (Flores et al., 2007).

O BVDV é um *Pestivirus* da Família *Flaviviridae*, que foi isolado pela primeira vez de rebanhos que apresentavam uma doença aguda e contagiosa com alta morbidade e baixa mortalidade. Ele está presente em grande parte dos rebanhos bovinos comerciais de vários países (Njaa et al, 2000).

De acordo com as características genéticas e antigênicas, os isolados de BVDV podem ser divididos em dois grupos: BVDV-1 e BVDV-2. Os vírus pertencentes ao genótipo 1 abrangem a maioria das cepas de referência e os vírus utilizados em vacinas. Os vírus pertencentes ao genótipo 2 foram inicialmente isolados de surtos de BVD aguda e doença hemorrágica, mas incluem também isolados de virulência baixa e moderada (Flores et al., 2005) .

Com base no efeito da replicação em cultivo celular, os isolados de BVDV podem ser divididos em citopáticos (CP) e não-citopáticos (NCP). Os isolados NCP se constituem nos BVDV “verdadeiros” e são responsáveis pela maioria das infecções naturais e pelas infecções fetais persistentes. Os isolados CP são uma minoria e não são capazes de produzir infecções persistentes, são isolados quase que exclusivamente de animais com DM. Os BVDV são gerados nos animais persistentemente infectados (PI) a partir do vírus NCP original, através de mutações, recombinações, deleções ou rearranjos genéticos que levam à expressão na proteína NS23 como um polipeptídeo individual (Bolin et al, 2004). Ao contrário, os vírus NCP expressam apenas a proteína precursora NS23. A proteína NS23 é considerada o marcador molecular dos vírus CP (Flores & Schuch, 2007).

A introdução do vírus nos rebanhos pode ocorrer pela aquisição de animais PI; de fêmeas gestando fetos PI e pela introdução de animais durante infecção aguda e, ainda, através do contato entre animais de rebanhos vizinhos (Flores et al., 2005).

A infecção de fêmeas prenhes soronegativas é seguida de transmissão transplacentária do vírus ao embrião ou feto. As consequências da infecção do conceito dependem do estágio gestacional em que ocorre a infecção, do biótipo (CP/NCP) e da cepa do vírus. Podem ocorrer reabsorção embrionária (com retorno ao cio em intervalos regulares ou irregulares), abortos, mumificação fetal, natimortos, nascimento de bezerros fracos e inviáveis ou o nascimento de animais PI (Brock et al., 2005). Abortos em qualquer fase da gestação podem ser atribuídos ao BVDV. Fetos infectados no terço final da gestação, geralmente nascem normais, livres do vírus e soropositivos (Flores & Schuch, 2007).

O estabelecimento de infecções persistentes ocorre quando o feto é infectado entre 40 e 120 dias de gestação. Os fetos infectados neste período desenvolvem imunotolerância ao vírus infectante e seu organismo jamais conseguirá erradicar o vírus. Apenas cepas de BVDV não-citopáticas podem estabelecer infecções persistentes. Os bezerros que nascem PI geralmente são soronegativos. Os animais PI podem apresentar crescimento retardado, malformações congênitas ou ser aparentemente saudáveis (Flores & Schuch, 2007).

Animais persistentemente infectados com o BVDV representam o maior reservatório do vírus na natureza e, dessa forma, são considerados mantenedores do vírus (Campbell, 2004). A maioria dos animais PI morre no início da vida (Taylor et al, 1997), no entanto, alguns podem viver até dois anos ou mais, alcançando a vida adulta, podendo até se tornar reprodutores e transmitir o vírus para a progênie (fêmeas) ou pelo sêmen (macho) (Radostits et al., 2007). Os animais PI excretam o vírus continuamente em altas quantidades em suas secreções (nasais, saliva, sêmen e leite) e excreções (urina e fezes) (Flores & Schuch, 2007). Animais PI são considerados a mais importante causa do vírus BVD em rebanhos (Njaa et al., 2000).

Portanto, em termos de controle e erradicação, o diagnóstico de BVD deve ser focado na detecção dos animais PI, como vem sendo realizado em programas de erradicação da doença na Europa (Sanvik, 2004).

Animais PI possuem grandes quantias de partículas virais em uma variedade de tecidos que podem ser rapidamente identificados por isolamento viral (IV), ensaio enzimático de captura de antígeno (ELISA), imuno-histoquímica (IHQ) ou reação em

cadeia de polimerase (PCR) (Saliki et al, 2004). Mais comumente, o isolamento viral e o PCR são métodos de diagnóstico que são usados para identificar BVDV no soro sanguíneo de bovinos. No entanto, muitos dias são necessários para obter resultado quando o isolamento viral é utilizado, além disso, dois testes devem ter resultado positivo e devem ser realizados separadamente em um período de duas a três semanas para confirmar a infecção persistente por BVDV. A técnica de PCR simples é altamente sensível na detecção de BVDV e mostra diferença de genótipos, porém não há dados disponíveis que provem que o PCR simples possa diferenciar infecções agudas de animais PI (Njaa et al., 2000). A reação em cadeia da polimerase utilizando transcriptase reversa (RT-PCR) têm sido utilizada para detecção de animais PI em amostragens de leite e soro sanguíneo (Saliki et al, 2004).

O BVDV tem tropismo por linfócitos, fagócitos mononucleares e células epiteliais. Muitos estudos têm documentado distribuição tecidual do BVDV, baseado em IHQ de biópsias de pele (Njaa et al., 2000).

Um dos métodos desenvolvidos que tem sido utilizado para identificação de animais PI por BVDV é a detecção do antígeno viral em biópsias de pele (Brodersen, 2004). O uso de IHQ para detectar PI em bezerras se mostrou um acurado método de identificação destes animais, entre outras vantagens (Grooms, 2004).

Uma das vantagens desta técnica está relacionada à marcação antigênica, dessa forma, se um animal estiver com a forma aguda da doença ou é vacinado com vacina viva, a chance de detecção de antígenos virais em biópsias de pele pela IHQ é muito baixa (Njaa et al., 2000). Outras vantagens do uso da IHQ em biópsias de pele são a fácil coleta de amostras e seu transporte para o laboratório - o encaminhamento de amostras de sangue necessita refrigeração durante transporte enquanto as amostras de pele não têm essa necessidade, já que não são alteradas pela temperatura ambiente. Um fragmento pequeno de orelha é acondicionado em um recipiente contendo formalina 10%. Esta coleta não necessita ser realizada por pessoa treinada, ao contrário da coleta de amostras de sangue. Além disso, os custos da coleta de fragmentos de orelha são reduzidos quando comparados à coleta de sangue, que requer agulhas e tubos apropriados (Brodersen, 2004). Segundo McGavin et al. (2007), o diagnóstico de animais PI deve ser realizado por IHQ de biópsias de pele pois esses animais apresentam grande quantidade do vírus em toda a pele.

O objetivo deste trabalho é descrever os achados clínicos, patológicos e a detecção do vírus, através da marcação imuno-histoquímica, em diversos tecidos de dois bovinos persistentemente infectados pelo vírus da diarreia viral bovina.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Procedimentos gerais

Em 2009 a equipe do Laboratório de Virologia da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul realizou coleta de sangue em tubos com EDTA de animais com baixo desenvolvimento e em vacas com repetidos problemas reprodutivos em propriedades rurais do interior do Rio Grande do Sul (RS). O objetivo era realizar, através do método de reação de amplificação em cadeia da polimerase utilizando a transcriptase reversa (RT-PCR), a triagem de bovinos persistentemente infectados (PI) pelo BVDV em rebanhos bovinos no RS, para posteriormente realizar estudo comparativo entre a técnica de RT-PCR e imuno-histoquímica (IHQ) para detecção viral em diversos tecidos de bovinos PI. Em seis animais foi confirmada a infecção persistente do BVDV através do RT-PCR do soro sanguíneo, de cada um destes animais foi coletado um fragmento da orelha para a realização do exame de imuno-histoquímica pelo Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV/UFRGS) e diagnóstico de infecção persistente por BVDV. O resultado foi positivo para todos os animais testados.

Dos seis bovinos PI pelo BVDV no RT-PCR dois foram selecionados para este estudo. Um animal foi transportado ao SPV/UFRGS, onde foi eutanasiado e posteriormente necropsiado. No outro caso, a equipe do SPV se deslocou à propriedade rural de origem do animal diagnosticado como PI para a realização da necropsia.

2.2 Coleta de fragmentos de orelha

A biópsia de orelha foi realizada na propriedade de origem dos animais pelo veterinário responsável, usando uma tesoura romba reta. Fragmentos de aproximadamente 1,0 cm de comprimento e 0,5 cm de largura foram coletados da extremidade do pavilhão auricular e acondicionados em tubos de ensaio contendo solução de formalina a 10%. . Após 24 horas o 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 5µm em lâminas de poli-l-lisina, submetidas ao teste de IHQ.

2.3 Necropsia e análises histológicas

Na necropsia dos animais PI, foram avaliadas as alterações macroscópicas. Para exame microscópico coletaram-se olhos, fragmentos de orelha, cérebro, cerebelo, medula espinhal, gânglio trigeminal, hipófise, linfonodos mandibularmesentérico, hepático e mediastínico, tonsila, baço, timo, pulmão, traqueia, esôfago, rúmen, omaso, retículo, abomaso, duodeno, jejuno, íleo, (ceco, cólon espiral, reto), tireoide, rim, medula óssea, adrenal, coração e fígado. Estes fragmentos foram fixados em solução de formalina a 10% por 48h e processados rotineiramente (PROPHET *et al.*, 1992). Foram confeccionadas lâminas para coloração de rotina de hematoxilina e eosina (HE), e lâminas de poli-l-lisina para exame IHQ.

2.4 Exame Imuno-histoquímico (IHQ)

O exame IHQ foi realizado em cortes de olho, cérebro, cerebelo, medula espinhal, gânglio trigeminal, hipófise, linfonodos mandibular, mesentérico, hepático e mediastínico, tonsila, 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 orelha dos animais suspeitos. Para realização da IHQ foi utilizado o protocolo previamente padronizado por Santos (2010). 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[®]) a 0,005% em PBS por 15 minutos a 37°C e as marcações inespecíficas foram reduzidas a partir da aplicação de leite desnatado a 5% por 15 minutos em temperatura ambiente. O anticorpo primário foi aplicado por 16 horas (*overnight*) a 4°C, em câmara úmida. Posteriormente, utilizaram-se anticorpo secundário biotinilado e solução streptavidina conjugada a uma molécula de fosfatase alcalina (LSAB + System AP, DakoCytomation[®]) por 20 minutos cada, em temperatura ambiente. O cromógeno utilizado foi o *Permanent Red* (DakoCytomation[®]) por 15 minutos. Após, as lâminas foram contracoradas 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 de biópsia de orelha foram inseridas ao conjunto das lâminas a serem testadas. A marcação foi graduada conforme sua intensidade; foi considerado – (ausência de marcação), + (marcação discreta), ++ (marcação moderada) e +++ (marcação acentuada).

3. RESULTADOS

Seis animais foram detectados com infecção persistente por BVDV nos exames RT-PCR e imuno-histoquímica de biópsia de orelha. Estes animais provinham de rebanhos distintos de diferentes Regiões do Estado do Rio Grande do Sul. No presente trabalho são descritos os resultados das análises clínicas, patológicas e imuno-histoquímicas de dois dos casos, registrados no SPV/UFRGS sob os protocolos N1039/09 e N399/10.

3.1 Avaliação clínico-patológica dos bovinos PI pelo BVDV

Em dezembro de 2009 foi encaminhado ao SPV/UFRGS um bovino (N1039/09), fêmea, de um ano de idade, PI pelo BVDV, provindo do Município de São Francisco de Assis/RS, para realização de necropsia. Este bovino apresentava-se subdesenvolvido em relação à idade (Figura 1). Na necropsia foi observada ulceração profunda, de aproximadamente 2,5 cm de diâmetro, no pilar do rúmen (Figura 2), no cérebro havia áreas de depressão das circunvoluções, com média de 0,5 cm de diâmetro, bilaterais e simétricas; e foram encontrados formas adultas de *Moniezia* sp. e *Trichuris* sp. no intestino delgado e no ceco, respectivamente. Visualizaram-se ainda áreas de avermelhamento acentuado em porções da mucosa do intestino delgado.



Figura 1. Bovino (N1039/09), fêmea, um ano de idade. Apresenta subdesenvolvimento.



Figura 2. Rúmen do bovino (N1039/09),
Ulceração no pilar do rúmen.

Em junho de 2010 a equipe do SPV/UFRGS foi a uma propriedade rural localizada no Município de Arroio do Meio para realização de necropsia e eutanásia do segundo bovino (N399/10), fêmea, de um ano e meio, já identificado anteriormente como persistentemente infectado por BVDV através do RT-PCR e da IHQ de fragmento de orelha. Segundo o proprietário o bovino apresentava crescimento lento e pouco desenvolvimento em relação aos demais animais do mesmo lote (Figura 3). Na necropsia deste bovino o baço se encontrava aumentado de tamanho e com evidencição da polpa branca (Figura 4); os linfonodos mesentéricos estavam com moderado aumento de volume e as placas de Peyer estavam evidenciadas no intestino delgado (Figura 5). Notaram-se ainda múltiplos nódulos arredondados e firmes de aproximadamente 0,1 cm de diâmetro na serosa do intestino delgado.

As alterações histológicas encontradas foram semelhantes em ambos bovinos e consistiam de dilatação dos vasos linfáticos no jejuno, infiltrado inflamatório mononuclear discreto na mucosa do intestino delgado e depleção linfoide e infiltrado inflamatório discreto a moderado em linfonodos, tonsilas e placas de Peyer (Figura 6). Também foi observada uma área de ulceração com necrose das células do estrato basal e acentuado infiltrado inflamatório neutrofílico no pilar ruminal do bovino N1039/09 (Figura 7). O bovino N399/10 apresentava ainda nefrite mononuclear multifocal discreta, hiperplasia linfoide no baço e focos de necrose com infiltrado inflamatório mononuclear moderado e eosinofílico acentuado associado, na submucosa

e na serosa do intestino delgado e, em um dos centros dessas áreas de necrose, foi visualizada uma estrutura larval de helminto.

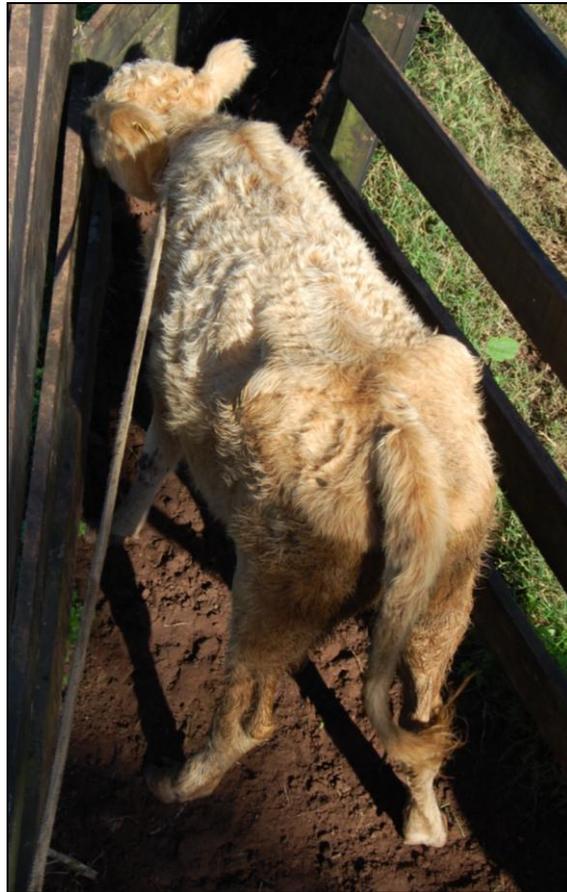


Figura 3. Bovino (N399/10), fêmea, 1 ano e meio, com subdesenvolvimento.



Figura 4. Baço do bovino N399/10. Aumento de tamanho e evidência da polpa branca.



Figura 5. Intestino delgado do Bovino N399/10, com evidência de Placa de Peyer.

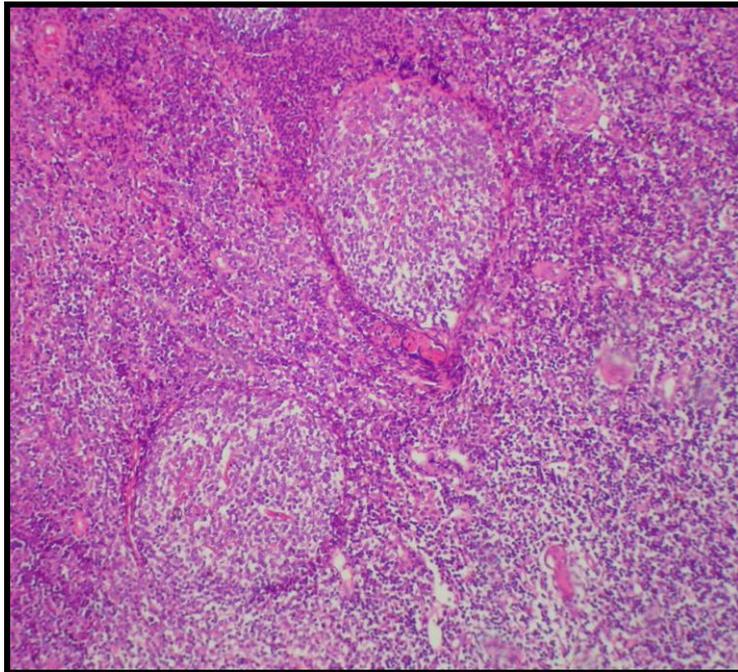


Figura 6. Linfonodo mesentérico do Bovino N1039/09. Rarefação linfóide centrofolicular multifocal e infiltrado linfo-histiocitário. HE, obj. 40.

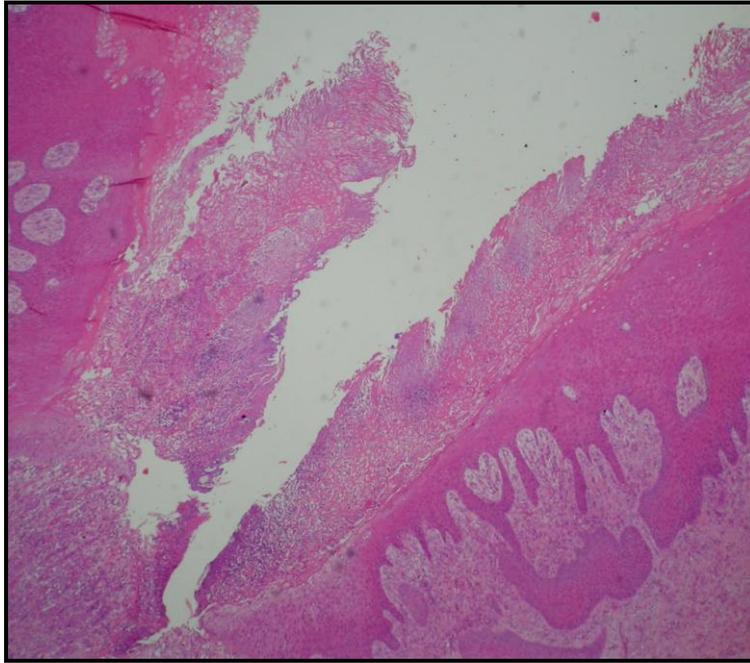


Figura 7. Rúmen do Bovino N1039/09. Ulceração focal com necrose das células do estrato basal e moderado infiltrado inflamatório no pilar ruminal. HE, obj. 20.

3.2 Avaliação imuno-histoquímica

Na Tabela 1 estão descritas as marcações de IHQ correspondentes aos dois animais PI estudados.

Tabela 1. Marcação de imuno-histoquímica nos órgãos e tecidos coletados na necropsia dos animais N1039/09 e N399/10 e demonstração da marcação quanto à intensidade

Órgãos	N1039/09	N399/10
Orelha/pele	+++	+++
Olho	NC*	+++
Córtexfrontal	+++	+++
Hipocampo	+++	NC
Cerebelo	++	+++
Óbex	-	-
Medula cervical	-	++
Medula torácico	-	-
Medula lombar	+	-
Gânglio. trigeminal.	-	-
Tireoide	+++	-
Glandula salivar submandibular	-	-
Adrenal	-	-
Baço	+	+
Tonsila	-	-
Linfonodo mesentérico	+++	-
Linfonodo mediastínico	+++	-
Linfonodo mandibular	+++	-
Linfonodo hepático	+	-
Timo	+++	NC
Traqueia	-	-
Pulmão	++	-
Língua	-	-
Esôfago	-	+++
Fígado	-	-
Pâncreas	++	-
Rúmen	+	-
Retículo	+	-
Omaso	-	-
Abomaso	++	-
Duodeno	-	++
Jejuno	-	-
Íleo	-	-
Ceco	-	-
Cólon espiral.	-	+++
Reto	-	+++
<i>Rete mirabile</i>	-	-
Rim	-	+
Útero	-	NC
Ovário	-	NC
Medula Óssea	-	-

*NC (não coletado).

A marcação nos linfonodos foi evidente na região medular, principalmente em linfócitos e histiócitos dos cordões medulares. O córtex do timo foi fortemente marcado e houve discreta marcação centrofolicular no baço.

No sistema respiratório houve moderada marcação dos histiócitos de agregados linfóides e também houve marcação do epitélio de brônquios e bronquíolos.

No encéfalo foram observadas marcações, principalmente no citoplasma de corpos neuronais (Figura 8 e 9), astróцитos e células endoteliais de vasos. No cerebelo foram marcadas as células de Purkinje, as células estreladas grandes e os grãos cerebelosos na camada molecular.

No sistema digestório foram marcadas as células basais do epitélio e histiócitos da camada mucosa (Figura 10) e da submucosa de esôfago, rúmen, retículo, cólon espiral e reto, além disso, nas células parietais da porção glandular do abomaso também foi observada marcação.

No rim foram marcadas células epiteliais tubulares no córtex e na medula. Na tireoide a marcação foi acentuada nas células foliculares. No olho a marcação foi observada nas células ganglionares da retina.

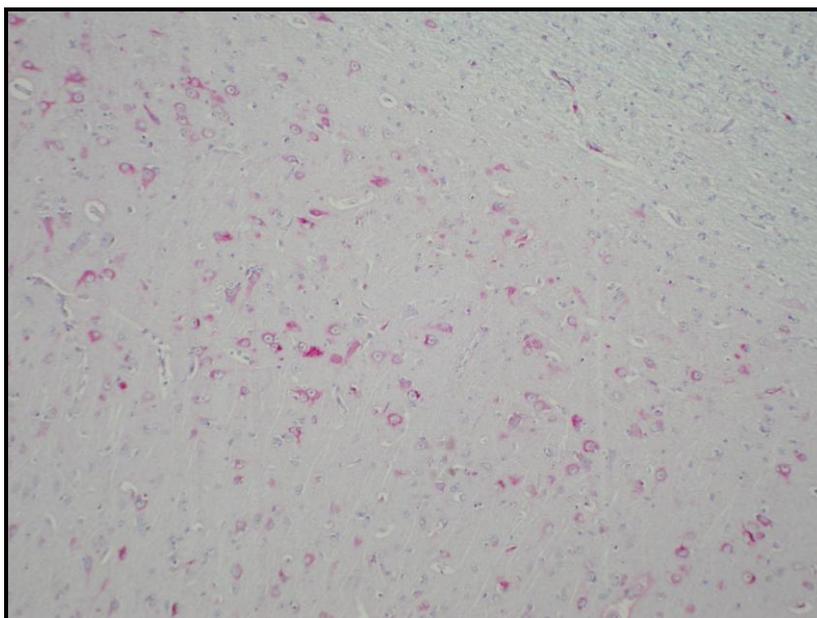


Figura 8. Cérebro, bovino N1039/09. Marcação no citoplasma dos corpos neuronais. IHQ anti-BVDV, obj. 20.

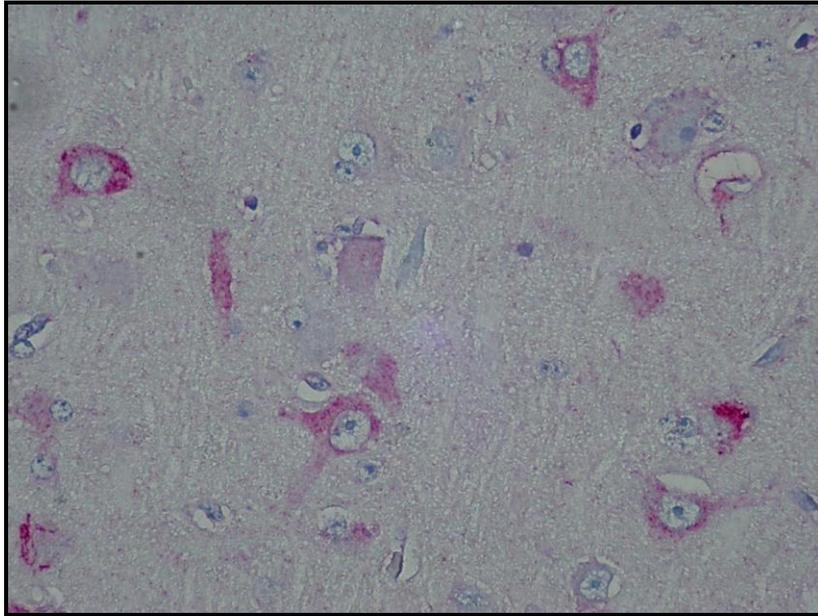


Figura 9. Cérebro, Bovino N1039/09. Aproximação da Figura 8, evidenciando a marcação do citoplasma dos corpos neuronais. IHQ anti- BVDV, obj. 40.

A marcação em pele da orelha ocorreu nos queratinócitos da epiderme, em células mononucleares da derme e no epitélio de folículos pilosos (Figura 11).

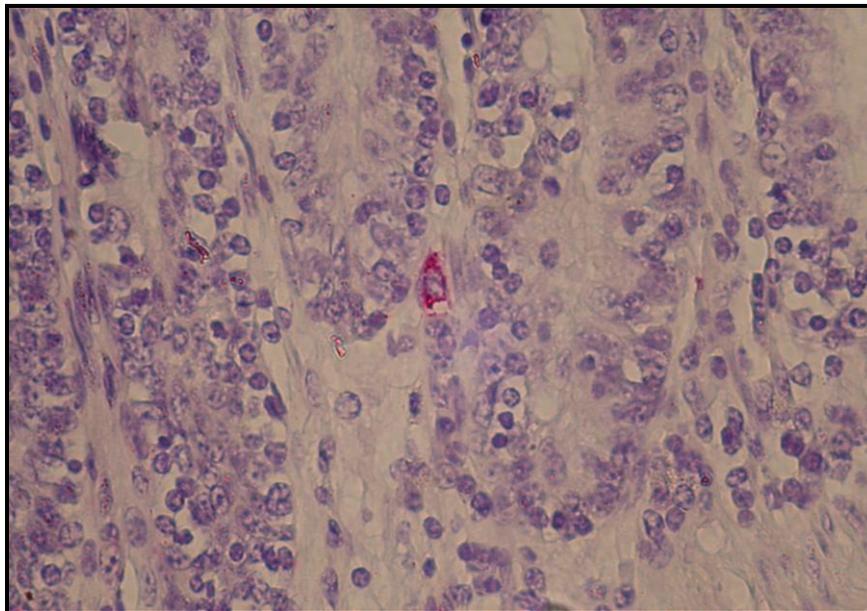


Figura 10. Cólon espiral, Bovino N399/10. Marcação de histiócitos na camada mucosa. HE, obj. 40.

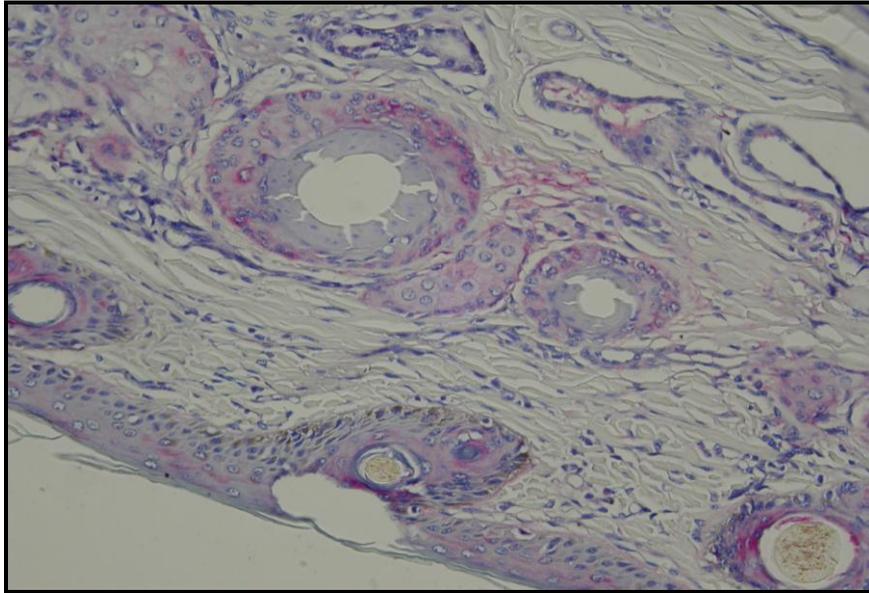


Figura 11. Pele (fragmento de orelha, Bovino N1039/09,). Marcação nos queratinócitos da epiderme, células mononucleares da derme e no epitélio de folículos pilosos. IHQ anti-BVDV, obj. 20.

4. DISCUSSÃO

O vírus da Diarreia Viral Bovina é um dos principais patógenos de bovinos e causa perdas econômicas significativas para a pecuária bovina em todo o mundo (Baker, 1995). Neste estudo foram identificados, através do exame de RT-PCR com soro sanguíneo, dois animais, de diferentes regiões do Rio Grande do Sul, infectados com o BVDV e que tiveram a confirmação de infecção persistente através do exame de IHQ em pele de fragmentos de orelha. A infecção fetal entre os dias 40 e 120 de gestação com isolados NCP frequentemente resulta na produção de bezerros imunotolerantes, persistentemente infectados com o vírus. Os PI são soronegativos, podem ser clinicamente normais, e liberam o vírus continuamente em grandes quantidades em secreções e excreções (Brownlie, 1990). Dessa forma são considerados o ponto-alvo da epidemiologia da infecção e a sua identificação e seu descarte constituem etapas essenciais para o controle e/ou erradicação do BVDV dos rebanhos (Dubovi, 1992).

Nesse trabalho os bovinos infectados pelo BVDV foram selecionados através de triagem pela técnica RT-PCR em soro bovino. A alta sensibilidade analítica do RT-PCR permite, com a realização de “pools”, reduzir o custo dos testes. Este *pool*, ou triagem, é especialmente aplicável para detecção de infecções persistentes, pelo qual uma única amostra positiva pode ser detectada em um *pool* de muitas amostras. Dois usos práticos de amostragem para PCR são o *pool* de tanque de leite (Drew et al., 1999) e amostras de soro sanguíneo (Munoz-Zanzi et al., 2000) para teste de ocorrência de PI.

Foram analisadas as lesões encontradas na necropsia, no exame microscópico de histopatologia e a presença do vírus em demais órgão através de marcações realizadas no exame de IHQ. Na necropsia de um dos animais foi encontrada ulceração no pilar ruminal, úlceras na mucosa do trato digestivo podem ser encontradas na forma hemorrágica da doença (Flores et al., 2005) e, segundo McGavin, 2007, erosões multifocais nítidas podem ser encontradas em língua, gengivas, palato, esôfago, rúmen e abomaso, e caracterizam BVD.

No bovino N399/10 foi observada de forma larval de um helminto na avaliação histológica da camada submucosa do intestino delgado e, no bovino N1039/09, havia infecção por *Trichuris sp.* e *Moniezia sp.*, que pode ter sido favorecida por imunossupressão, importante em animais PI pelo BVDV e induzida principalmente por

alterações nas funções de linfócitos, macrófagos e neutrófilos, mesmo que não haja diminuição na população linfóide circulante (Kapil et al., 2005).

O exame de imuno-histoquímica evidenciou o vírus nas células epiteliais de diversos órgãos e em células linfóides, semelhante ao descrito por outros autores, (Shin & Acland 2001; Santos, 2010). As marcações acentuadas predominantemente em histiócitos e alguns linfócitos centrofoliculares dos linfonodos também foram demonstradas por Liebler-Tenorio; Ridpath; Neill (2003), confirmando a predileção do vírus por células do tecido linfóide. O BVD é uma das patologias virais que causa dano aos tecidos linfóides, ocasiona linfocitólise das células dos centros germinativos e do córtex de órgãos linfóides (McGavin, 2007) e que pode ser uma das causas de imunodeficiência e explica as rarefações linfóides centrofoliculares visualizadas no exame histopatológico.

A marcação em folículos pilosos, células dendríticas e em queratinócitos da epiderme encontrada na pele da orelha dos animais deste trabalho é característica de animais PI (Njaa *et al.*, 2000). Em animais com infecção transitória a marcação de pele se mostra, geralmente, limitada a áreas discretas da epiderme (Brodersen, 2004).

A presença do BVDV no sistema nervoso central pode ser observado na marcação antigênica no citoplasma de neurônios do encéfalo e na marcação de células de Purkinje na camada molecular do cerebelo, bem como em células endoteliais dos capilares, o que também descrito em outros estudos imuno-histoquímicos de tecidos de animais PI pelo BVDV (Hewicker, et al. 1990; Schmitz, 2006, Santos, 2010).

Segundo Larsson *et al.* (1995) a replicação viral nas células foliculares da tireoide pode interferir na síntese e na secreção dos hormônios tireoidianos, causando retardo no crescimento destes animais. Durante a realização deste trabalho foi possível observar marcação acentuada destas células em um dos bovinos.

O conhecimento sobre a infecção pelo BVDV no País vem crescendo consideravelmente, à medida que aumenta o número de laboratórios envolvidos em diagnóstico e pesquisa. A eliminação dos animais PI é um elemento chave para erradicação e controle da doença, no entanto, outras medidas de biossegurança, como a vacinação, vem sendo estudadas e implementadas em diversos países. (Flores & Schuch, 2007) Em relação ao Brasil, com o estabelecimento de um mercado comum no MERCOSUL, assim como a implementação de restrições sanitárias ao comércio internacional de produtos animais exigirão o estabelecimento de regras sanitárias oficiais em um futuro próximo (Flores & Schuch, 2007).

REFERÊNCIAS

BAKER, J.C. The clinical manifestation of bovine viral diarrhoea infection. **Veterinary Clinics of North America**. 11(3):425-445, 1995.

BROCK, K.V.; GROOMS, D.L; GIVENS, M.D. Reproductive disease and persistent infections. In: GOYAL, S.M.; RIDPATH, J.F. (Eds) **Bovine Viral Diarrhoea 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 diarrhoea virus infection. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 20, n. 1, p. 85-93, 2004.

BROWNLIE, J. The pathogenesis of bovine viral diarrhoea virus infections. **RE. Sci. Tech.** OIE 9:43-50, 1990.

CAMPBELL, J.R. Effect of bovine viral diarrhoea virus in the feedlot. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 20, n. 1, p. 39-50, 2004.

DREW, T.W.; YAPP, F.; PATON, D.J. The detection of bovine viral diarrhoea virus in bulk milk samples by the use of a single-tube RT-PCR. **Vet Microbiol** 64 (2-3): 145-52, 1999.

DUBOVI, E.J. Genetic diversity and BVDV virus. **Comp. Immun. Microb. Infect. Dis.** 15(3): 155-156, 1992.

ELLIS, J.A.; MARTIN, K.; NORMAN, G.R.; HAINES, D.M. Comparison of detection methods for bovine viral diarrhoea virus in bovine abortions and neonatal death. **J Vet. Diag. Invest.** 1995;7(4):4333-6.

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 equídeos**, 3 ed, Santa Maria: Pallotti, 2007, v. 1, p. 81-93.

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.

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.

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.

- 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.
- 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.
- McGAVIN, M.D ZACHARY, J.F. **Bases da patologia em veterinária**. 4.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. 1476 p.
- MUNOZ-ZANZI, C.A; JOHNSON, W.O.; THURMOND, M.C.; HIETALA, S.K. Pooled-sample testing as a herd-screening tool for detection of bovine viral diarrhoea virus persistently infected cattle. **J Vet. Diag. Invest.** 2000; 12(3):195-203.
- 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.
- 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.* **Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, horse, sheep, pigs and goats**. 10thed. Philadelphia: Elsevier, 2007.
- SALIKI, J. T.; DUBOVI, E.J. Laboratory diagnosis of bovine diarrhoea virus **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 20, n. 1, p. 69-83, 2004.
- SANDVIK, T. Progress of control and prevention programs for bovine viral diarrhoea virus in Europe. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 20, n. 1, p. 151-169, 2004.
- SANTOS, S.S. Caracterização clínica, patológica e molecular da infecção pelo vírus da Diarreia Viral Bovina Tipo 2 não citopático em propriedade do Rio Grande do Sul. **Dissertação de mestrado**. Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2010. 86p.
- 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.
- SHIN T; ACLAND H. Tissue distribution of bovine viral diarrhoea virus antigens in persistently infected cattle. **Journal of Veterinary Science**, v. 2, n. 2, 2001.
- TAYLOR, L.F.; VAN DONKERSGOED, J.; DUBOVI, E.J.; HARLAND, R.J.; VAN DEN HURK, J.V.; RIBBLE, C.S. *et al.* The prevalence of bovine viral diarrhoea virus infection in a population of feedlot calves in Western Canada. **Can J Vet Res**, 1995; 59:87-93.